

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, BIOQUÍMICA
E MOLECULAR DE RIZÓBIOS RECOMENDADOS PARA
INOCULAÇÃO DE LEGUMINOSAS ARBÓREAS**

Kerly Cristina Pereira
Engenheira Agrônoma

Jaboticabal - São Paulo - Brasil

2002

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, BIOQUÍMICA
E MOLECULAR DE RIZÓBIOS RECOMENDADOS PARA A
INOCULAÇÃO DE LEGUMINOSAS ARBÓREAS**

Kerly Cristina Pereira

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Maria Carareto Alves

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Campus de Jaboticabal - UNESP, para obtenção do Título de Mestre em Microbiologia - Área de Concentração em Microbiologia.

Jaboticabal - SP

Abril - 2002

Pereira, Kerly Cristina
P436c Caracterização morfológica, bioquímica e molecular de rizóbios
recomendados para inoculação de leguminosas arbóreas / Kerly
Cristina Pereira. -- Jaboticabal, 2002
x, 63 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2002

Orientador: Lúcia Maria Carareto Alves

Banca examinadora: Eliana Gertrudes de Macedo Lemos,
Luciane Prioli Ciapina

Bibliografia

1. *Rhizobium/Bradyrhizobium*. 2. Exopolissacarídeos. 3. 16SrDNA
/ PCR-RFLP. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias
e Veterinárias.

CDU 576.8

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da
Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Kerly Cirstina Pereira, nascida em Passos (MG), aos 03 de setembro de 1970, é Engenheira Agrônoma formada pela Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Campus de Jaboticabal (SP) em novembro de 1997. Após isso, realizou cursos de especialização em Cultura de Tecidos no Jardim Botânico (Seção de Orquidário), em São Paulo (SP). Iniciou o curso de Mestrado em Microbiologia em agosto de 1999.

A Deus pela benção do sol e da chuva

Ofereço

À minha família por ter acreditado,

Dedico

À minha mãe mais uma vez pela confiança

Minha vida

À Lúcia Carareto Alves pela amizade, orientação, carinho e toda a
alegria por ela transmitida

Minha eterna gratidão

AGRADECIMENTOS

- à Profa. Dra. Eliana Lemos pelo carinho e oportunidade;
- ao João Carlos Campanharo pela amizade e pelo auxílio a práticas laboratoriais;
- à Maria Cândida Bento pela amizade e pela ajuda;
- à Silvana pela grande ajuda e Amizade;
- aos meus eternos amigos: Luciana Justi, Luciana Coicev, Cláudio Castro (Lula), Izildinha, Afonso Takao Murata, Cláudia Regina, Alessandro Prado e Geraldo, minha saudade;
- aos amigos de laboratório: Alessandro Pedro, Ana Veruska, Ana Paula, Kitty, Denilson, Edson, Ester, Érico, Eliamar, Gizele, Humberto, Luciano, Maurício, Miguel, Rodrigo, Rhuanito, Regiane, Ronaldo, Renato, Silvana e Tereza Castellane;
- à Vitória pelo carinho, atenção e amizade;
- à Alda Otononi, pela amizade e auxílio nas análises;
- à Luciane Prioli Ciapina, pelo carinho;
- à Profa. Dra. Maria Aparecida Centurion, pela enorme amizade e solidariedade;
- ao Prof. Dr. João Carlos Oliveira, pela atenção;
- ao Prof. Dr. Antônio Ferrauda pela preciosa ajuda e carinho;
- a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho;
- à CAPES, pela bolsa concedida
- à FAPESP, pelo auxílio financeiro (Processo nº 96/9863-4).

Olhai para os lírios do campo, como eles crescem: não trabalham nem fiam;
E eu vós digo que nem Salomão, em toda a sua glória, se vestiu como qualquer deles.

Pois, se Deus assim veste a erva do campo,
que hoje existe, e amanhã é lançada no forno,
não vos vestirá muito mais a vós, homens de pouca fé?

Não andeis pois inquietos, dizendo: Que comeremos, ou que beberemos, ou com que
nos vestiremos?

Porque todas estas coisas os gentios procuram

De certo vosso Pai celestial bem sabe que necessitas de todas estas coisas;
Mas, buscai primeiro o reino de Deus, e a sua justiça, e todas estas coisas vos serão
acrescentadas.

Não vos inquieteis pois pelo dia de amanhã,
Porque o dia de amanhã cuidará de si mesmo.

Basta a cada dia o seu mal.

(Mateus 7)

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
I. INTRODUÇÃO	1
II. REVISÃO DE LITERATURA	3
III. MATERIAL E MÉTODOS	16
1. Curvas de crescimento	16
2. Morfologia e tempo de aparecimento de colônias	16
3. Testes de produção de ácido/base	17
4. Análise de EPS	18
5. Tempo de crescimento máximo das bactérias	19
6. Extração e Purificação do DNA das estirpes de rizóbio	19
7. Amplificação do DNA com oligonucleotídeos correspondentes às regiões 16S rDNA e digestão dos produtos da amplificação por endonucleases de restrição (PCR-RFLP)	20
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
V. CONCLUSÕES	35
VI. REFERÊNCIAS	36
APÊNDICE(S)	47
Apêndice A - Dados obtidos usando um modelo exponencial quadrático que permitiu obter um coeficiente de determinação (R^2) muito próximo a 1, permitindo avaliar o crescimento das estirpes com maior credibilidade	48
Apêndice B - Estirpe 4077	49
Apêndice C - Estirpe 6070	49
Apêndice D - Estirpe 6153	50
Apêndice E - Estirpe 6069	50

Apêndice F - Estirpe 6168	51
Apêndice G - Estirpe 6161	51
Apêndice H - Estirpe 6162	52
Apêndice I - Estirpe 6160	52
Apêndice J - Estirpe 6169	53
Apêndice K - Estirpe 6192	53
Apêndice L - Estirpe 6159	54
Apêndice M - Estirpe 6164	54
Apêndice N - Estirpe 5080	55
Apêndice O - Estirpe 6165	55
Apêndice P - Perfis cromatográficos representativos de açúcares derivados com PMP obtidos a partir da hidrólise de EPS das estirpes em estudo	56

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, BIOQUÍMICA E MOLECULAR DE RIZÓBIOS RECOMENDADOS PARA INOCULAÇÃO DE LEGUMINOSAS ARBÓREAS

RESUMO - Este trabalho objetivou avaliar as diferenças microbiológicas, moleculares e a composição de exopolissacarídeos entre as estirpes que foram classificadas como *Bradyrhizobium* recomendadas para a inoculação de leguminosas arbóreas, mas que através de ensaios isoenzimáticos da superóxido dismutase apresentaram perfis de *Rhizobium*. As estirpes foram crescidas em meio de cultura RDM e avaliadas em curvas de crescimento, morfologia de colônias, produção de ácido/base. A análise dos açúcares presentes nos EPS foi feita em CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) e a análise molecular foi realizada através da metodologia de PCR-RFLP utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores específicos para a região do DNA correspondente ao 16S rDNA, para as restrições utilizou-se as endonucleases *Taq I*, *Msp I*, *Hae III* e *Dde I*. Os fragmentos foram visualizados em gel de agarose e analisados pelo programa Quantity One (BIORAD) que utiliza para a comparação dos dados o coeficiente de Dice e para o agrupamento o método UPGAMA (Unweighted pair group method with arithmetic means). De acordo com os resultados obtidos pode-se verificar que as estirpes SEMIA 5080, 6160 e 6159 e SEMIA 4077 e 6070 apresentaram todas as características avaliadas como sendo dos gêneros *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*, respectivamente, entretanto pode-se observar que existe uma mistura de características entre as outras estirpes. O grupo formado pelas estirpes SEMIA 6159, 6192 e 6164 apresentou predominância das características de *Bradyrhizobium*, enquanto que aquele formado pelas estirpes SEMIA 6162 e 6168 mostrou-se preponderantemente com características de bactérias do gênero *Rhizobium*. Por outro lado, o grupo formado pelas estirpes 6169, 6161 e 6165 apresenta uma equivalência entre as características dos gêneros *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*.

Palavras-Chave: *Bradyrhizobim*, *Rhizobium*, Exopolissacarídeos, 16SrDNA, PCR-RFLP.

MORPHOLOGICAL, BIOCHEMICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF LEGUME TREES RHIZOBIA

ABSTRACT - This research aimed to evaluate strains of *Bradyrhizobium* recommended for inoculation of legume trees according to their microbiological, molecular and, exopolysaccharides contents characteristics. Although these strains were supplied as *Bradyrhizobium*, their isoenzymatic profile for superoxid dismutase was similar to *Rhizobium* profile. The strains were grown in RDM culture medium for determination of their growth curve, the colony morphology and the production of acids/bases. The analysis of sugar content of exopolysaccharides was done using HPLC (HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY) and the molecular analysis was done by PCR-RFLP using specific primers for 16S rDNA. The restrictions used the endonucleases *Taq I*, *Msp I*, *Hae III* and *Dde*, the fragments were observed on EBAGE and analysed by Quantity One Software. This program uses the Dice coefficient for the comparison of the data and the methodology of UPGAMA for the grouping. The results obtained showed strains SEMIA 5080, 6160, 6159 and SEMIA 4077, 6070 presented all characteristics as belonging to the genera *Bradyrhizobium* and *Rhizobium*, respectively. Besides either, the results showed that there are a mix of characteristics on the other strains. The group formed by SEMIA 6192 and 6164 presented predominance of characteristics from *Bradyrhizobium*, by the way the group constituted by SEMIA 6069, 6162 and 6168 showed more characteristics from *Rhizobium*. Another group, formed by the strains SEMIA 6169, 6161 and 6165 showed similar numbers of characteristics from *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*.

Keywords – *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, Exopolysaccharides, 16S rDNA, PCR-RFLP.

I. INTRODUÇÃO

A fixação do nitrogênio, processo pelo qual o nitrogênio molecular é reduzido a amônia, é uma característica única de alguns procariotos. Associações simbióticas de Rhizobiaceae com plantas hospedeiras da família leguminosae ocorrem na natureza.

As espécies de *Rhizobium* foram inicialmente classificadas dentro de um único gênero, sendo posteriormente, reclassificadas dentro da família Rhizobiaceae em *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium* e *Mesorhizobium*. Essas bactérias formam nódulos nas raízes e algumas vezes nos caules, de várias plantas hospedeiras. Espécies, subespécies e biovars dentro destes gêneros são definidas para um grande número de leguminosas hospedeiras. Entretanto, questões taxonômicas continuam a ser um ponto importante nas pesquisas com estes microrganismos.

Estudos para identificar as linhagens de uma dada espécie são importantes para entender, e talvez manipular, a ecologia e a competição entre rizóbios no campo. Centenas de estirpes de *Bradyrhizobium* sp têm sido isoladas e mantidas em coleções, entretanto, as poucas informações existentes não permitem, na maioria das vezes, diferenciá-las.

Geralmente, os métodos utilizados para identificação de linhagens consideram propriedades de (1) membranas tais como interação lectina-planta, sorologia, fagotipagem e marcas de resistência a antibiótico, (2) necessidades metabólicas e (3) respostas fisiológicas de tolerância à temperatura, salinidade, variações do pH, etc.

Embora haja uma série de restrições quanto à especificidade destes testes, sem dúvida nenhuma, o conjunto das informações obtidas com eles permite juntamente com uma metodologia mais específica, tais como, perfil protéico e de lipopolissacarídeos em SDS-PAGE, polimorfismo enzimático e padrões de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism, identificar um maior número de linhagens de *Bradyrhizobium* sp a fim de conhecer suas características biológicas.

Pelas grandes possibilidades metodológicas que existem atualmente e que permitem a caracterização bioquímica e molecular dos mais diversos microrganismos, o objetivo desse trabalho foi o de avaliar as características de estirpes que estão classificadas como *Bradyrhizobium*, que são recomendadas para inoculação de leguminosas arbóreas, mas que através de ensaios isoenzimáticos da Superóxido dismutase e Glicose 6-fosfato desidrogenase apresentaram perfis de *Rhizobium*. A caracterização foi dada pela avaliação das diferenças microbiológicas, da composição de EPS (exopolissacarídeos) e da análise dos fragmentos do produto da reação da polimerase em cadeia da região do gene 16S rDNA digeridos com endonucleases (PCR-RFLP).

II. REVISÃO DE LITERATURA

Dentre as espécies vegetais mais promissoras para a restauração de solos empobrecidos e erodidos estão as espécies de leguminosas perenes tais como as essências arbóreas, que não só protegem os solos, como também participam, vantajosamente, da ciclagem de nutrientes. Uma propriedade importante de grande parte dessas espécies de leguminosas é a habilidade em promover simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio do gênero *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*.

A família Rhizobiaceae foi inicialmente classificada em dois gêneros: *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* (JORDAN, 1984). São bactérias gram-negativas que em simbiose com leguminosas formam nódulos e fixam nitrogênio atmosférico (N₂). A simbiose entre as leguminosas e bactérias do gênero *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* pode suprir grande parte do nitrogênio necessário ao desenvolvimento e produtividade destas plantas, entretanto, para que isso ocorra, a leguminosa deve estar eficientemente nodulada pelo rizóbio específico. Para ocorrer a nodulação é necessário que haja uma alta população de rizóbios, juntos ou próximos, à superfície radicular da leguminosa hospedeira.

Atualmente, existem centenas de estirpes de rizóbios isoladas e recomendadas, mas poucas foram classificadas sistematicamente. Estudos básicos são necessários para diferenciá-las e agrupá-las, tendo em vista que estirpes idênticas recebidas de várias fontes podem ter catalogação diferente nos centros de germoplasmas, aumentando os gastos com manutenção e riscos de contaminação dos estoques. A classificação da bactéria como pertencente ao gênero *Rhizobium* ou *Bradyrhizobium* se faz através da análise das características dos isolados quanto a velocidade de crescimento e morfologia de colônias.

A classificação de bactérias tem se baseado em características genéticas e/ou fenotípicas. As genotípicas podem ser obtidas através de vários métodos, tais como: relação mol% G+C, análise da seqüência de nucleotídeos (DNA e/ou rRNA); hibridização DNA-DNA e/ou RNA; perfil do polimorfismo obtido com a amplificação ao

acaso do DNA (RADP) ou dos fragmentos de restrição (RFLP); perfil obtido com seqüências repetitivas no genoma (REP e ERIC) e etc. As fenotípicas levam em consideração aspectos morfológicos, fisiológicos ou bioquímicos e no caso da família Rhizobiaceae, também na compatibilidade simbiótica com as leguminosas hospedeiras.

Por outro lado, quanto à possibilidade de diferenciar uma estirpe por um conjunto de métodos bioquímicos moleculares, abrem-se perspectivas novas, para os estudos de competição e da permanência no solo das estirpes inoculadas, uma vez que as estirpes assim caracterizadas poderiam ser seguramente identificadas.

A classificação oficial da família Rhizobiaceae, como se encontra no Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (JORDAN, 1984), considera somente características fenotípicas e a relação mol% G + C, entretanto, o subcomitê de taxonomia de Rhizobiacea (GRAHAM et al., 1991) propôs que um conjunto mínimo de metodologias padronizadas deveria ser executado para a descrição de um novo gênero ou espécie. Assim, seria desejável que pelo menos três características genotípicas (homologia de DNA:DNA; RFLP; RADP ou REP e ERIC); três características fenotípicas (por ex.: propriedades simbióticas; características morfológicas e de cultivo) e uma característica mista das duas (Análise de múltiplos loci enzimáticos por eletroforese, MLEE) fossem analisadas.

A classificação taxonômica usual dividia o gênero *Rhizobium* em seis espécies distintas, a saber *Rhizobium japonicum*, *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium trifolii*, *Rhizobium phaseoli*, *Rhizobium meliloti* e *Rhizobium lotus* sp. Entretanto, os resultados encontrados por MURPHY (1970) indicaram variações de padrões isoenzimáticos, que permitiram estabelecer grandes semelhanças entre as espécies, *Rhizobium leguminosarum* e *Rhizobium trifolii*, enquanto que *Rhizobium meliloti* foi considerada como um grupo distinto das demais, quanto ao padrão de esterase, o mesmo ocorrendo com *Rhizobium japonicum* cujos resultados indicaram a ausência de atividade esterásica. Tais resultados somados aos obtidos na análise de outras características (a composição de base e hibridização de DNA; a presença e natureza de polissacarídeos, a sorologia, a utilização e metabolismo de carboidratos, a composição protéica, a susceptibilidade a antibióticos e bacteriófagos, etc.) como evidenciado por JORDAN

(1984), levaram a uma nova divisão do então gênero *Rhizobium*. As espécies *Rhizobium phaseoli*, *Rhizobium trifolii* e *Rhizobium viciae* foram situadas como “biovars” dentro da espécie *Rhizobium leguminosarum*. Outras espécies do gênero *Rhizobium* também foram descritas: *Rhizobium etli*, *Rhizobium tropici*, *Rhizobium galegae*, *Rhizobium huakuii* e *Rhizobium hainanensis*.

Posteriormente, dois novos gêneros foram descritos: *Azorhizobium* (incluindo a espécie *Azorhizobium caulinodans* que nodula *Sesbania rostrata*) (DREYFUS et al., 1988) e *Sinorhizobium* (incluindo a antiga espécie *Rhizobium meliloti*, noduladora de alfafa, e agora reclassificada como *Sinorhizobium meliloti*) (CHEN et al., 1988). Na década passada, foi proposto e aceito que as bactérias do ramo de *Rhizobium loti* constituíssem um novo gênero, *Mesorhizobium* (LINDSTRÖM et al., 1995).

HUNGRIA et al., (1997) relata que as bactérias que nodulavam soja foram classificadas como *Rhizobium japonicum*, embora fosse salientado que diferiam de um grupo grande de estirpes de rizóbio, por apresentarem crescimento lento e produção de álcali em meio de cultura com manitol como fonte de carbono. A partir de 1982, as bactérias da espécie *Rhizobium japonicum* foram reclassificadas em um novo gênero, *Bradyrhizobium*, que apresentava uma única espécie definida, *Bradyrhizobium japonicum*.

A inclusão de outras espécies no gênero *Bradyrhizobium* ficou dependente da realização de estudos taxonômicos, uma vez que este gênero representa um grupo heterogêneo de bactérias onde as relações taxonômicas não são ainda bem compreendidas (LEMOS, 1994). Assim, as espécies do gênero *Bradyrhizobium*, diferentes de *Bradyrhizobium japonicum*, passaram a ser referidas como *Bradyrhizobium* sp, seguido pelo nome da planta hospedeira, entre parênteses (JORDAN, 1984). Este cuidado na classificação dos bradirrizóbios é totalmente compreensível uma vez que HOLLIS (1981) obteve resultados de hibridização de DNA:DNA, para diferentes *Bradyrhizobium japonicum*, que sugeriam a existência de dois grandes grupos de homologia.

Trabalhos posteriores confirmaram a ocorrência de divergências fenotípicas e genéticas dentro da espécie *Bradyrhizobium japonicum*, recém incluída no gênero

Bradyrhizobium. Através da análise de Polimorfismo do Tamanho dos Fragmentos de Restrição (RFLP) e usando sondas de genes *nifDKE*, MINAMISAWA (1992), mostrou que as vinte e cinco estirpes de *Bradyrhizobium japonicum*, por ele analisadas poderiam ser divididas em dois grupos divergentes, denominados genótipos I e II. Trabalhos mais recentes de genética molecular tem consistentemente reforçado a proposta de classificação em dois grupos, sugerida por HOLLIS et al., (1981). Na verdade, esses pesquisadores caracterizaram dois grupos de homologia de DNA onde um desses grupos foi subdividido em I e Ia e o segundo seria o grupo II. As espécies reunidas no grupo II caracterizariam-se por nodular vários hospedeiros, por induzir a clorose foliar em alguns cultivares de soja e também por apresentar diferenças na composição de exopolissacarídeos, na morfologia das colônias, na expressão da hidrogenase e na análise dos padrões de RFLP.

Com base nesses aspectos, KUYKENDALL et al. (1992) fizeram uma proposta em relação ao gênero *Bradyrhizobium* sugerindo a separação de *Bradyrhizobium japonicum* em duas espécies distintas. Uma chamada *Bradyrhizobium japonicum* (noduladora específica de soja e com homologia com o grupo I/Ia de DNA) e uma nova espécie, a *Bradyrhizobium elkanii* (noduladora de vários hospedeiros e apresentando homologia do grupo II de DNA). Na década de 1990, as duas principais estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* (29W=SEMIA 5019 e SEMIA 587), utilizadas no Brasil como inoculantes comerciais, foram definidas por RUMJANEK et al. (1993) como membros da espécie *Bradyrhizobium elkanii*.

As principais diferenças morfológicas, segundo GILLER et al. (1991), entre os gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* são: o crescimento mais rápido do *Rhizobium*, colônias possuindo um tamanho maior que 1mm em 2 dias; tempo de geração de 2,4 a 4,0 horas; enquanto que em *Bradyrhizobium*, o crescimento é lento, as colônias apresentaram tamanho de 1 mm em 6-10 dias e o tempo de geração é de 7 a 13 horas.

ARAÚJO (1994) relatou que em meio sólido, as colônias de rizóbios são geralmente discretas, redondas, variando de achatadas a cônicas, ou até em forma de cúpula. As colônias são normalmente lisas, podendo ser brancas, opacas ou leitosas, e até translúcidas. Podem ser brilhantes ou foscas, podendo escurecer no centro quando

a cultura fica velha. Alguns rizóbios podem produzir colônias rosadas. O tempo necessário para as colônias atingirem seu máximo desenvolvimento, em placas, varia de 3-5 dias para estirpes de crescimento rápido com colônias medindo de 4-5mm de diâmetro até 7-12 dias para estirpes de crescimento lento medindo entre(1-4mm) de diâmetro.

A velocidade de crescimento varia com a temperatura de incubação, a origem do inóculo (cultura ou nódulo) e a composição do meio. O tamanho das colônias também pode diminuir em placas superpovoadas. Algumas estirpes de rizóbios, sobretudo as de crescimento rápido, apresentam colônias com aspecto bastante gomoso devido à produção de exopolissacarídeos (EPS), polímeros de glicose e outras hexoses que compõem as cápsulas das bactérias. Em alguns casos, as colônias chegam a “pingar” nas tampas das placas que são incubadas invertidas.

Devido a existência de polissacarídeos externos nas células de rizóbios, estas tendem a se agrupar. A formação de grumos é ao acaso e, quanto mais a espécie bacteriana produzir exopolissacarídeos, maior a dificuldade de dissolução destes agrupamentos de células. A densidade óptica de uma suspensão bacteriana é, geralmente, correlacionada com o número de células presentes. Assim, medidas de transmitâncias desta suspensão, ou de diluições, podem ser um modo conveniente de estimar o número de células, ao longo de cultivos, mas possuem limitações, sendo adequadas para meios de cultura sem partículas, culturas em fase logarítmica de crescimento e para linhagens que não apresentam grande formação de exopolissacarídeos (URENHA, 1994). Um outro aspecto também observado pelo autor, foi que o tempo de aparecimento das colônias deve ser detectado o mais precocemente possível, evitando que as mesmas coalesçam. O tempo de geração de aproximadamente 3,5 horas. As bactérias do gênero *Bradyrhizobium* (*Bradyrhizobium japonicum*) têm crescimento lento e produz reação básica no meio de cultura, provocando aumento do pH. YELTON (1983) relatou que o tempo de geração de estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* pode variar dependendo do meio de cultura. A estirpe de *Rhizobium* USDA 191, apresentou tempo de geração de 4 –7 horas e para *Bradyrhizobium* 15 – 16 horas. Entretanto, foi observado por STOWERS e

EAGLESHAM, (1984), que a estirpe de *Rhizobium* apresentou tempo de geração de 3-5 horas em meios com glicerol, manitol, sacarose, arabinose e succinato. Tempos de geração variando de 1 a 44 horas, foram obtidos por HERNANDES e FOCHT, (1984) com várias estirpes do grupo Cowpea e de *Bradyrhizobium japonicum* cultivadas em meio contendo extrato de levedura com glicose.

Essas discrepâncias entre o tempo de geração e crescimento talvez possam ser explicadas pelo fato de que a forma para o cálculo do tempo de geração baseia-se em estudos realizados com bactérias como *E. coli* que se duplicam em questão de minutos, enquanto que os rizóbios necessitam de algumas horas.

O gênero *Bradyrhizobium* suporta condições adversas de crescimento, possuem grânulos de poli- β -hidroxibutirato, são gram negativas, aeróbicas, crescem em pH ótimo de 6,7 – 6,8 e temperatura de 25⁰ – 30°C. As colônias são circulares, opacas, eventualmente, translúcidas e brancas, não ultrapassam 1 mm de diâmetro com 5-7 dias de incubação, (HOLT et al.;1994). Entretanto, o gênero *Rhizobium* possui colônias circulares, convexas, semitranslúcidas e mucilaginosa, usualmente apresentando com 2-4 mm de diâmetro em 3-5 dias e pronunciada turbidez após 2 ou 3 dias em meio líquido, sob agitação suave. Produz ácido em meio contendo manitol, sais e outros carboidratos.

Jordan (1984), citado por URENHA (1994), relatou que em *Rhizobium leguminosarum* bv. *Phaseoli*, a presença de reação ácida durante o cultivo, promoveu queda do pH do meio de cultura. No entanto, dados experimentais de cultivo desta bactéria, em fermentadores, na presença de sacarose, glutamato monossódico e extrato de levedura mostraram comportamento oposto.

Do mesmo modo ARAÚJO (1994), de uma forma bem grosseira, verificou que os rizóbios podem ser divididos em três classes quanto à reação de indicadores de pH adicionados ao meio de cultura: estirpes que acidificam o meio de cultura, que alcalinizam e que não alteram o pH do meio de cultura.

As células dos rizóbios geralmente não absorvem o corante Vermelho Congo, quando as placas são incubadas no escuro. Essa propriedade permite que se empregue este corante em estudos que envolvam o plaqueamento de misturas de

microrganismos. Após o crescimento, as colônias dos contaminantes adquirem coloração vermelha intensa, enquanto que as colônias de rizóbios permanecem brancas ou levemente rosadas. A reação depende da concentração de Vermelho Congo e da idade da cultura. As colônias dos rizóbios absorvem o corante se forem expostas à luz durante uma hora ou mais após ter ocorrido o crescimento. No caso de culturas velhas de rizóbios, que acidificam o meio, pode haver mudança na coloração do meio, que passa à violeta devido à acidez, HUNGRIA, (1994).

Placas contendo sais e ágar, adicionadas de Azul de Bromotimol, recém preparadas, têm um pH em torno de 6,8 e cor verde. Rizóbio de crescimento lento tendem a alcalinizar o meio de cultura, causando uma mudança na cor do indicador, para azul. As estirpes de Rizóbios de crescimento rápido costumam apresentar reação ácida tornando o meio de cultura amarelo.

Como já foi dito, além da morfologia de colônias (RUMJANEK et al.; 1993; LEMOS, 1994), vários outros métodos têm sido utilizados na identificação de estirpes, tais como resistência a antibióticos (SCOTTI et al., 1982; PADMANABHAN et al.; 1990), utilização dos corantes Vermelho Congo e Azul de Bromotimol (VINCENT, 1970.), atividade da enzima hidrogenase (LEMOS, 1994), perfil de plasmídeos (PLASZINSKI et al., 1985; BALDANE et al., 1992; MARTINEZ-ROMERO, 1994), sorologia (MPEPEREKI & WOLLUM, 1991), análise de lipopolissacarídeos (SINDHU et al., 1990; ANDREANI, 1992; CARARETO ALVES e LEMOS, 1996, PRADO, 2000).

Entre essas técnicas uma das mais utilizadas é a eletroforese de múltiplos loci enzimáticos (DEMEZAS et al., 1991; VICARI, 1999; PRADO, 2000). Em estudos taxonômicos de bactérias, muitos pesquisadores têm se utilizado de perfis enzimáticos em gel de amido para uma classificação preliminar desses microrganismos (NORIS, 1964; CAN e WILLOX, 1965; LUND, 1965; NAKAYAMA e TAKETA, 1987; HOGAN e COLWELL, 1969). O princípio básico desta técnica é o de que diferenças na mobilidade de isoenzimas em um campo elétrico são resultantes de diferenças nas seqüências de DNA que codificam tais enzimas. Assim, se os padrões de bandas de dois indivíduos diferem, assume-se que estas diferenças possuam base genética e sejam herdáveis (MURPHY e MASTERSON (1970). PEREIRA (2000) observou através

desta técnica uma baixa correlação entre 19 estirpes de leguminosas forrageiras de clima tropical por ele estudadas.

O polimorfismo enzimático em estirpes de *Rhizobium* isoladas de várias leguminosas foi também usado não só com intuito de caracterização de estirpes como também para um melhor entendimento da estrutura genética da população de *Rhizobium leguminosarum*, no solo e em nódulos.

Muitas formas de enzimas foram detectadas através de eletroforese em gel de amido e poli(acrilamida) em estirpes de *Rhizobium*. Por ex., a enzima 3-hidroxi-butirato desidrogenase (HBDH) (D-3 hidroxi-butirato:-NAD oxi-redutase, EC.1.1.1.30) catalisa a reação reversível de oxidação do 3-hidroxi-butirato para acetoacetato na presença do NAD⁺, e os padrões eletroforéticos obtidos para essa enzima, em alguns casos, revelaram-se específicos tanto em relação à espécie como para a linhagem específica de *Rhizobium* (FOTTRELL e O'HARA, 1969).

A ocorrência de alta concentração de esterases e a grande atividade demonstrada por essas enzimas, além da facilidade de detecção analítica de suas formas múltiplas, levaram MURPHY e MASTERSON (1970) a investigar a presença de esterases em 52 estirpes de seis espécies de *Rhizobium* para fim de classificação. Os padrões isoenzimáticos obtidos foram analisados e comparados com a finalidade de subsidiar uma classificação mais adequada dos rizóbios estudados.

LEMOS (1994), em análise por isoenzimas em estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium* sp (Cowpea), observou variações nos padrões polimórficos das isoenzimas α e β - esterase permitindo uma rápida identificação das estirpes estudadas, inclusive aquelas de mesmo sorogrupo.

PRADO (2000), através de análises por isoenzimas, em estirpes recomendadas para inoculação de diversas leguminosas, também observou que este tipo de marcador bioquímico possibilita a diferenciação entre as estirpes de rizóbios e bradirrizóbios, sendo possível agrupar estirpes da mesma espécie que nodulam o mesmo hospedeiro.

Do mesmo modo, PEREIRA (2000), em análise por isoenzima de rizóbios de leguminosas forrageiras de clima tropical, observou que os sistemas α e β - esterase

são muito semelhantes entre si e revelaram um alto polimorfismo entre as estirpes deste grupo, possibilitando diferenciar a maioria delas.

Resultados obtidos por BENTO¹ (comunicação pessoal), estudando 11 sistemas isoenzimáticos em estirpes de *Bradyrhizobium sp* que nodulam leguminosas arbóreas (segundo a classificação do catálogo da FEPAGRO), verificou um alto polimorfismo entre essas estirpes, sugerindo que algumas estirpes podem estar classificadas erroneamente como *Bradyrhizobium*. Nos sistemas isoenzimáticos da superóxido redutase e da glicose 6-fosfato desidrogenase, um grupo de estirpes (SEMIA 6168, 6162, 6153, 6069, 6070, 6165 e 6161) apresentou perfis característico de *Rhizobium*.

Os exapolissacarídeos das bactérias estabelecem um modelo importante para o estudo da agregação e secreção molecular, regulação gênica, interações célula-célula, simbiose e patogenicidade (LEIGH e COPLIN, 1992; DENNY, 1995).

Os EPSs, segundo COSTERTON (1987), possibilitam vida livre à bactéria, permitindo a aderência e colonização à superfícies sólidas onde nutrientes se acumulam. Eles envolvem as membranas das células protegendo-as do dessecação e outros estresses ambientais, além de poder ajudar na fixação de minerais e nutrientes próximos à bactéria (SUTHERLAND, 1988; WHITFIELD, 1988).

Os exapolissacarídeos (EPS) podem ser homopolímeros ou heteropolímeros e possuem uma variedade de substituintes não carboidratados (COSTERTON, 1987). Entre os homopolímeros encontrados em bactérias que interagem com plantas, as mais comuns são as glucanas periplasmáticas β (1-2) presentes em Rhizobaceae, celulose em *Agrobacterium* e alginatas em *Pseudomonas sp* fluorescentes. Já em *Erwinia amylovora* e *E. stewartii* os exapolissacarídeos são heteropolímeros compostos de galactose, ácido glucurônico e piruvato. Em *Xylella fastidiosa* estes heteropolímeros são compostos por manose, glicose e ácido galacturônico (OTOBONI, 2001).

Em *Bradyrhizobium*, os EPSs são macromoléculas que contém açúcares que fazem parte das estruturas e componentes de superfície celular das bactérias. Na composição dos EPSs foram encontrados os seguintes açúcares: manose, glicose, galactose e ramnose em diferentes concentrações. Em determinada estirpe desta

bactéria além desses açúcares, foi encontrado também o ácido galacturônico. Suas funções no processo de invasão bacteriana incluem: modificação da superfície bacteriana, no sentido de evitar o desenvolvimento de uma resposta de defesa do hospedeiro; encapsulamento da bactéria, como uma forma de proteção contra estresse fisiológico encontrado no cordão de infecção e reconhecimento da superfície bacteriana através da aderência ao hospedeiro (BREWIN, 1991; NÍCOLAS, 1996).

MINAMISAWA (1989) mostrou que estirpes de rizóbio podem ser classificadas em relação à composição de açúcares do EPS, onde o tipo A é constituído por glicose, manose, galactose e 4-O-metil galactose, e o tipo B apresenta estrutura de EPS constituída de ramnose e ácido galacturônico.

Marcadores moleculares de ácidos nucleicos constituem-se também em poderosas ferramentas na aquisição de informações sobre a diversidade genética e relações filogenéticas entre espécies. A análise de polimorfismos no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) já foi amplamente utilizada para se determinar relações filogenéticas entre diversos microrganismos (ENGVILD et al., 1990; DEMEZAS et al., 1991; KOZUSNY-ANDREANI, 1997). Desse mesmo modo, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), técnica fácil e versátil que utiliza as informações cruzadas dos “primers” BOXA, REP e ERIC (também conhecida como rep-PCR), possibilita um alto nível de resolução taxonômica, sendo portanto, muito útil nos estudos de diversidade de *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* (VAN ROSSUM et al., 1995; BRUIJN, 1992; VICARI, 1999, PRADO, 2000).

A diversidade genética entre linhagens de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, revelada por isoenzimas, foi também constatada através de RFLP por DEMEZAS et al, (1991), tornando possível a discriminação entre isolados do meio ambiente e entre estirpes de uma mesma espécie, bem como proporcionaram a confirmação da diversidade genética entre essas linhagens

O avanço da biologia molecular gerou um novo enfoque para a caracterização de rizóbios. HOLLIS et al. (1981), através de hibridização DNA-DNA, indicaram a

¹ Maria Cândida Bento, Mestranda do Curso de Pós-Graduação em Microbiologia. FCAV/UNESP.

inadequada classificação de *Bradyrhizobium*, propondo que as linhagens estudadas fossem divididas em 2 grupos: *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium spp.*

KAY et al. (1994), identificaram linhagens de *B. japonicum* isoladas de solos da Itália por meio de duas técnicas: a espectrofotometria de pirólise de massa (PLYMS) e a PCR usando oligonucleotídeos arbitrários.

Para várias linhagens de *Rhizobium meliloti*, BRUIJN (1992) mostrou que há uma correlação entre dados derivados da análise de REP e ERIC-PCR e dados gerados por eletroforese de múltiplos loci enzimáticos.

JUDD et al. (1993) estudaram linhagens de *Bradyrhizobium japonicum* "serocluster" 123 geneticamente relacionadas utilizando a técnica de PCR conjuntamente com os oligonucleotídeos iniciadores correspondendo às sequências REP e ERIC e concluíram que esta técnica pode diferenciar linhagens proximamente relacionadas, as quais não eram distinguidas usando outros métodos. Os autores verificaram ainda que, embora ERIC e REP-PCR forneçam um meio para diferenciar essas linhagens, esses "primers" não fornecem um meio efetivo para classificar linhagens de *Bradyrhizobium* geneticamente divergentes. Os resultados obtidos pela análise de RFLP estavam correlacionados com a classificação de linhagens de *Bradyrhizobium japonicum* "serocluster" 123 obtidas por e ERIC-PCR.

SELENSKA-POBELL et al. (1995) também aplicaram a técnica de PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores arbitrários e específicos correspondentes as seqüências ERIC, REP e BOX para identificar linhagens de *Rhizobium galegae* e verificaram que esta técnica mostrou-se conveniente para controlar a produção e aplicação de *Rhizobium* em inoculantes.

CHEN et al.(2000), trabalhando na caracterização molecular de 48 isolados de nódulos de soja de 16 regiões do Paraguai, detectaram alto nível de diversidade genética através de ERIC-REP-PCR, com a maioria dos isolados representando estirpes únicas. A maioria dos isolados se caracterizavam por apresentar crescimento lento e por alcalinizarem o meio em que foram cultivadas (meio contendo manitol como fonte de carbono), sendo, então caracterizadas como estirpes representantes de *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii*. O sequenciamento da região 16S

rDNA confirmaram a identidade das espécies. Os demais isolados apresentaram alto polimorfismo pelos perfis de ERIC- REP-PCR e se caracterizam por apresentar rápido crescimento e reações ácidas “in vitro” mostrando alta identidade com espécies de *Rhizobium*.

Um outro aspecto molecular usado no estudo das bactérias fixadora de nitrogênio foi proposto por SEGOVIA et al. (1991) e YONG et al. (1991). Esses autores analisaram a distância filogenética entre estirpes de *Rhizobium* através do seqüenciamento do gene DNA ribossomal 16S usando amplificação do DNA.

WOESE, 1987 relata porque os rDNAs são muito utilizados em estudos de filogenia bacteriana. Os rRNAs mostram um alto grau de constância funcional, a qual assegura uma relativa representatividade da taxa de mudança evolutiva numa linha de descendentes. Eles ocorrem em todos os organismos e assumem diferentes posições em suas seqüências, mudando ao acaso em taxas muito diferentes, permitindo que a maioria das relações filogenéticas seja medida. Essas seqüências são longas, o que permite que elas forneçam informações adequadas, e consistem de muitos domínios. Há cerca de 50 extremidades em forma de hélice na estrutura secundária do rRNA 16S. Todas essas características os tornam acurados cronômetros evolutivos.

Talvez, a melhor razão para o uso dos RNAs ribossomais como medida de mudança de taxa evolutiva, seja porque eles podem ser isolados com maior facilidade, rapidez e com uma técnica de extração mais rigorosa que para o DNA, sendo diretamente seqüenciadas por meio da enzima transcriptase reversa, o que os distingue das outras seqüências existentes nas células exceto por umas poucas espécies de pequenos RNAs. Entretanto, a natureza conservativa do gene do 16S rRNA limitam o poder de discriminação deste método em distinguir linhagens geneticamente próximas.

AMANN et al. (1995) descreveram que a utilização dos rRNAs juntamente com outras técnicas moleculares tem um grande potencial na análise da diversidade microbiana que são limitadas devido à técnicas de obtenção de culturas puras. O seqüenciamento dos rDNAs permitirão o conhecimento de novas informações genéticas para a biotecnologia. A construção de sondas de moléculas de rRNA e mRNA serão úteis em estudos de ecologia e de atividades “in situ” de populações definidas.

Em bactérias, o operon DNA ribossomal compreende três genes conservados funcional e evolutivamente: o gene da subunidade menor (rrs) 16S (rRNA), seguido por um espaço, o gene para a subunidade maior, 23S rRNA, seguido por um segundo espaço e o gene 5S rRNA.

WEISBURG et al. (1991), descreveu duas seqüências de oligonucleotídeos iniciadores (fD1 e rD1) para amplificação da região do gene 16S do operon DNA ribossomal. Essas seqüências são capazes de amplificar o gene 16S rDNA de muitas espécies de bactérias e tem sido usadas, com sucesso, para caracterizar e identificar várias espécies de bactérias em nível de gênero e espécie.

LAGUERRE et al (1994) mostraram que a utilização de um método de análise por PCR-RFLP resultava na rápida identificação de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Agrobacterium*. Neste método, seqüências iniciadoras da região do gene 16S ribossomal, fD1 e rD1, descritas por WEISBURG et al.1991, foram usadas para a amplificação do DNA. Derivados de regiões conservadas dos genes 16S rDNA, os iniciadores fD1 e rD1 foram capazes de amplificar quase que totalmente o 16S rDNA de muitos gêneros de bactérias. A observação em gel de agarose dos produtos obtidos com PCR após tratamento com endonuclease de restrição permitiu a diferenciação de 48 estirpes representantes dos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Agrobacterium*.

Estudos similares foram realizados por VINUESA et al. (1998) na caracterização genotípica de estirpes de *Bradyrhizobium*, através do uso de PCR-RFLP dos genes 16S rDNA e do espaço intergênico 16-23S rDNA e seqüenciamento parcial do gene 16S rDNA, mostraram que há uma grande diversidade entre as estirpes.

III. MATERIAL E MÉTODOS

As estirpes de *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* utilizadas foram obtidas junto ao Instituto de Pesquisas Agronômicas da Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Rio Grande do Sul (IPAGRO), setor de Microbiologia e estão relacionadas na Tabela 1, bem como as leguminosas hospedeiras. Foram utilizadas como padrões de *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* as estirpes 5080 e 4077, respectivamente.

1. Curvas de crescimento

Foram utilizados frascos especiais “Side Arm” contendo 100 mL de meio RDM (Rhizobium Defined Medium) (BISHOP et al.,1976). Em cada frasco foi inoculada 1 estirpe e estes foram mantidos sob agitação (140 rpm), à 28^o C, por 9 dias. A cada 24 horas, o crescimento foi registrado através da leitura da turbidez do meio realizada em um fotocolorímetro (Klett- Summerson , 640-700nm).

2. Morfologia e tempo de aparecimento de colônias

Foram realizadas diluições seriadas e inoculados 100 µl do meio de cultura contendo as estirpes em estudo em placas contendo meio YMA (Yeast Manitol Agar) (VINCENT,1970) com Vermelho Congo (SOMASEGARAN e HOBEN, 1984). As placas foram incubadas em BOD, a 28^oC e observadas diariamente para a avaliação do tempo de aparecimento das colônias e sua morfologia.

Tabela 1 - Relação de estirpes recomendadas para inoculação de leguminosas arbóreas.

Hospedeiro	Simbionte	Semia	Origem
<i>Leucaena leucocephala</i> V. Cunni.	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	6069	DF-10
<i>Leucaena leucocephala</i> V. Cunni.	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	6070	DF-15
<i>Leucaena leucocephala</i> V. K72, <i>L. leucocephala</i> V. K8, <i>L. leucocephala</i> V. Peru	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	6153	BR-827
<i>Enterolobium timbouva</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	6159	BR-4406
<i>Sclerobium paniculatum</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	6160	B R-5610
<i>Prosopis juliflora</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	6161	BR-4002
<i>Prosopis juliflora</i> e <i>Leucaena diversifolia</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	6162	BR-4007
<i>Acacia decurrens</i> , <i>A. mearnsii</i> ,	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	6164	BR-3608
<i>Mimosa scabellaa</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	6165	BR-3454
<i>Gliricidia sepium</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	6168	BR-8801
<i>Albizia falcata</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	6169	BR-5612
<i>Tipuana tipa</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	6192	SEMIA original
<i>Glycine max</i>	<i>Badyrhizobium japonicum</i>	5080*	CPAC-7
<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	4077**	UMR 1899

* Padrão de *Bradyrhizobium*; ** Padrão de *Rhizobium*

3. Testes de produção de ácido/base

Com o intuito de se observar a produção de ácido ou base pelas estirpes estas foram semeadas em placas de meio YMA contendo Azul de Bromotimol na concentração final de 25 μ g/mL do respectivo corante. O pH final dos respectivos meios de cultura foi ajustado para 6,8 e o mesmo foi submetido a esterilização a 120° C por 20 minutos. As estirpes foram repicadas em duplicata nesses meios e mantidas a 28° C, durante 10 dias. Para as estirpes produtoras de ácido, o meio se tornaria amarelo e, para as produtoras de base, ele se tornaria azul.

4. Análise de EPS

O sobrenadante de culturas crescidas em meio RDM com 9 dias de crescimento foi coletado por centrifugação (10.000 rpm, 30min. a 4° C), e disposto em um concentrador (AMICON 8400) até reduzir o volume a 25 mL e em seguida foi dializado, liofilizado, e mantido a -20° C para análise posterior. Na etapa seguinte foi realizada a hidrólise dos exopolissacarídeos onde aproximadamente, 0,5 mg das amostras foram dissolvidas em 200 μ L de ácido trifluoracético (TFA) 4 M, em tubos de hidrólise de 13 x 100 mm e selados com uma chama de um maçarico sob vácuo. Os tubos então foram incubados a 120° C, durante 2 horas.

Após o resfriamento, a temperatura ambiente, os tubos foram abertos e a solução foi evaporada em um liofilizador Hetovac Vre – 1. O resíduo foi dissolvido em 0,5 mL de isopropanol, novamente evaporado e posteriormente utilizado para a pré-derivatização (marcação química). Para a composição em monossacarídeos, as amostras foram tratadas segundo a metodologia modificada de FU e O'NEILL (1995) e a quantidade de amostra injetada foi de 40 μ L. As análises das amostras e padrões derivados 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 foi realizada através de uma coluna HRC ODS C18 (4,6 nm x 15 cm) com velocidade de fluxo constante de 0,5 mL por minuto e usando os tampões A e B, constituídos por 100mM de acetato DE AMÔNIO, pH 5,5, com 10% e 25% de acetonitrila, respectivamente, como fases móveis. O gradiente para a separação foi de 30 a 100% de B em 55 minutos. E 100-45% no intervalo de 55-65 minutos.

A quantidade de padrão injetado foi de 40 μ L. Para a construção da curva de calibração foram utilizadas as seguintes concentrações da mistura dos açúcares padrões: 6,25; 12,5; 25 e 50 μ mol. Esse ensaio foi realizado no laboratório de Bioquímica de Microrganismo e Plantas da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal.

5. Tempo de crescimento máximo das bactérias

Muitos modelos matemáticos têm sido propostos para analisar dados não lineares. Um modelo que apresenta características interessantes para essas aplicações é o modelo exponencial quadrático dado por RATKOWSKY (1989), citado por SANCHES (1997), o qual possibilita determinar o tempo máximo (horas) do crescimento das bactérias, bem como agrupar estirpes com as características semelhantes através de análise de agrupamento, segundo SNEATH e SOIKAL (1973). Um conceito fundamental a ser observado na aplicação das técnicas de agrupamento é a escolha adequada de medidas que definam a distância entre 2 objetos ou indivíduos que identifique quanto eles são similares. Esta medida é chamada de coeficiente de similaridade, usando caracteres quantitativos e qualitativos. Análise de agrupamento separa o conjunto de dados em grupos tendo a máxima homogeneidade dentro de cada grupo e a máxima heterogeneidade entre os grupos

6. Extração e Purificação do DNA das estirpes de rizóbio

Para a extração do DNA genômico das estirpes bacterianas seguiu-se o procedimento descrito por SANTINI CAMPOS (1995), com algumas modificações.

As células previamente crescidas em meio YMA e lavadas com NaCl 0,85% foram ressuspensas em 1,0 mL de solução salina-EDTA (NaCl 0,15 M, EDTA 0,01 M, pH 8,0), transferidas a tubos de vidro especial "COREX" (nº 00156 - Pirex) e incubadas a 37°C, por 10 minutos, com agitação. Após a realização da lise por digestão da parede celular, adicionou-se com o auxílio de um pipetador automático, 500 µL de uma solução de lisozima (5 mg/mL), preparada momentos antes do uso em uma solução de EDTA 10 mM; Dextrose 50 mM e Tris-HCl 24 µM, pH 8,0, incubando-se novamente a 37°C, por 30 minutos, com agitação suave. Foram adicionados 500 µL de solução SDS 20% (P/V) e após incubação a 55°C (banho-maria) por 20 minutos, com agitação ocasional, acrescentou-se lentamente 500µL de uma solução 5 M de perclorato de sódio, agitando-se suavemente o tubo. A seguir, adicionou-se 2 mL de solução fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e agitou-se por uma hora a 8°C, sendo em seguida centrifugada a 10000 rpm, por 20 minutos, a 4°C. A fase superior foi coletada e 2 mL de solução clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) foram adicionados, sendo os tubos agitados por 20 minutos a 8°C, centrifugados a 7000 rpm por 20 minutos a 4°C e a fase superior foi cuidadosamente coletada e transferida para outro tubo COREX. Repetiu-se esta última extração por mais uma vez, ou até que se conseguisse uma fase aquosa superior livre de proteínas. Adicionou-se então ao coletado, dois volumes de etanol gelado e deixou-se a -20°C durante a noite.

O DNA precipitado foi separado por centrifugação a 7000 rpm, durante 20 minutos, a 4°C, e após duas lavagens rápidas com 1 mL de etanol 70 % (V/V) em cada lavagem, os tubos foram vertidos sobre papel toalha até ser eliminado o excesso de etanol. Após secagem à temperatura ambiente e dentro do fluxo laminar, o DNA foi ressuspensado em 500 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1mM, pH 8,0).

7 . Amplificação do DNA com oligonucleotídeos correspondentes às regiões 16S rDNA e digestão dos produtos da amplificação por endonucleases de restrição (PCR-RFLP)

Os oligonucleotídeos iniciadores pA e PC5B descritos por DUNBAR et al. (1999), correspondendo a regiões conservadas do gene rDNA 16S foram utilizados para a amplificação do DNA através da técnica de PCR. As sequências dos oligonucleotídeos estão descritas abaixo:

- pA - (5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG- 3')
- PC5B - (5'- TACCTTGTTACGACTT- 3')

As condições para a reação de PCR foram as seguintes:

- Tampão de PCR 1x (Tris-HCl 20mM pH8,4 e KCl 50mM);
- 1,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen)
- 200 µM de cada dNTP (Invitrogen)
- 30 ng do DNA molde;
- 30 ng de cada oligonucleotídeo iniciador;
- 1 U de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen)
- Água milli-Q autoclavada para completar um volume final de 20 µl.

A amplificação foi realizada em um termociclador MJ Research, Inc., modelo PTC-100, utilizando os seguintes ciclos: 1 ciclo a 94°C por 2 min.; 35 ciclos (94°C por 30 segundos; 50°C por 30 segundos; 72°C por 1 minuto), 1 ciclo a 72°C por 5 min. e um ciclo final a 4°C.

Os produtos da amplificação foram examinados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, aplicando-se uma alíquota de 10 µL da reação de PCR acrescida de 3µL de tampão de amostra (azul de bromofenol + glicerol). A corrida eletroforética foi realizada em uma cuba SunRise e conduzida em tampão TBE 1x (Tris 89 mM, Ácido

Bórico 89 mM e EDTA 2,5 mM, pH 8,3), adicionado de brometo de etídio (0,5 µg/ml), durante 1 hora e 30 min. a 80 V constante. O marcador de peso molecular utilizado foi o "ladder" de 1 kb (Invitrogen)

A visualização foi realizada sob luz UV e a imagem de gel documentada em um fotodocumentador modelo GEL DOC 1000 (BIO-RAD), com a opção imagem invertida para produzir uma imagem negativa.

Alíquotas de 5 µL dos produtos de PCR foram digeridas com endonucleases de restrição (1U) como especificado pelo fabricante (Bio Lab - New England), para um volume final de 20 µL. Foram utilizadas quatro enzimas de restrição: *Taq* I (T↓CGA), *Msp* I (C↓CGG), *Hae* III (CG↓C*C) e *Dde* I (C↓TNAGG). As amostras foram digeridas a 37°C, durante 1 hora.

Após a restrição, 2 µL do tampão de carregamento (30% glicerol; 0,025% de azul de bromofenol; 250 mM EDTA) foi adicionado às amostras. O marcador de peso molecular utilizado foi o "ladder" de 1 kb (GIBCO-BRL).

O DNA digerido foi analisado por eletroforese horizontal em gel de agarose 2%. A corrida eletroforética foi realizada em uma cuba SunRise e conduzida em tampão TBE 1x (Tris 89 mM, Ácido Bórico 89 mM e EDTA 2,5 mM, pH 8,3), adicionado de brometo de etídio (0,5 µg/ml), durante 3 horas e 30 min. a 100 V constante. As imagens foram visualizados sob luz UV e documentadas em um fotodocumentador modelo GEL DOC 1000 (BIO-RAD), com a opção imagem invertida para produzir uma imagem negativa.

As imagens foram analisadas utilizando-se o programa Quantity One (BIORAD) que utiliza para a comparação dos dados o coeficiente de Dice ($2n_{ab}/n_a + n_b$) e para o agrupamento o método UPGAMA.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Rhizobium e *Bradyrhizobium* podem ser caracterizados de acordo com o crescimento em meio líquido e sólido. A forma, tamanho e textura das colônias e habilidade de alterar o pH do meio pela produção de metabólitos são características estáveis que podem definir uma estirpe. Segundo HOLT et al., (1994), o gênero *Bradyrhizobium* apresenta colônias circulares, opacas, algumas eventualmente translúcidas ou brancas e não excedem a 1-2 mm de diâmetro com 5-7 dias de incubação em meio YMA. Por sua vez o gênero *Rhizobium*, apresenta colônias com diâmetro de 2–4 mm após 3–4 dias de incubação, com grande produção de EPS.

Tais características morfológicas de colônias foram avaliadas nas estirpes em estudo neste trabalho e se encontram na Tabela 2. Analisando os resultados pôde-se observar que, quanto ao aspecto, todas as colônias são circulares e convexas e a maioria apresenta-se translúcida, apenas as estirpes SEMIA 6153, 6161, 6162 e 6165 apresentam colônias brancas e opacas.

Um aspecto importante observado foi a alta produção de goma pelas estirpes SEMIA 4077 e SEMIA 6070, uma importante característica de estirpes de *Rhizobium*. O mesmo pode ser observado quanto ao tamanho da colônia após 5 dias de cultivo, a maioria das estirpes apresentaram diâmetro de 1 a 2 mm, apenas as estirpes SEMIA 4077 e 6070 se mostraram com características de *Rhizobium* com colônias com diâmetro de 5mm.

Outra característica importante a ser analisada na caracterização de rizóbios é a capacidade de produção de ácido ou base pelas bactérias. Quanto a este aspecto pode-se observar uma diferença entre o padrão de *Rhizobium* (SEMIA 4077) e *Bradyrhizobium* (SEMIA 5080), o primeiro foi produtor de ácido e o segundo de base (tabela 2). Por outro lado, as estirpes analisadas puderam ser divididas dentro desses dois grupos: as produtoras de base (SEMIA 6159, 6160, 6164, 6192, 6161) e as produtoras de ácido (SEMIA 6169, 6069, 6070, 6153, 6162, 6165 e 6168). Não foram observadas estirpes com capacidade de não alterar o pH do meio de cultivo. Segundo dados da literatura (JORDAN, 1984; ARAÚJO,1994) *Bradyrhizobium* tendem a

alcalinizar o meio de cultura, enquanto as estirpes de crescimento rápido tendem a acidificar o meio de cultivo.

Tabela 2 – Caracterização morfológica das estirpes

Estirpes	Morfologia		Reação ácido/base/cor
	Cor da colônia	Tamanho depois de 5 dias	
4077*	Translúcida	5mm	Ácido- amarelo
5080	Translúcida	1mm	Base- azul
6159	Translúcida	1mm	Base- azul
6160	Translúcida	1mm	Base- azul
6164	Translúcida	1mm	Base- azul
6169	Translúcida	1mm	Ácido- amarelo
6192	Translúcida	1mm	Base- azul
6069	Translúcida	2mm	Ácido- amarelo
6070*	Translúcida	5mm	Ácido- amarelo
6153	Opaca	2mm	Ácido- amarelo
6161	Opaca	1mm	Base-azul
6162	Opaca	2mm	Ácido- amarelo
6165	Opaca	2mm	Ácido- amarelo
6168	Translúcida	1mm	Ácido- amarelo

*estirpes que apresentaram alta produção de goma.

Além disso, ao se avaliar o tamanho das colônias após 5 dias de crescimento pode-se verificar que existe uma variação quanto ao tempo necessário para o aparecimento de colônias em placas com meio YMA, as estirpes SEMIA 5080, 6159, 6160, 6164, 6192 e 6161 demoraram mais tempo, 4 dias ou mais para serem visualizadas, enquanto que as outras puderam ser observadas após 2 dias de cultivo. Esses resultados sugeriram que as primeiras apresentam, em meio de cultivo YMA, uma menor velocidade de crescimento quando comparadas com o outro grupo.

Desta maneira uma análise da curva de crescimento das estirpes em estudo foi feita no sentido de se verificar quais estirpes apresentam crescimento lento e quais apresentam crescimento rápido em meio YMA.

Analisando o crescimento das estirpes em meio líquido, sob agitação e temperatura controlada, pôde-se separá-las em dois grupos: o primeiro com estirpes que são caracterizadas por apresentarem crescimento lento (até um máximo de 160 unidades de kletts) e com fase exponencial de crescimento pouco acentuada (Figura 1A), estas estirpes são: SEMIA 5080, 6159, 6160, 6164, 6169, 6192 e 6165. E o segundo grupo caracterizado por apresentar estirpes com crescimento rápido (até 400 unidades de klett) e com acentuado crescimento exponencial entre 24 e 48 horas de cultivo (Figura 1B), as estirpes constituintes desse grupo são: SEMIA 4077, 6069, 6070, 6153, 6161, 6162 e 6168.

O tempo de geração (tempo necessário para se dobrar o número de células bacterianas no meio de cultivo) variou de 11 a 21 horas para as estirpes de crescimento lento e de 1 a 4 horas para as estirpes de crescimento rápido. Por outro lado, o tempo de crescimento máximo dessas estirpes foi de 7 e 6 dias, respectivamente (Apêndice A).

Todas as estirpes em estudos estão classificadas como *Bradyrhizobium* devido ao hospedeiro de que foram isoladas, leguminosas arbóreas. Entretanto, quando algumas características microbiológicas são analisadas pode-se verificar que algumas delas apresentam características dos dois gêneros, *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*.

As estirpes SEMIA 5080, 6160, 6159 e 6192 apresentaram todas as características de *Bradyrhizobium* desde os padrões de isoenzimas descritos na literatura até o tamanho e tempo de aparecimento das colônias, produção de base em meio YMA e o padrão de crescimento em meio RDM.

Por outro lado as estirpes SEMIA 4077 e 6070 mostraram características de *Rhizobium* com tempo de crescimento rápido, colônias grandes, alta produção de goma e produção de ácido em meio de cultivo.

Dentre as estirpes que apresentaram características comuns dos dois gêneros estão as estirpes SEMIA 6164, 6169, 6168, 6162, 6153, 6069, 6165 e 6161. A maioria dessas estirpes quando analisadas quanto ao tamanho das colônias em meio YMA mostraram características de *Bradyrhizobium* com colônias pequenas de até 1mm de diâmetro.

Por outro lado, apenas a estirpe SEMIA 6161 e 6164 demoraram 4 dias para ter suas colônias visíveis, sendo produtora de álcali, as outras começaram a ser visualizadas com 2 dias de cultivo e são produtoras de ácido, características de *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*, respectivamente.

Esses parâmetros analisados caracterizam alguns aspectos microbiológicos das estirpes em estudo e mostram o compartilhamento de características entre os dois gêneros de bactérias, portanto, para melhor caracterização delas deve ser utilizada outras técnicas.

A classificação de bactérias tem se baseado em características genéticas e/ou fenotípicas, onde as fenotípicas levam em consideração aspectos morfológicos, fisiológicos ou bioquímicos e no caso da família Rhizobiaceae, também na compatibilidade simbiótica com as leguminosas hospedeiras; e as genotípicas podem ser obtidas através de vários métodos tais como: relação mol% G+C, análise da seqüência de nucleotídeos (DNA e/ou rRNA); hibridização DNA-DNA e/ou RNA; perfil do polimorfismo obtido com a amplificação ao acaso do DNA (RADP) ou dos fragmentos de restrição (RFLP); perfil obtido com seqüências repetitivas no genoma (REP e ERIC) e etc.

A classificação oficial do gênero *Bradyrhizobium* como se encontra no Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (JORDAN, 1984) considera somente características fenotípicas e a relação mol% G + C, entretanto, o subcomitê de taxonomia de Rhizobiacea (GRAHAM et al., 1991) propôs que um conjunto mínimo de metodologias padronizadas deveriam ser executadas para a descrição de um novo gênero ou espécie. Assim, seria desejável que fossem analisadas pelo menos três características genotípicas; três características fenotípicas e uma característica mista das duas.

Como neste estudo foram observadas bactérias com características dos dois gêneros, outras metodologias de análise foram avaliadas para melhor se caracterizar essas estirpes.

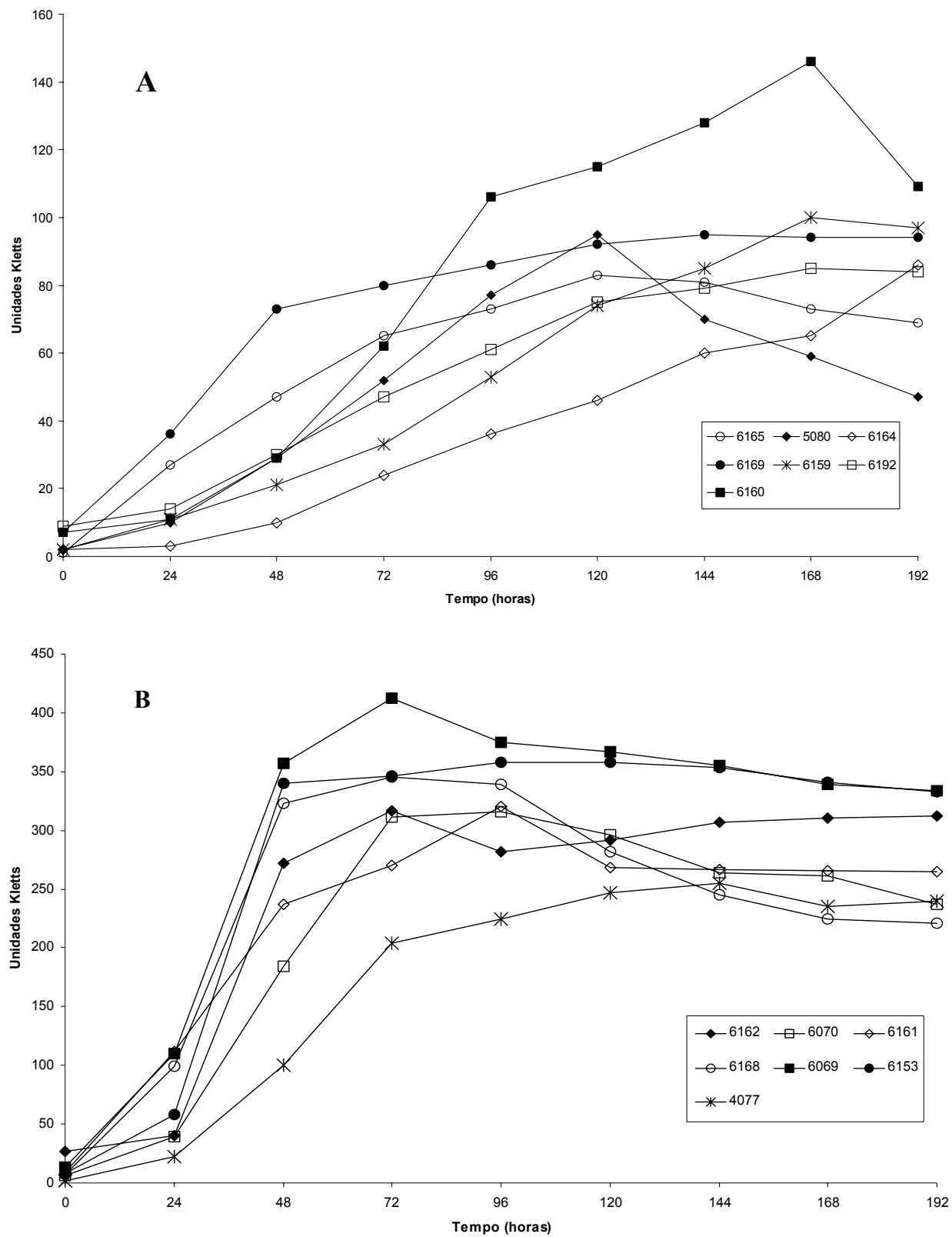


Figura 1- Curvas de crescimento de estirpes de rizóbios

ARAÚJO (1994) descreve a grande capacidade das bactérias do gênero *Rhizobium* em produzir EPS. Estas, quando cultivadas, podem fazer com que esse material pingue na tampa das placas quando essas são invertidas. A Tabela 3 mostra a análise da composição e teor total dos EPSs das 14 estirpes obtidas através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os resultados revelam que os EPSs dessas estirpes têm em sua composição os monossacarídeos manose, ramnose, ácido galacturônico, glicose e galactose em diferentes concentrações. Os cromatogramas se encontram no Apêndice P.

Quanto ao teor total de açúcares encontrado no EPS das estirpes pela análise por CLAE pode ser verificado que existe três grupos de bactérias: aquelas que produzem baixa quantidade de EPS (3,63 a 38,10 $\mu\text{mol/mL}$) constituídas pelas estirpes SEMIA 5080, 6159, 6160 e 6165; outro grupo que produz alta quantidade (101,89 a 286,95 $\mu\text{mol/mL}$), constituído pelas estirpes SEMIA 4077, 6169, 6192, 6070, 6153 e 6168; e um terceiro grupo com produção intermediária de EPS (59,96 a 90,33 $\mu\text{mol/mL}$), onde aparecem as estirpes SEMIA 6164, 6069, 6161 e 6162.

Esses resultados não estão de acordo com dados de literatura que mostram alta produção de EPS para bactérias fixadoras de nitrogênio que apresentam crescimento rápido. As estirpes deste trabalho que apresentam crescimento rápido são as estirpes SEMIA 4077, 6168, 6162, 6153, 6069, 6070 e 6161; por outro lado as estirpes que produzem maior quantidade de EPS são SEMIA 4077, 6168, 6153, 6070, 6169 e 6192, portanto, pode-se observar que as duas últimas estirpes (SEMIA 6169 e 6192) apesar de apresentarem quantidades elevadas de EPS (característica de *Rhizobium*) apresentam crescimento característico de *Bradyrhizobium*. Contrariamente, a estirpe SEMIA 6069 apresenta características microbiológicas de *Rhizobium*, mas se mostra baixa produtora de EPS.

Quanto à análise qualitativa dos açúcares constituintes do EPS, pode ser observado, que as estirpes SEMIA 6165, 6169, 6069, 6070 e 6153 apresentaram a mesma composição em açúcares que a estirpe padrão de *Rhizobium* SEMIA 4077, entretanto, a estirpe SEMIA 6153 diferenciou-se por apresentar uma quantidade muito maior de glicose enquanto que a 6165 apresentou teores baixos de todos esses açúcares.

Tabela 3 - Composição molar de EPS de estirpes de Rizóbios e Bradirrizóbios ($\mu\text{mol/mL}$).

Estirpes	Açúcares					Total de açúcares
	Manose	Ramnose	Ac. Galac.	Glicose	Galactose	
4077	4,68	1,17	1,31	82,06	85,99	175,21
5080	5,90	-	-	21,40	10,80	38,10
6159	-	23,40	0,92	1,10	-	25,42
6160	-	4,1	-	10,30	-	14,40
6164	2,18	-	26,12	43,70	8,54	80,54
6169	0,43	2,02	0,55	40,18	85,54	128,72
6192	30,38	1,99	-	55,26	14,26	101,89
6069	2,42	6,80	0,63	47,02	3,09	59,96
6070	0,40	1,58	0,15	121,22	40,69	164,04
6153	0,35	0,06	65,96	145,07	75,51	286,95
6161	6,51	-	-	83,82	-	90,33
6162	0,67	-	8,79	64,95	8,29	82,70
6165	0,64	1,11	0,11	1,25	0,52	3,63
6168	1,06	2,87	-	128,04	55,81	187,78

Por outro lado, o EPS das estirpes SEMIA 6192 e 6168 apresentou-se constituído de manose, ramnose, glicose e galactose, mas a diferença mais significativa entre elas foi a grande concentração de manose na primeira e de glicose na segunda. Essa mesma diferença quantitativa em açúcares pode ser observada entre a estirpes SEMIA 6164 e 6162, ambas apresentaram EPS constituído de manose, ácido galacturônico, glicose e galactose, sendo que a estirpes SEMIA 6164 apresentou teor maior de manose e ácido galacturônico que a outra estirpe, a qual teve, por sua vez, maior quantidade de glicose.

As estirpes SEMIA 6159 e 6160 não apresentaram manose nem galactose em seus EPSs e, além disso, a estirpe SEMIA 6159 caracteristicamente, mostrou conter grande quantidade de ramnose em sua constituição. Por outro lado a estirpe SEMIA 6161 se diferenciou da SEMIA 5080 pela ausência de galactose e grande teor de glicose que constitui seu EPS.

Como relatado por MORT e BAUER (1982) e por HUBER et al. (1984) dentro da espécie de *Bradyrhizobium japonicum* foi descrito dois tipos de EPS quanto à sua constituição, o tipo A é constituído por glicose, manose, galactose, ácido galacturônico e 4-O-metil galactose, e o tipo B apresenta estrutura de EPS constituída de ramnose e ácido galacturônico. Segundo os resultados observados neste trabalho, apenas as estirpes SEMIA 5080, 6164 e 6162 poderiam ser consideradas como contendo EPS do tipo A, mesmo não tendo sido detectado a presença de ácido galacturônico na primeira, as outras estirpes apresentaram uma mistura de açúcares não característico e que sugerem a existência de outros padrões de EPS, como anteriormente proposto por NICOLÁS (1996).

Tendo em vista as dificuldades encontradas até o presente para se caracterizar as estirpes de *Bradyrhizobium* em estudo passou-se a análise das bactérias por técnicas moleculares.

LAGUERRE et al. (1994) mostraram que a utilização de um método de análise por PCR-RFLP resultava na rápida identificação de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Agrobacterium*. Neste método, oligonucleotídeos iniciadores correspondente ao gene DNA ribossomal 16S, fD1 e rD1, (WEISBURG et al., 1991), foram usadas para a amplificação do DNA. Os produtos obtidos por PCR foram tratados com endonucleases de restrição e observados em gel de agarose. Essa técnica permitiu a diferenciação de 48 estirpes representantes dos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Agrobacterium*.

Estudos similares foram realizados por VINUESA et al. (1998) na caracterização genotípica de estirpes de *Bradyrhizobium* e mostraram uma grande diversidade entre essas bactérias. Tendo em vista esses dados da literatura, neste trabalho foram realizados PCRs do DNA das estirpes através do uso de oligonucleotídeos específicos para a região do DNA do RNA ribossomal 16S e o produto da PCR foi tratado com endonuclease de restrição (PCR-RFLP) para posterior análise dos fragmentos.

Os resultados da PCR se encontram na Figura 2 que mostra a presença de uma banda única com 1500 pb, característica da amplificação do DNA de uma região do 16S RNA.

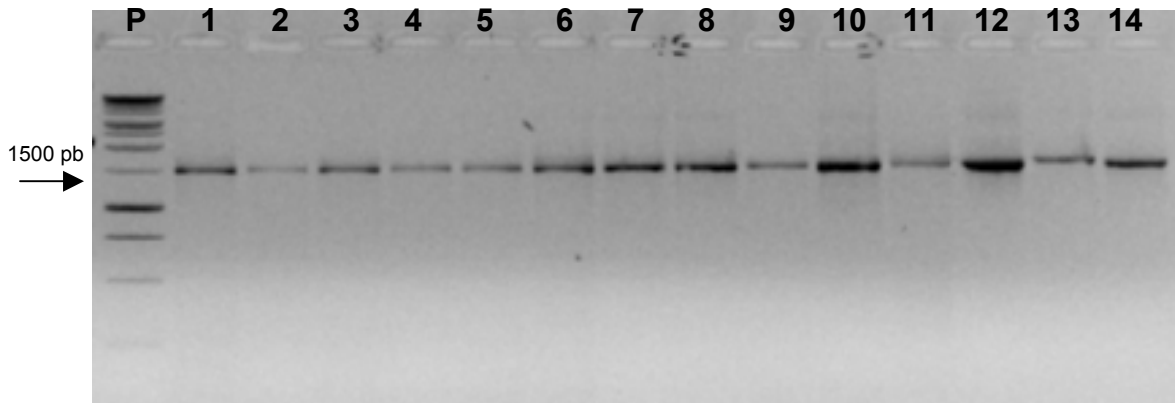


Figura 2 – EGA-BE (Eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo) de produtos da PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores pA e PC5B com o DNA genômico das estirpes (1) SEMIA 5080, (2) SEMIA 6159, (3) SEMIA 6160, (4) SEMIA 6164, (5) SEMIA 6169, (6) SEMIA 6192, (7) SEMIA 4077, (8) SEMIA 6069, (9) SEMIA 6070, (10) SEMIA 6153, (11) SEMIA 6161, (12) SEMIA 6162, (13) SEMIA 6165, (14) SEMIA 6168. (P) padrão de DNA.

Após o tratamento dos produtos de PCR com as endonucleases de restrição as enzimas *MspI*, *HaeIII*, *TaqI* e *DdeI*, os fragmentos obtidos e observados por eletroforese em gel de agarose foram analisados e agrupados fornecendo o dendrograma mostrado na Figura 3.

Como pode ser observado o uso dessa metodologia proporcionou a separação das estirpes em dois grupos com aproximadamente 60% de similaridade. O primeiro grupo (A) está constituído pelas estirpes SEMIA 6161, 6159, 5080, 6192 e 6160; e o segundo (B) pelas estirpes SEMIA 6168, 6165, 6070, 4077, 6069, 6164, 6153, 6162 e 6169.

As estirpes padrão de *Bradyrhizobium* SEMIA 5080 e a de *Rhizobium* SEMIA 4077 encontram-se separadas cada uma em um dos grupos, portanto esses resultados apresentam concordância com os obtidos por LAGUERRE et al. (1994) que, pela análise das estirpes por PCR-RFLP, conseguiu a identificação de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Agrobacterium*.

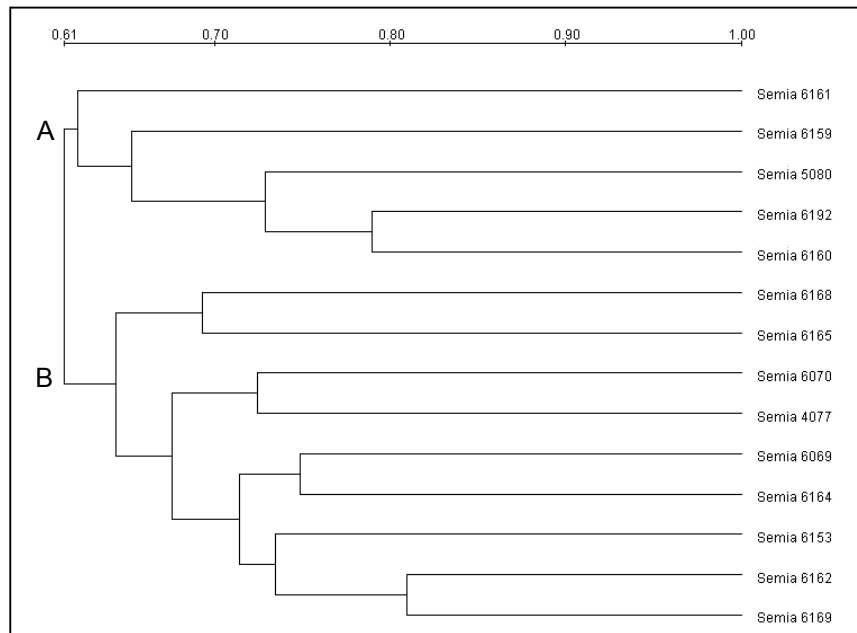


Figura 3 – Dendrograma obtido pela análise das bandas dos produtos da PCR após o tratamento com as endonucleases de restrição. Método de agrupamento UPGAMA.

Os dados observados com relação às outras estirpes podem, então, sugerir que as estirpes que se encontram no grupo A pertençam ao gênero *Bradyrhizobium* e as outras ao gênero *Rhizobium*. Entretanto, dentro de cada grupo, pode ser observado que algumas estirpes possuem uma mistura de característica de cada gênero. A Tabela 5 mostra um resumo das características observadas de cada estirpe como: o tamanho da colônia (dado em mm de diâmetro após 5 dias de cultivo em meio YMA); a produção de ácido (a) ou álcali (b) em meio YMA contendo azul de bromotimol; o crescimento lento (l) ou rápido (r) em meio YML; a composição total de açúcares observada por CLAE e o grupo proporcionado pela análise dos fragmentos obtidos por PCR-RFLP do DNA do 16S rRNA.

Tabela 5 - Resumo das características microbiológicas, de produção de EPS e grupo determinado por PCR-RFLP do 16S rDNA de cada estirpe estudada.

Estirpe (SEMIA)	Tamanho da colônia (mm)	Produção de ácido/base	Crescimento em meio líquido	Composição total de açúcares do EPS ($\mu\text{mol/mL}$)	Grupo PCR-RFLP rDNA 16S
4077	5	a	r	175	B
5080	1	b	l	38 (A)*	A
6159	1	b	l	25	A
6160	1	b	l	14	A
6164	1	b	l	80 (A)	B
6169	2	a	l	128	B
6192	2	b	l	101	A
6069	1	a	r	59	B
6070	5	a	r	164	B
6153	2	a	r	286	B
6161	1	b	r	90	A
6162	2	a	r	82 (A)	B
6165	2	a	l	3	B
6168	1	a	r	187	B

*Classificação segundo MORT& BAUER (1982) e por HUBER et al. (1984) em EPS do Tipo A e B.

Essas características quando analisadas em conjunto com os dados de literatura que classificam as estirpes como pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* (B) ou *Rhizobium* (R) estão expressas na Tabela 6. Essa avaliação mostra que as estirpes SEMIA 5080 e 6160 e SEMIA 4077 e 6070 apresentaram todas as características avaliadas como sendo dos gêneros *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*, respectivamente, entretanto, pode-se observar que pode haver mistura de características entre as estirpes. O grupo formado pelas estirpes SEMIA 6159, 6192 e 6164 apresentou predominância das características de *Bradyrhizobium*, enquanto que, aquele formado pelas estirpes SEMIA 6069, 6162 e 6168 mostrou-se preponderantemente com características de bactérias do gênero *Rhizobium*. Por outro lado, o grupo formado pelas estirpes 6169, 6161 e 6165 apresenta uma equivalência entre as características dos gêneros *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*.

Tabela 6 – Resumo da classificação das estirpes como pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* (B) ou *Rhizobium* (R) de acordo com a característica estudada.

Estirpe (SEMIA)	Tamanho da colônia	Produção de ácido/base	Crescimento em meio líquido	Composição total de açúcares do EPS	Grupo PCR-RFLP rDNA 16S	Perfil isoenzimas*
5080	B	B	B	B	B	B
6160	B	B	B	B	B	B
4077	R	R	R	R	R	R
6070	R	R	R	R	R	R
6159	B	R	B	B	B	B
6192	B	B	B	R	B	B
6164	B	B	B	R	R	B
6169	B	R	B	R	R	B
6161	B	B	R	R	B	R
6165	B	R	B	B	R	R
6069	B	R	R	B	R	R
6153	B	R	R	R	R	R
6162	B	R	R	R	R	R
6168	B	R	R	R	R	R

*SOD e G6P desidrogenase, Bento, M.C. (comunicação pessoal)

V. CONCLUSÕES

Tendo por base os resultados obtidos neste trabalho, pôde-se observar:

1. Quando foram feitas as análises morfológicas das estirpes foim possível separá-las em 2 grupos: as produtoras de ácido e as produtoras de álcali, bem como as de crescimento rápido e lento;
2. O tempo de geração variou de 11 a 21 horas para as estirpes de crescimento lento e de 1 a 4 horas para as estirpes de crescimento rápido;
3. Quanto ao teor total de açúcares encontrado no EPS pode ser verificado que existem três grupos de bactérias: aquelas que produzem baixa quantidade de EPS, constituídas pelas estirpes SEMIA 5080, 6159, 6160 e 6165; outro grupo que produz alta quantidade, constituído pelas estirpes SEMIA 4077, 6169, 6192, 6070, 6153 e 6168 e um terceiro grupo com produção intermediária de EPS onde aparecem as estirpes SEMIA 6164, 6069, 6161 e 6162;
4. Através da análise por PCR-RFLP da região do rDNA 16S as estirpes puderam ser separadas em dois grupos com aproximadamente 60% de similaridade. O primeiro grupo (A) está constituído pelas estirpes SEMIA 6161, 6159, 5080, 6192 e 6160; e o segundo (B) pelas estirpes SEMIA 6168, 6165, 6070, 4077, 6069, 6164, 6153, 6162 e 6169;
5. Concluiu-se que técnicas moleculares são mais precisas, mas para a avaliações de relações filogenéticas outros estudos, incluindo outras espécies de rizóbios, devem ser realizados.

VI. REFERÊNCIAS

AMANN, R. I.; LUDWING, W.; SCHLEIFER, K-H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiology Review** , v.59, n.1, p.143-169, 1995.

ANDREANI, D. I. K. Isolamento e caracterização de populações heterogêneas e mutantes espontâneos de duas estirpes de *Bradyrhizobium* spp. Dissertação de mestrado (Área de concentração em melhoramento genético vegetal), FCAV-UNESP, Jaboticabal. SP, 1992, 125p.

ARAÚJO, S.R. Caracterização morfológica, fisiológica e bioquímica do Rizóbio. In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, S.R. (Ed). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: EMBRAPA, 1994. cap.7, p.157-170.

BALDANE, I, J.; WEAVER, R. W.; HYNES, M. F.; EARLY, B. D.. Utilization of carbone substrates, electroforetic enzyme patterns, and symbiotic performance of plasmid-cured clover rhizobia. **Applied Environment Microbiology**, v.58, p.2308-2314, 1992.

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**, v.57, p.542-46, 1976.

BREWEN, N. J. Development of legume root nodule. **Anual Review Cell Biology**, v.7, p. 191 - 226, 1991

BRUIJN, F.J. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergenic consensus) sequences and the chain reaction to fingerprinting the genome of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. **Applied Environment Microbiology**, v.58, p.2180-2187, 1992.

CANN, D.C.; WILLOX, M. E. Analysis of multimolecular enzymes as an aid to identification of certain rapidly growing mycobacteria using starch-gel electrophoresis. **Journal Bacteriology**, v.28, p.165-169, 1965.

CARARETO ALVES, L.M.; LEMOS, E.G.M. Use of lipopolysaccharides for immunological characterization of *Bradyrhizobium* sp. **Soil Biol Biochemistry**, v.28, n.9, p.1227-1234, 1996.

CARRION, M.; BHAT, U. R.; REUHS, B., CARLSON, R. W. Isolation and characterization of the lipopolysaccharides from *Bradyrhizobium japonicum*. **Journal Bacteriology**, v.172, p.1725-1731, 1990.

CHEM, S. L. Genetic Characterization of Soybean Rhizobia in Paraguai. **Applied Environmental Microbiology**, v.66, p.5099-5103, 2000.

CHEN, W. .X.; YANG, G. H.; LI, J. L. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**. Washington, v.38, p.393-397, 1988.

COSTERTON, J. W. Bacterial biofilms in nature and disease. **Annual Review of Microbiology**, v.41, p.435 - 464, 1987.

DEMEZAS, D. H.; REARDON, T. B.; WATSON, J. M.; GIBSON, A.H. Genetic diversity among *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* strains revealed by allozyme and restriction fragment length polymorphism analyses. **Applied Environment Microbiology**, v.57, p.3489-3495, 1991.

DENNY, T.P. Testing pathogenicity. In: WILLIAMS, P.; KETLEY, J.; SALMOND, G. **Bacterial pathogenesis: methods in microbiology**. London: Academic Press, v. 27, p.129-271, 1995.

DREYFUS, B.; GARCIA, J. L.; GILLIS, M. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov, a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. **International Journal of Systematic Bacteriology**. Washington, v.38, p.89-98, 1988.

DUMBAR, J.; TAKALA, S.; BARNS, M. S.; DAVIS, A. J.; KUSKE, R. C. Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.4, p.1662-1669, 1999

ENGVILD, K. C.; JENSES, E.S.; SKOT, L. Parallel variation in isozyme and nitrogen fixation markers in a *Rhizobium* population. **Plant and Soil**, v.128, p.283-296, 1990.

FOTRELL, P.F.; O'HARA, A. Multiple forms of D(-)3-hydroxybutyrate dehydrogenase in *Rhizobium*. **Journal General Microbiology**, v.57, p.287-292, 1969.

FU, D.; O'NEILL, R.A. Monosaccharide composition analysis oligosaccharides and glycoproteins by high-performance liquid chromatography. **Analytical Biochemistry**, v.227, p.377-384, 1995.

GILLER, K. E.; WILSON, K. J. **Nitrogen fixation in cropping systems**. Wallingford: C. A. B. International, 1991. 313p.

GLENN, A.R. Sugar metabolism and the symbiotic properties of carbohydrate mutants of *Rhizobium leguminosarum*. **Journal General Microbiology**, v.130, p. 239-245, 1984.

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

HOGAN, M.A.; COLWELL, R.R. DNA base composition and esterase patterns of bacteria isolated from deep sea sediments. **Journal Applied Bacteriology**, v.32, p.103-108, 1969.

HOLLIS, A.B., KLOOS, W.E., ELKAN, G.H. DNA:DNA hybridization studies of *Rhizobium japonicum* and related rhizobiaceae. **Journal General Microbiology**, v. 123, p. 215-222, 1981

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9ed. Baltimore: Willians & Willians, 1994.p.78-94.

HERNANDES, S. B.; FOCHT, D. D. Invality of concept of slow growth and alkali production in cowpea Rhizobia. **Apllied and Environmental Microbiology**, n.1, v.48, p.206-210, 1984.

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**, v.158, p.1168-1171, 1984.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T.; ARAÚJO, S. R. (1997) Fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro. In: VARGAS, M.A.T., HUNGRIA, M. (eds.). *Biologia dos solos dos Cerrados*. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, p.189-294.

JORDAN, D. C. Family III. Rhizobiaceae Conn 1938. In: KRIEG, N.R.; HORT, J. G. (Ed). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Willians Wilkins,1984. p.235-244.

JUDD, A. K.; SADOWSKY, M.J. The Bradyrhizobium japonicum serocluster 123 hyperreiterated DNA region, HRS1, HAS DNA and amino acid sequence homology to is 1380, an insertion sequence from *Acetobacter pasteuranus pasteuranus*. **Applied Environmental Microbiology**, v.59, p.1656-1661, 1993.

KAY, H.E.; COUTINHO, H. L. C.; FATTORI, M.; MANFIO, G. P.; GOODACRE, R.; NUTI, M.P.; BASAGLIA, M.; BERINGER, J. E. The identification of Bradyrhizobium japonicum strains isolated from italian solis. **Microbiology**, v.140, p.2333-2339, 1994.

KOZUSNY-ANDREANI, D.I., **Descrição de um marcador endógeno em *Bradrizobium elkani* para uso em estudos ecológicos**. 1997, 125p. Tese (Doutorado em Agronomia-em Produção Vegetal)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Universidade Estadual Paulista , Jaboticabal.

KUYKENDALL, L.D. et al. Fatty acids, antibiotic resistance and deoxyrribonucleic acid homology groups of Bradyrhizobium japonicum. . **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.38, p.358-361, 1992.

LEIGH, J. A.; COPLIN, D. L. Exopolysacharides in plant-bacterial interactions. **Annual Review of Microbiology**, v.46, p.307-346, 1992.

LAGUERRE, G.;ALLARD, M. R.; REVOY, F.; AMARGER, N. Rapid identification of Rhizobia by restriction fragment length polymorphis analysis of PCR- amplified 16S rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, n.1, p.56-63, 1994.

LEMOS, E.G. M. **Classificação de bradirrizóbios que nodulam soja por análise de padrões isoenzimáticos, sorologia, morfologia de colônias e atividades de hidrogenase.** 1994. 108f. Tese (Livre Docência) - FCAV, UNESP, Jaboticabal.

LINDSTRÖM, K.; van BERKUM, P.; GILLIS, M.; MARTÍNEZ, E.; NOVIKOVA, N.; JARVIS, B. Report from the roundtable on rhizobium taxonomy. In: TIKHONOVICK, I.A. PROVOROV, N. A.; ROMANOV, V. I.; NEWTON, W. E, EDS..**Nitrogen fixation: fundamentals and applications.** Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. p.807-810.

LUND, B.M. A comparison by use of gel electrophoresis of soluble protein components and esterase enzymes of some group D streptococci. **Journal General Microbiology**, v.40, p.413-417, 1965.

MARTINEZ-ROMERO, E. Recent developements in Rhizobium taxonomy. **Plant Soil**, v.161, p.11-20, 1994.

MINAMISAWA, K. Comparasion of extracellular polysaccharide composition, rhizobitoxine production, and hydrogenase phenotype among various strains of *Bradyrhizobium japonicum*. **Plant Cell Physiology**, v.30, p.877-884, 1989.

MINAMISAWA, K.; SEKI, T.; ONODERA, S.; KUBOTA, M.; ASAMI, T. Genetic relatedness of *Bradyrhizobium japonicum* field isolates as revealed by repeated sequences and various other characteristics. **Applied Environmental Microbiology**, v.58, n.9, p.2832-2839, 1992.

MPEPEREKI, S.; WOLLUM II, A. G. Diversity of indigenous *Bradrhizobium japonicum* in North Carolina soil. **Biology Fertil Soils**, v.11, p.121-127, 1991.

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.

MURPHY, P. M.; MASTERSSON, C.L. Determination of multiple forms of esterases in *Rhizobium* by paper electrophoresis. **Journal General Microbiology**, v.61, p. 121-129,1970.

NAKAYAMA, Y.; TAKEYA, K. Esterase zymogram method for classifying mycobacteria. **Nature**, v.213, p.504-506, 1987.

NICOLÁS, M. F. **Comparação da composição de polissacarídeos extracelulares em estirpes de *Bradyrhizobium* por HPLC**. 1996. 84 f.. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

NORIS, J. R. The classification of *Bacillus thuringensis*. **Journal Applied Bacteriology**, v.27, p.429-442, 1964.

OTOBONI, A.M.M.B. **Determinação da composição dos exopolissacarídeos em diferentes isolados de *Xylella fastidiosa* por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**, 2001. 82f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

PADMANABHAN, S.; HIRTZ, R.D.; BROUGHTON, W. J. Rhizobia in tropical legumes: Cultural characteristics of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* ssp. **Soil Biochemistry**, v.22, n.1, p.23-28, 1990.

PEREIRA, R.M. **Caracterização bioquímica e molecular de Bradirrizóbios recomendados para inoculação em leguminosas forrageiras de clima tropical**, 2000. 76f monografia (trabalho de graduação em agronomia)- Universidade Estadual Paulista.

PLAZINSKI, J.; CEN, Y.H.; ROLFE, B.G. General method for the identificação of plasmid species in fast growing soil microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.48, n.4, p. 1001-1003, 1985.

PRADO, A. L. **Caracterização de rizóbios recomendados para inoculação de leguminosas de grãos e para adubação verde no Brasil**, 2000, 125f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

RATKOWSKY, D.A. **Handbook of nonlinear regression models**. New York: Marcel Dekker, 1989. 241p.

RUMJANEK, N. G.; DOBERT, R.C.; VANBERKUM, P.; TRIPLETT, E. W. Common soybean inoculants strains in Brazil a members of *Bradyrhizobium elkanii*. **Appl. Environ. Microbiology**, v.59, p. 4371-4373, 1993.

SANCHES, A. **Modelos empíricos de produção para a determinação de níveis ótimos de nutrientes em experimentos de adubação**. 1997.120f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

SANTINI CAMPOS, M.H. **Produção de dextranas e aspectos moleculares de *Leuconostoc mesenteroid***. Piracicaba, 1995. Dissertação (Mestrado. em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, Universidade de São Paulo.

SCOTTI, M. R. M. M. L.; SÁ, N. M. H.; VARGAS, M. A. T.; DÖBEREINER, J. Streptomycin resistance of *Rhizobium* isolates from Brazilian cerrados. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, v.54, p.733-7338, 1982.

SEGOVIA, E. L.; PIÑERO, D.; PALACIOS, R.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Genetic structure of a soil population of nonsymbiotic *Rhizobium leguminosarum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n.2, p. 426-433, 1991.

SELENSKA-POBELL, S; GIGOVA L.; PETROVA, N. Strain-specific fingerprints of *Rhizobium galegae* generated by PCR with arbitrary and repetitive. **Journal Applied Bacteriology**, v.79, p.425-431, 1995.

SINDHU, S. S.; BREWIN, N. J.; KANNENBERG, E. L. Immunochemical analysis of lipopolysaccharides from free-living and endosymbiotic forms of *Rhizobium leguminosarum*. **Journal of Bacteriology**, v.172, n.4, p.1804-1813, 1990.

SNEATH, P.H.A.; SOIKAL, R.R. Numerical taxonomy. San Francisco – USA. W.H. **Freeman CO.**, 1973, 573F.

SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H.J. **Handbook for rhizobia**: methods in legume *Rhizobium* technology. Paia: Niftal Project, 1984. 450p.

STORWERS, M.D.; EAGLESHAM, A.R.F. Astem nodulating *Rhizobium* with physiological characteristics of both fast and slow growers. **Journal of General Microbiology**. V.129,p.3651-3655, 1984.

SUTHERLAND, I. W. Bacterial surface polysaccharides structure and function. **International Review of Cytology**, v.113, p.187-231, 1988.

URENHA, L.C.; PRADELLA J.G.C.; OLIVEIRA, M.S.; BONOMI, A. Produção de biomassa celular de Rizóbio. In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, S. R. (Ed). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: EMBRAPA, p.95-137,1994.

VAN ROSSUM, D.; SCHUURMANS,F.P.; GILLIS, M. General and phenologic analyses of Bradyrhizobium strains nodulating peanut (*Arachis hypogea* L.) roots. **Applied Environment Microbiology**, v.61, p.1559-1609, 1995.

VICARI, M.C. **Caracterização, marcação genético-molecular e avaliação do comportamento simbiótico de estirpes de Rhizobium meliloti** ,1999, 94f, Tese (Doutorado em Agronomia - Área de Concentração em Ecologia e Recursos Naturais) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific , 1970. 20p. (IBP Handbook, 15).

VINUESA, P.; RADEMAKER, W. L. J.; BRUIJN, J. F.; WERNER, D. Genotypic characterization of Bradyrhizobium strains nodulating endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of genes encoding 16S rRNA (16S Rdna) and 16S-23S Rdna Intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genome fingerprinting, and partial 16S rDNA sequencing. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 2096-2104, 1998.

WEISBURG, W. G.; BARNS, M. S.; PELLETIER, A.D.; LANE, J. D. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenic study. **Journal Bacteriology**, v.173, p.697-703, 1991.

WHITFIELD, C. Bacterial extracellular polysaccharides. **Canadian Journal Microbiology**, v.34, p.415-420, 1988.

WOESE, C. R. Bacterial Evolution. **Microbiology Review**, v.51, p.221-271, 1987.

YELTON, M.M.; YANG, S.S.; EDIE, S.A.; LIM, S.T. Characterization of na effective salt-tolerant, fast growing strain to Rhizobium japonicum. **Journal of General Microbiology**, v.129, n.5, p.1537-1547, 1983.

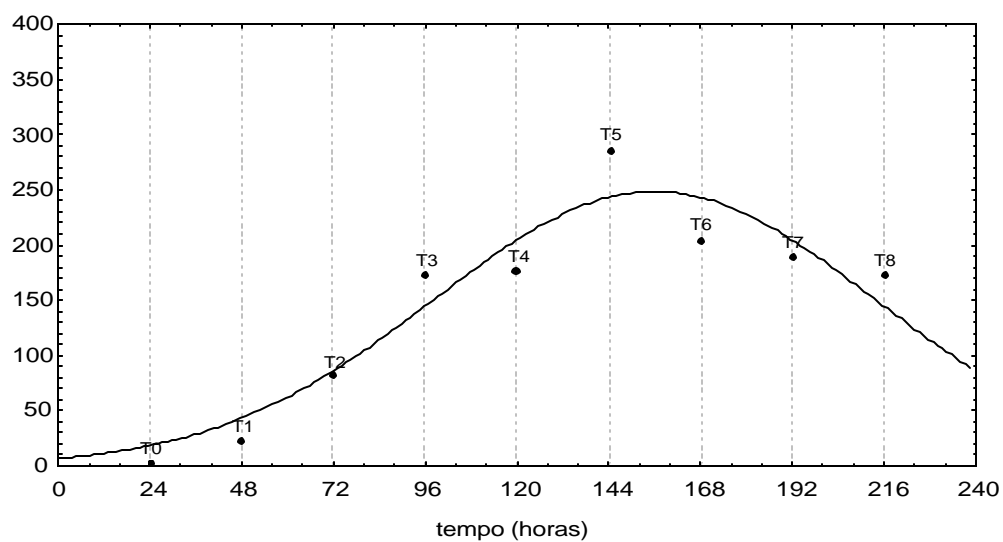
YOUNG, J. P. W.; DOWNER, H. L.; EARLY, B. D. Phylogeny of the phototrophic Rhizobium strains BTAi1 by polymerase chain reaction based sequencing of a 16s r RNA gene segment. **Journal bacteriology**, v.173, n.7, p.2271-2277, 1991.

APÊNDICE(S)

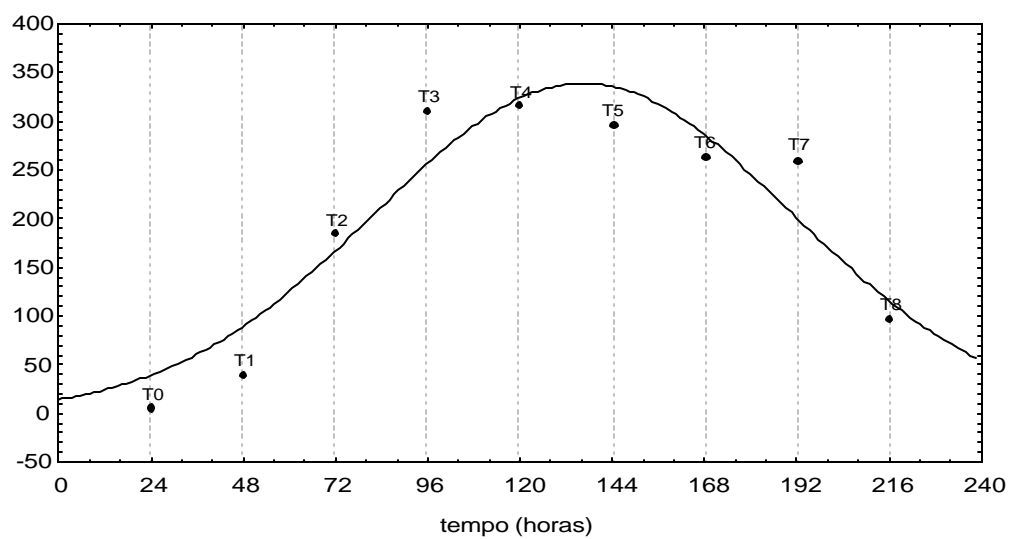
APÊNDICE A - Dados obtidos usando um modelo exponencial quadrático que permitiu obter um coeficiente de determinação (R^2) muito próximo a 1, permitindo avaliar o crescimento das estirpes com maior credibilidade.

ESTIRPE	MODELO	R^2	PARÂMETROS			C.M.H. ¹
			A	B	C	
GRUPO I	4077	$e^{1,846226+0,0469506x-0,0001502x^2}$	0,9010	1,84622 6	0,0469506 0,0001502	- 144
	6070	$e^{2,641124+0,0465751x-0,0001703x^2}$	0,8887	2,64112 4	0,0465751 0,0001703	- 144
	6153	$e^{3,86001+0,0267767x-0,0000904x^2}$	0,7616	3,86001 0	0,0277672 0,0000904	- 144
	6069	$e^{4,116723+0,0261539x-0,0000892x^2}$	0,7376	4,11672 3	0,0261539 0,0000892	- 144
	6168	$e^{3,86252+0,0301556x-0,0001153x^2}$	0,6945	3,86252 0	0,0301556 0,0001153	- 144
	6161	$e^{3,85102+0,0249474x-0,0000823x^2}$	0,8027	3,85102 0	0,0249474 0,0000823	- 144
	6162	$e^{3,850117+0,2242747x-0,0000745x^2}$	0,7499	3,85017 0	0,0242747 0,0000745	- 144
	6160	$e^{0,794444+0,0472802x-0,0001349x^2}$	0,9760	0,79444 4	0,0472802 0,0001349	- 168
GRUPO II	6169	$e^{2,76677+0,0221153x-0,0000662x^2}$	0,8856	2,76677 0	0,0221153 0,0000662	- 168
	6192	$e^{1,676335+0,029494x-0,0000783x^2}$	0,9916	1,67633 5	0,029494 0,0000783	- 168
	6159	$e^{0,5494814+0,0405567x-0,0001015x^2}$	0,9965	0,54948 1	0,0405567 0,0001015	- 168
	6164	$e^{0,668483+0,0309597x-0,0000633x^2}$	0,9821	0,66848 3	0,0309597 0,0000633	- 168
	5080	$e^{0,3790255+0,0550829x-0,0001854x^2}$	0,9586	0,37902 5	0,0550829 0,0001854	- 168
	6165	$e^{2,01845+0,0307031x-0,0000969x^2}$	0,9440	2,01845 0	0,0307031 0,0000969	- 168

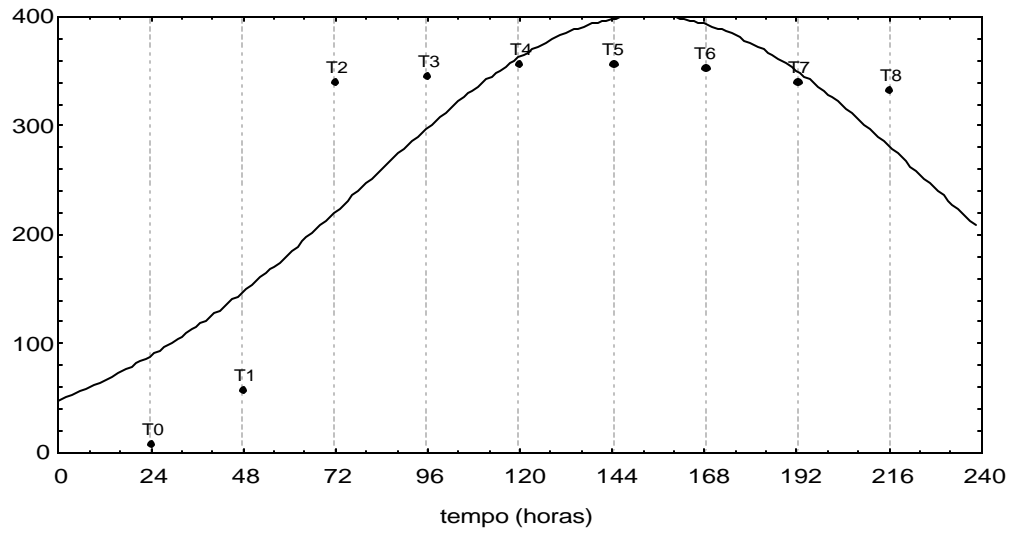
Obs.: ¹C.M.H. : crescimento máximo em horas.



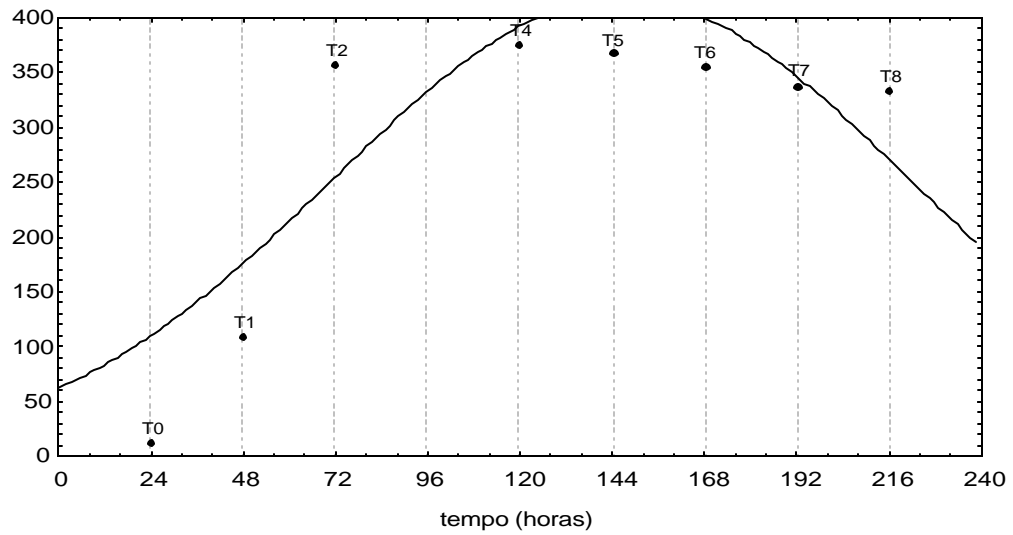
APÊNDICE B - Estirpe 4077



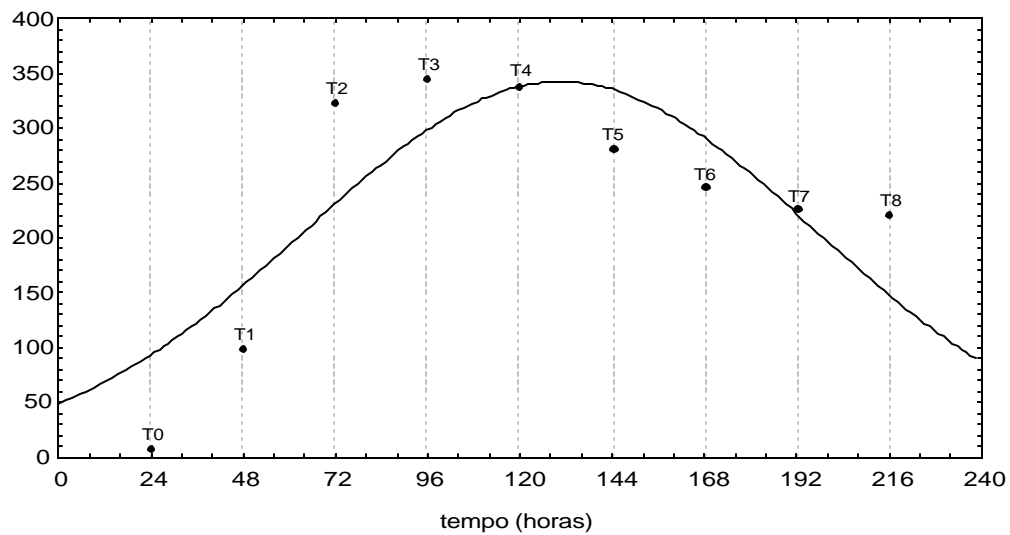
APÊNDICE C - Estirpe 6070



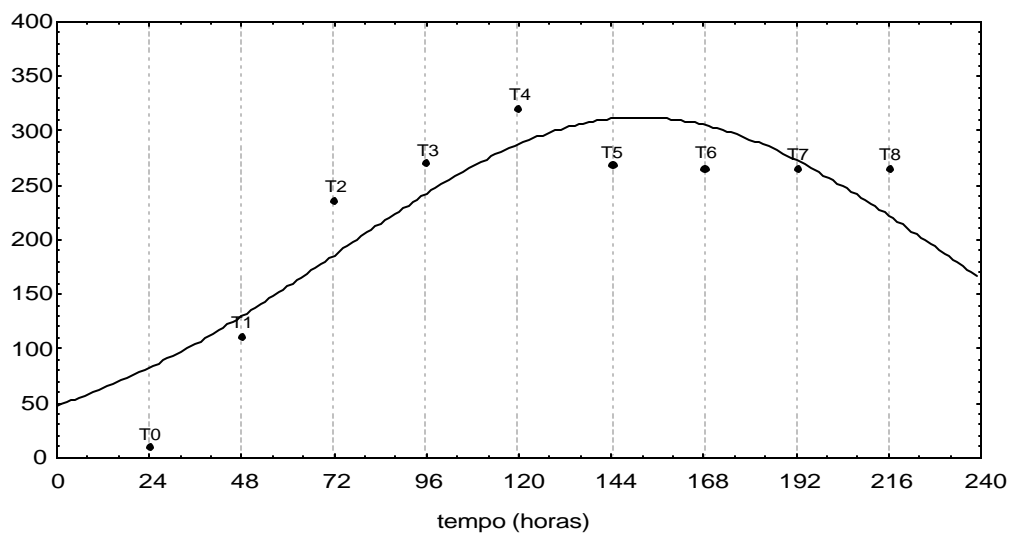
APÊNDICE D - Estirpe 6153



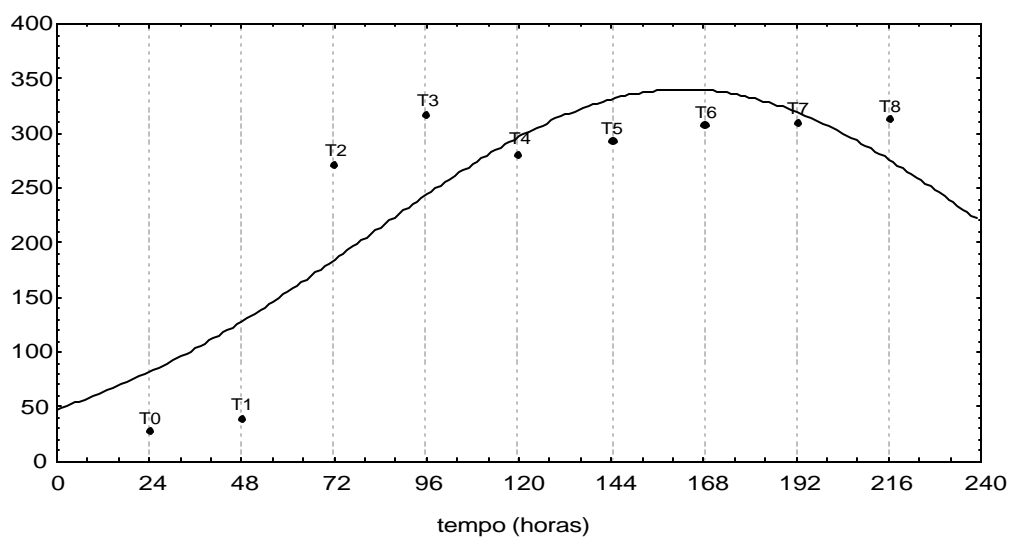
APÊNDICE E - Estirpe 6069



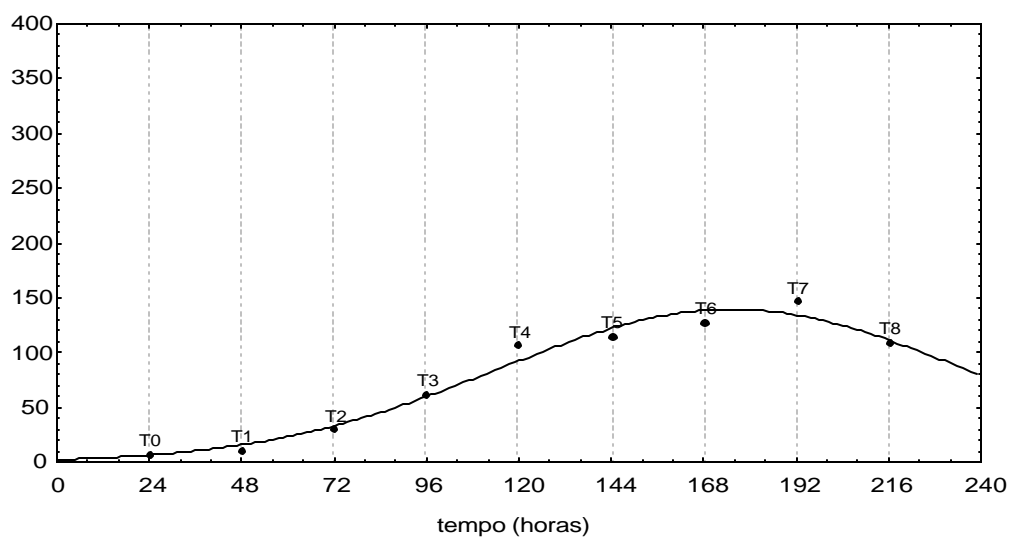
APÊNDICE F - Estirpe 6168



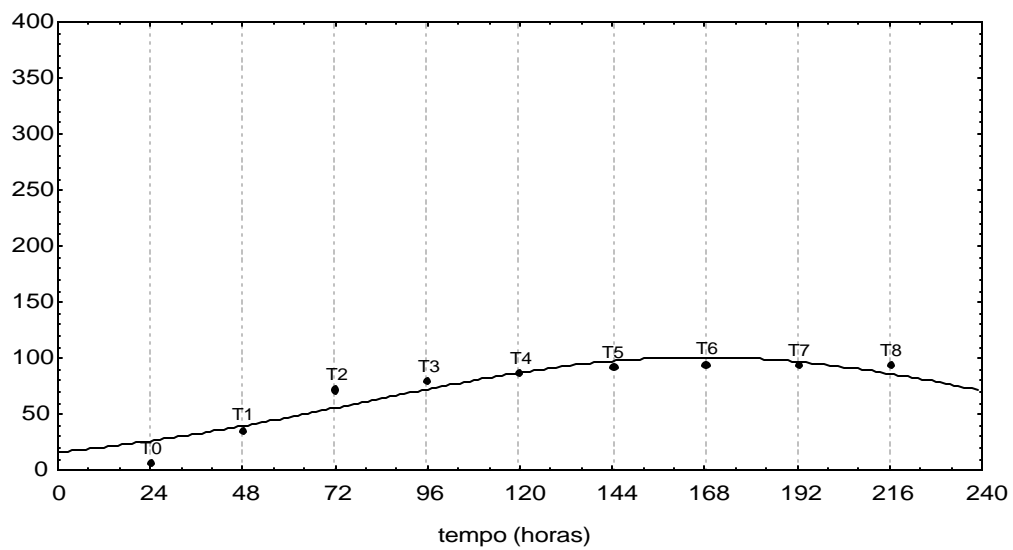
APÊNDICE G - Estirpe 6161



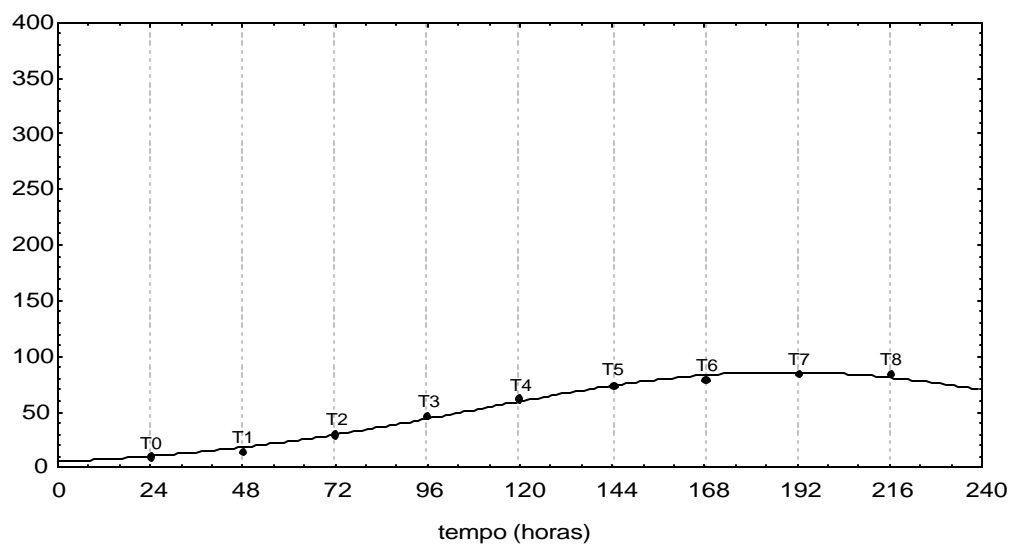
APÊNDICE H - Estirpe 6162



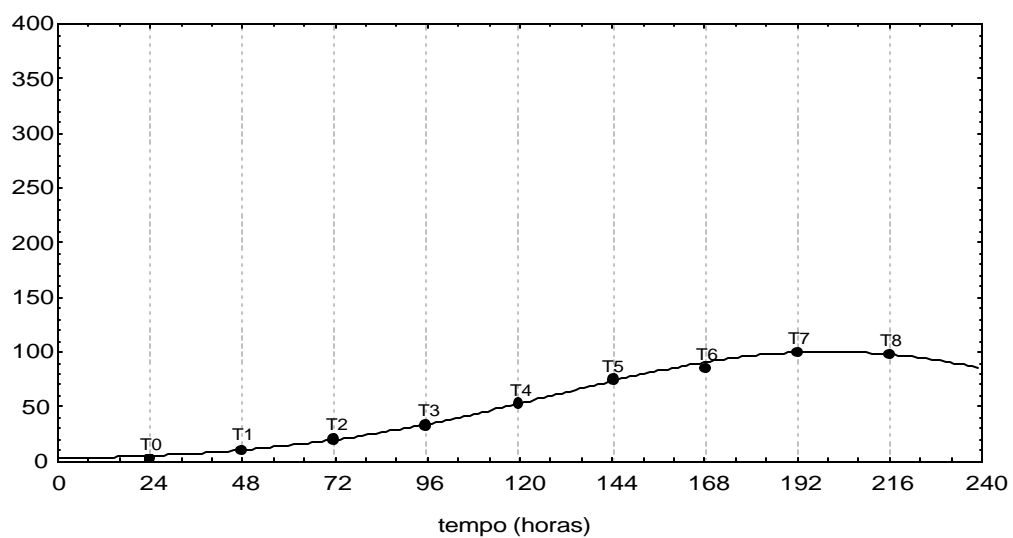
APÊNDICE I - Estirpe 6160



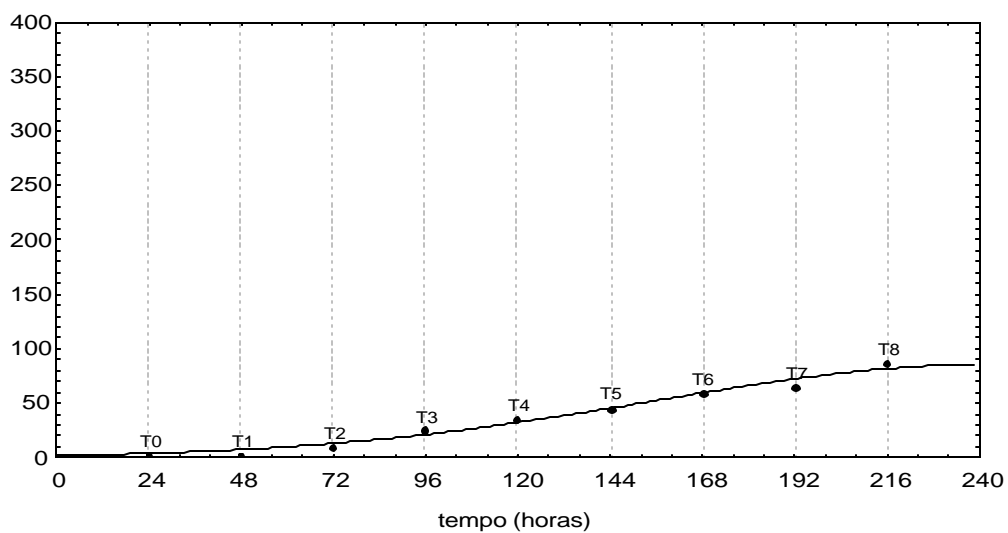
APÊNDICE J - Estirpe 6169



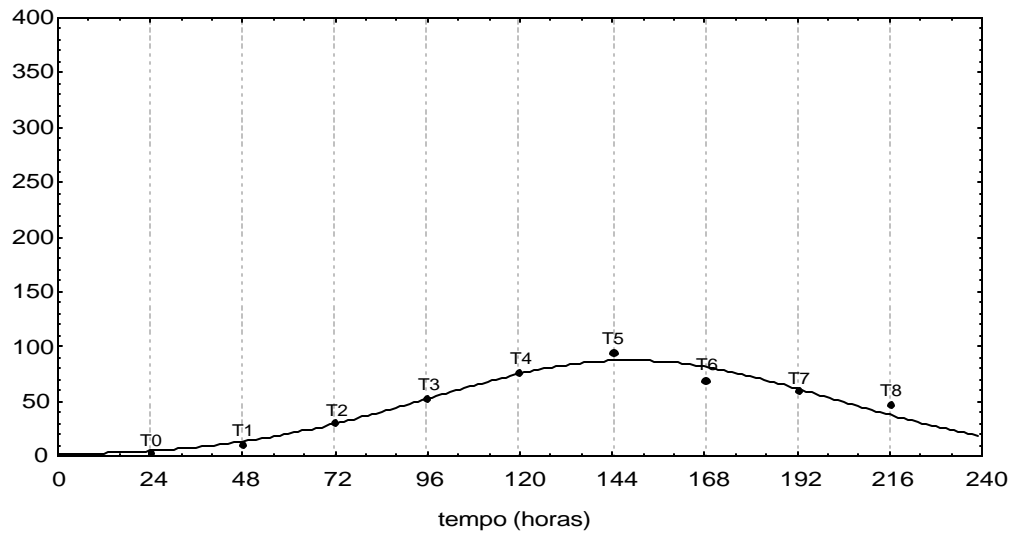
APÊNDICE K - Estirpe 6192



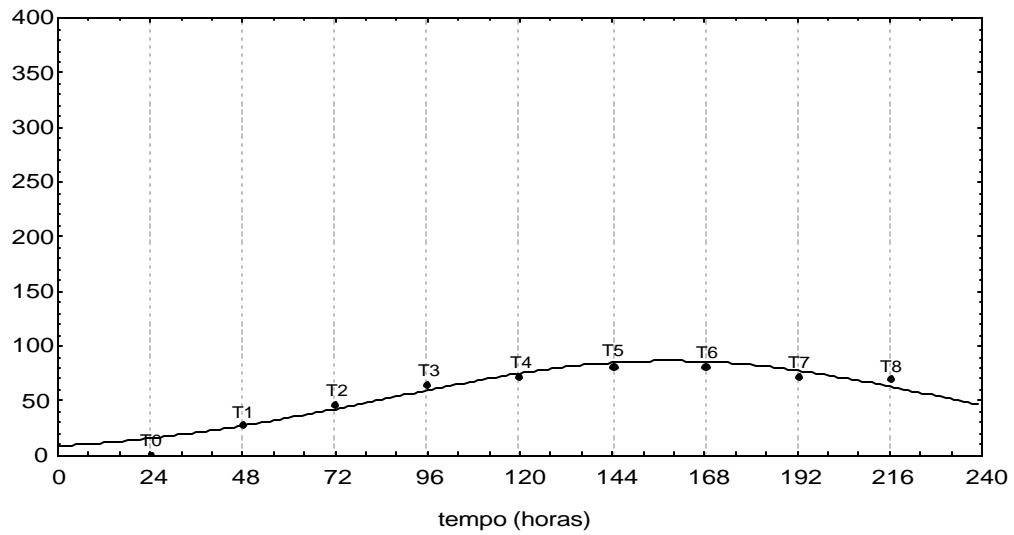
APÊNDICE L - Estirpe 6159



APÊNDICE M - Estirpe 6164

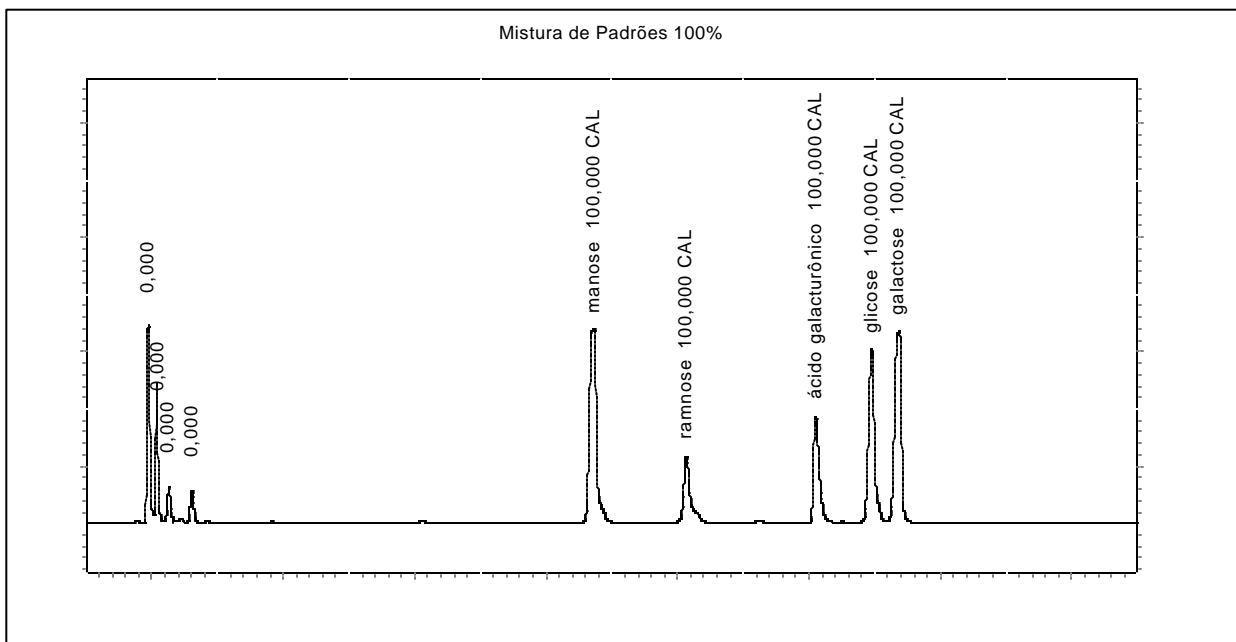


APÊNDICE N - Estirpe 5080

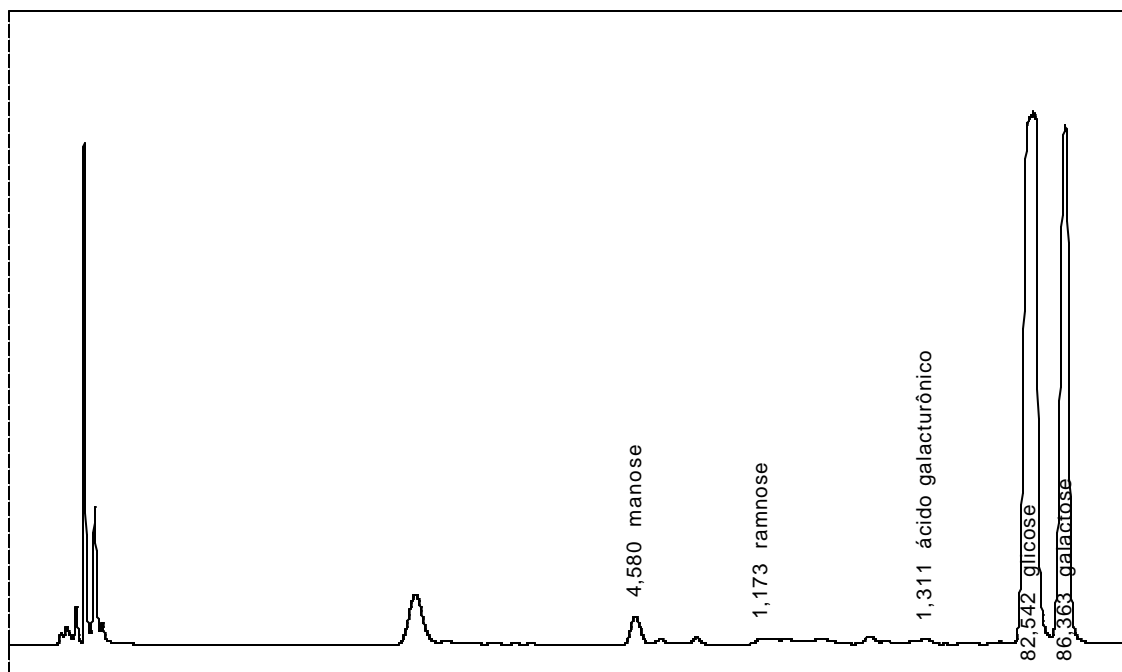


APÊNDICE O - Estirpe 6165

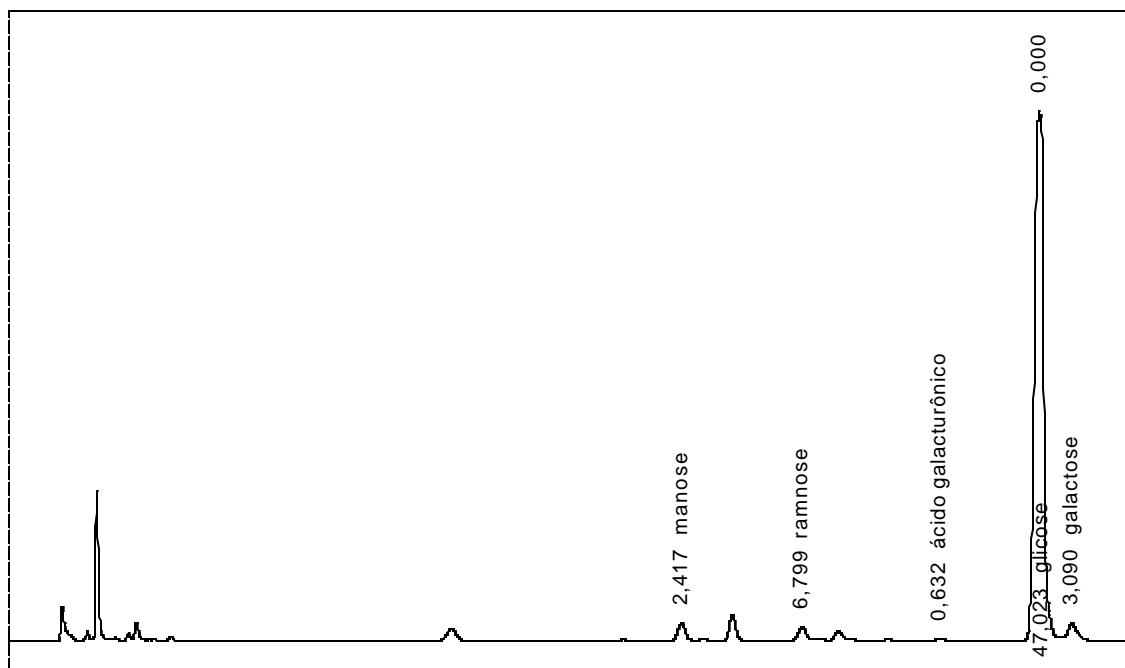
APÊNDICE P – Perfis cromatográficos representativos de açúcares derivados com PMP obtidos a partir da hidrólise de EPS das estirpes em estudo.



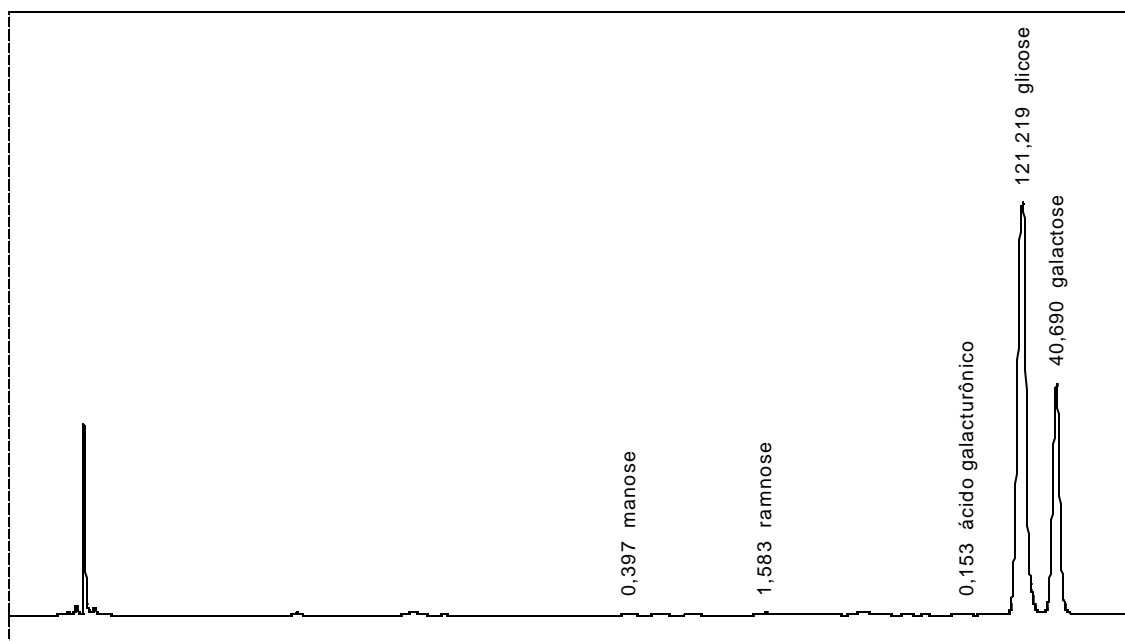
Estirpe 4077



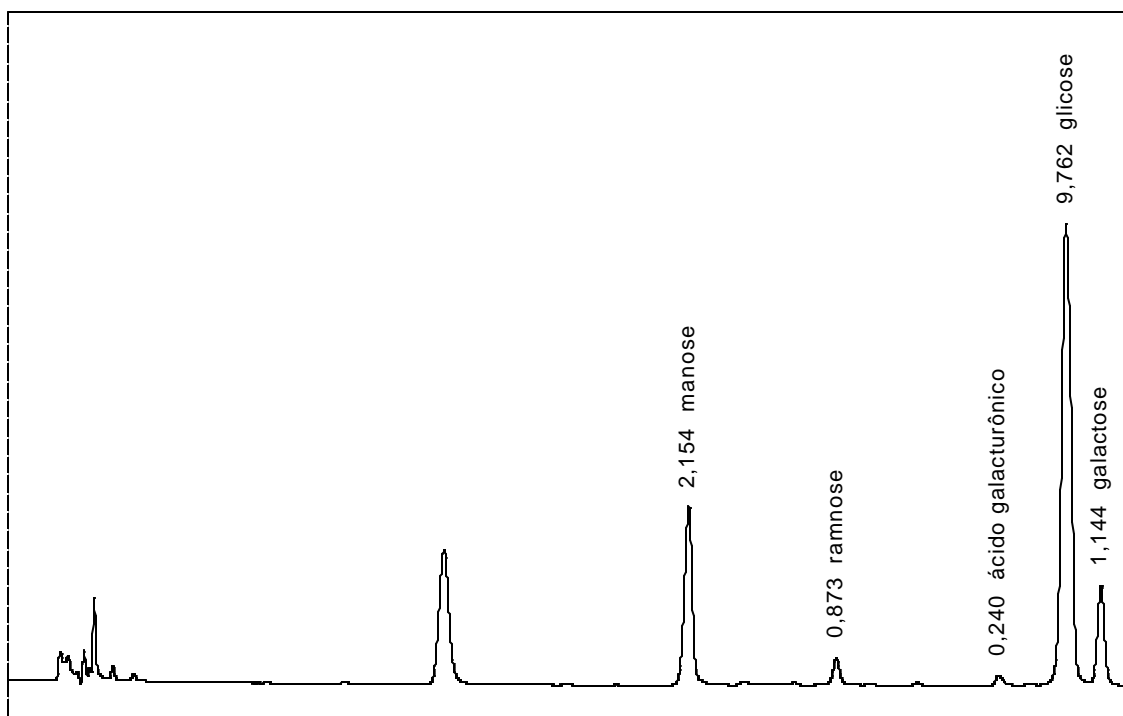
Estirpe 6069



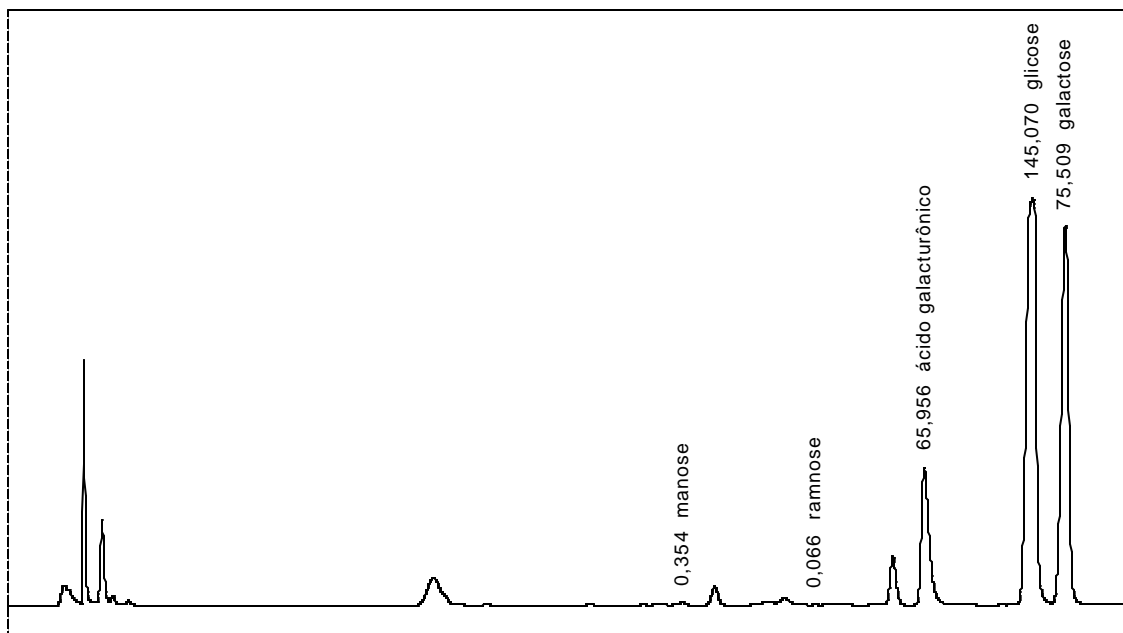
Estirpe 6070



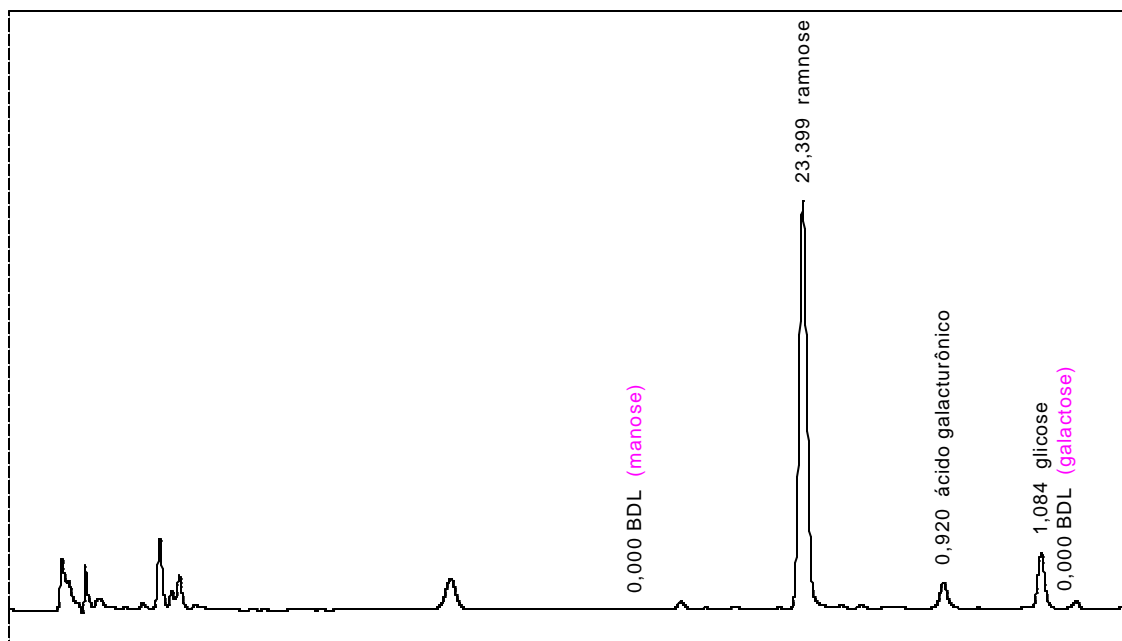
Estirpe 5080



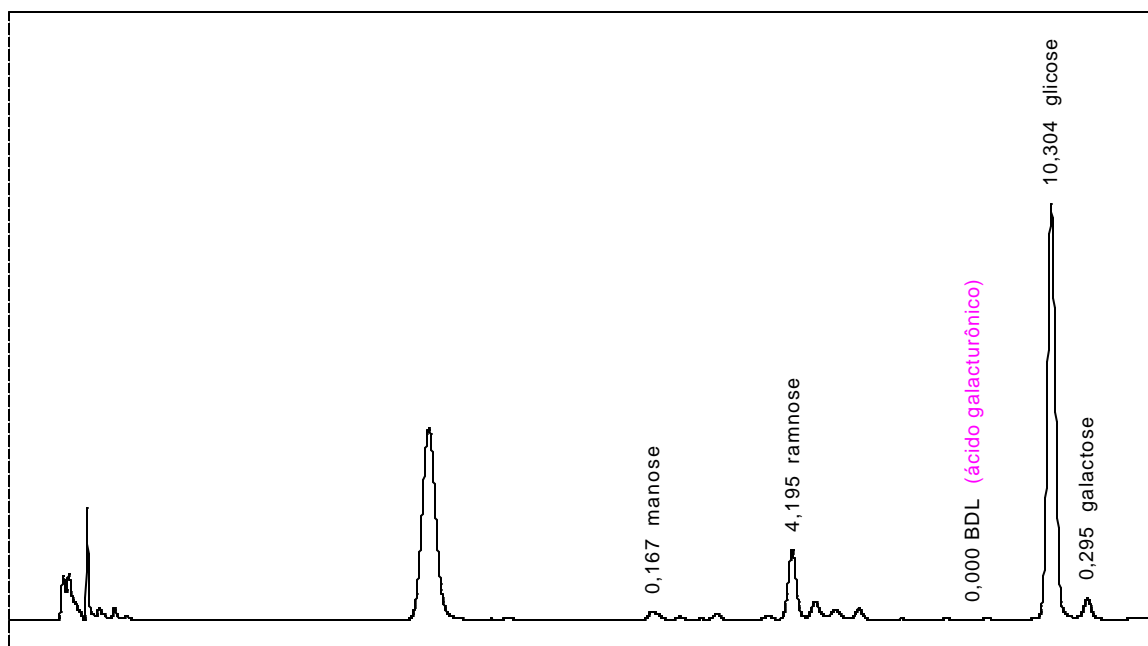
Estirpe 6153



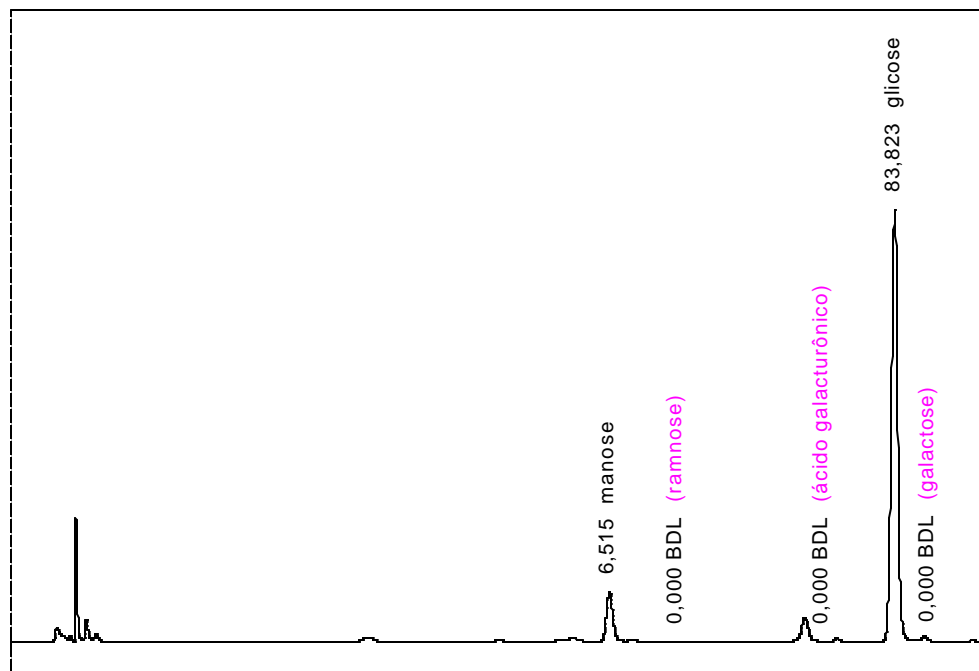
Estirpe 6159



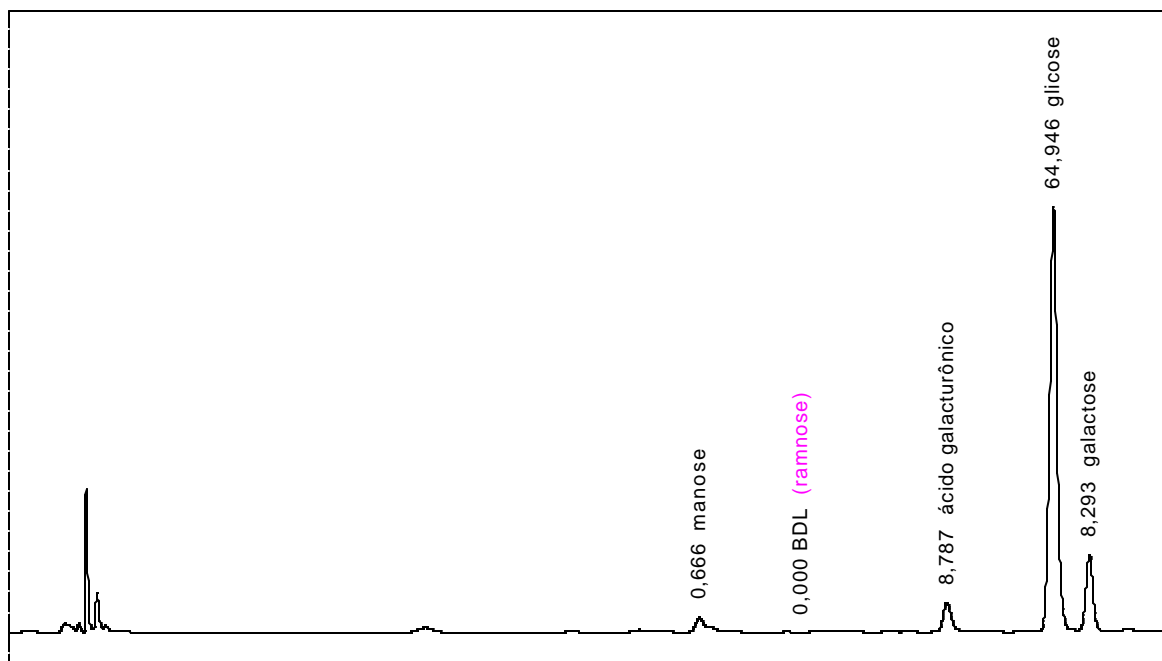
Estirpe 6160



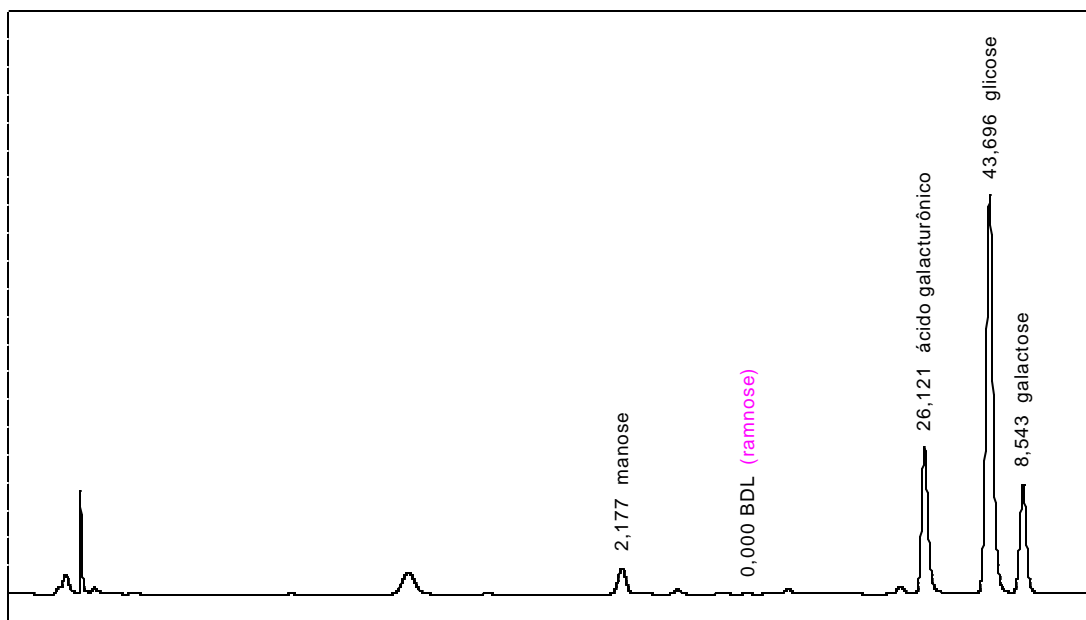
Estirpe 6161



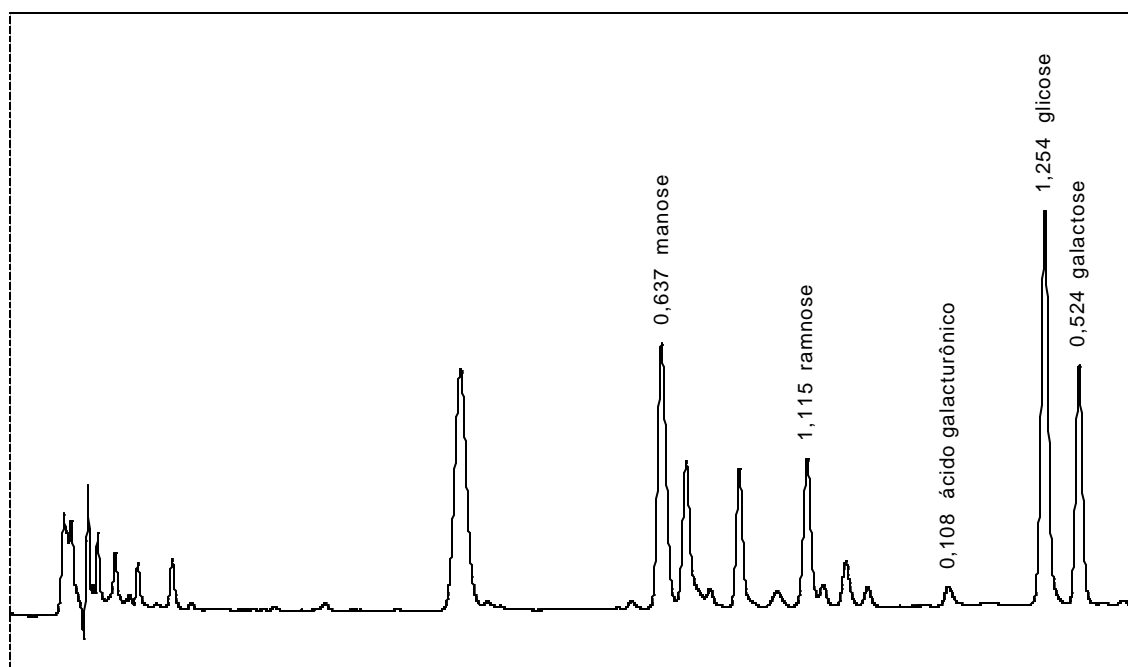
Estirpe 6162



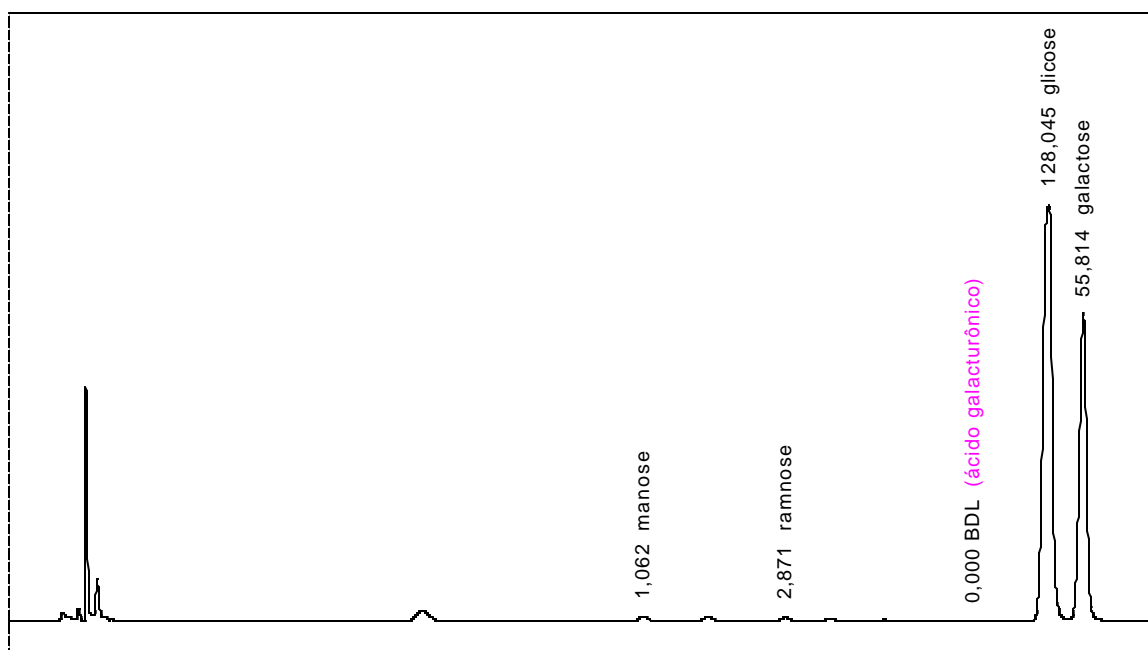
Estirpe 6164



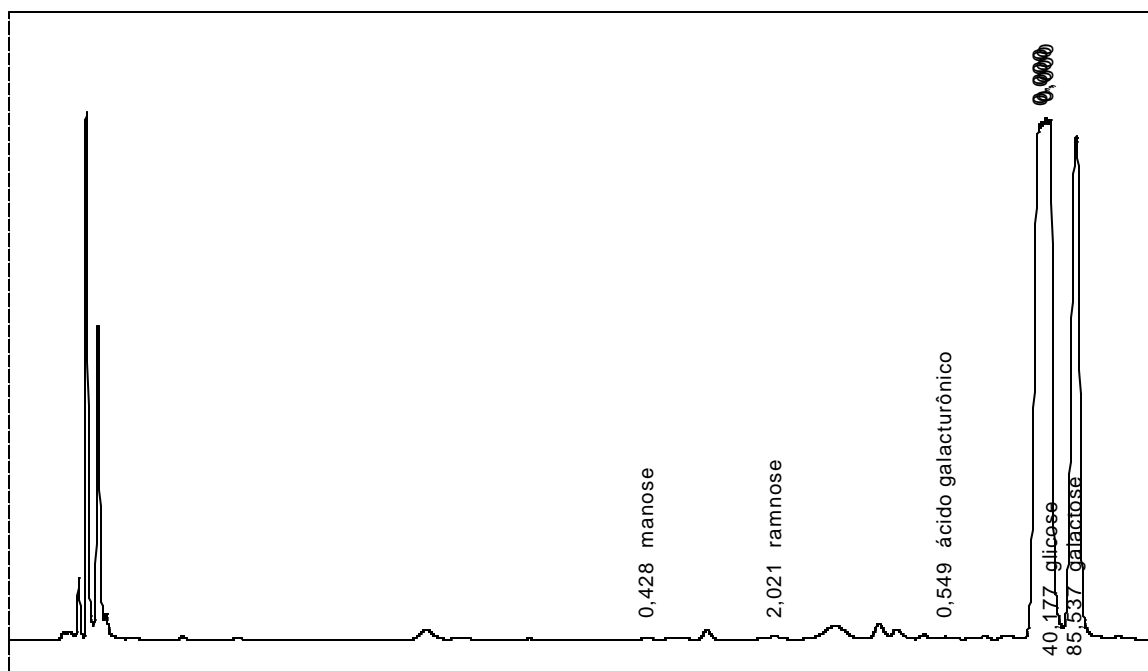
Estirpe 6165



Estirpe 6168



Estirpe 6169



Estirpe 6192

