

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ENUMERAÇÃO CELULAR PELA QUANTIFICAÇÃO
ABSOLUTA POR PCR EM TEMPO REAL DE CULTURAS DE
BRADIRRIZÓBIOS.**

Karla Cristina Stropa
Bióloga

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Julho de 2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

ENUMERAÇÃO CELULAR PELA QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA POR
PCR EM TEMPO REAL DE CULTURAS DE BRADIRRIZÓBIOS.

Karla Cristina Stropa

Orientador: Prof. Dr. Jackson Antônio Marcondes de Souza
Co-orientadora: Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agropecuária.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Julho de 2009

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

KARLA CRISTINA STROPA – nascida em Ribeirão Preto (SP), em 27 de abril de 1981, graduada em Ciências Licenciatura Plena em Biologia pelo Centro Universitário Barão de Mauá no ano de 2002. Em 2007 ingressou no curso de mestrado em Microbiologia Agropecuária na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) no câmpus de Jaboticabal (SP).

“Porque dos muitos trabalhos vêm os sonhos”

(Eclesiastes 5:3)

*Aos meus pais Luiz Carlos e Nadir, e ao meu irmão Rafael pelo apoio
e incentivo que dedicaram a mim em todos os momentos,*

*À minha querida avó Lydia, pelo amor a mim dispensado todos os
dias,*

Ao meu namorado Mateus, por estar sempre ao meu lado,

Dedico com carinho.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ser meu Pai e por me dar o privilégio de estudar e trabalhar com a vida em suas diferentes formas!!

À Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos, chefe do LBMP (Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas) pela oportunidade, auxílios e carinho com que me recebeu e demonstrou durante as pesquisas;

Aos membros da banca examinadora: Prof. Dr. Manoel Victor, Prof. Dr. Emanuel Maltempo Souza, Profa. Dra. Lúcia Carareto Alves e Prof. Dr. Jackson Marcondes Souza pelas correções e sugestões incorporadas para o enriquecimento do trabalho;

A todos os meus queridos amigos do LBMP, pela amizade, carinho, companheirismo, risadas, incentivo e ajuda que sempre demonstraram. Todos vocês são muito especiais!

Aos amigos do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada à Agropecuária, pela amizade e carinho de todos, e por terem cedido a linhagem de DH5 α de *E. coli*;

Aos meus pais pelo apoio, força e pelas orações que certamente fizeram diferença na minha vida;

Ao meu irmão, por fazer parte da minha vida. Rafa, te amo!!

Mateus, você faz parte da minha vida de forma muito especial, obrigada pelos muitos momentos felizes e divertidos;

A todos os meus familiares e amigos que torceram por mim;

À minha grande amiga Michelle, pela amizade que cultivamos. Amiga, você é única!!!

Ao casal Ivani e Arnaldo (“chegado”) pelo incentivo, amizade e carinho;

Aos amigos da Igreja Fonte da Vida, pelas orações e carinho;

Aos amigos da Academia Malhação e Saúde, pelos momentos de muita alegria e animação;

Araci, Serjão e Chiquinho, que me acolheram em Jaboticabal e que considero como minha família de Jabuka!!

Profa. Dra. Maria do Carmo do Depto de Biologia que sempre incentivou para que eu fizesse mestrado. Agradeço muito pelo carinho!

Aos funcionários do departamento de Tecnologia da Unesp pelos momentos de descontração;

Ao Dr. João Carlos Campanharo, pela ajuda desde a minha entrada no laboratório;

À Érica pela ajuda no ensaio de dessecação, e sua mãe e avó pelo carinho dispensado;

Ao meu amigo Wellington, por ter auxiliado sempre que foi preciso;

Ao Dr. Jackson Antônio Marcondes de Souza, o qual palavras seriam insuficientes para descrevê-lo neste contexto, porém agradeço imensamente por tudo, e que Deus continue abençoando a ele, a Marilânia, a Júlia e o Francisco;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida a este projeto.

SUMÁRIO

	página
RESUMO	xiv
SUMMARY	xv
I. INTRODUÇÃO	1
II. REVISÃO DE LITERATURA	3
1. Importância da avaliação da qualidade de inoculantes comerciais para soja....	3
2. A cultura de soja e a fixação biológica do nitrogênio.....	4
3. Inoculantes Comerciais: tipos e aplicações.....	9
4. Filogenia e taxonomia de rizóbios.....	10
5. Métodos de contagem de células.....	11
6. PCR quantitativo em tempo real.....	14
III. MATERIAL E MÉTODOS	17
Parte I – Desenvolvimento da técnica de enumeração celular baseado na qaPCR	17
1. Descrição das amostras experimentais e suas finalidades.....	17
a) Inoculante Comercial para soja.....	17
b) Células de bradirrizóbios adsorvidas na superfície das sementes de soja.....	18
c) Confecção do plasmídeo pGEM16SrDNA587.....	18
d) Amostra de referência.....	18
2. Extração de DNA genômico de <i>B. elkanii</i> SEMIA587.....	19
3. Amplificação do DNA e purificação do produto de PCR.....	19
4. Reação de ligação.....	20
5. Transformação em célula competente de <i>Escherichia coli</i> DH5 α através de choque térmico.....	21
6. Extração de DNA plasmidial.....	21
7. Análise de restrição dos clones obtidos.....	22

8. Reação de PCR e seqüenciamento do inserto <i>16S rDNA</i>	22
9. Análise do seqüenciamento.....	23
10. Oligonucleotídeos iniciadores para a qPCR.....	23
11. PCR qualitativo para validar o RT-16SrDNA usado na qPCR.....	24
12. Otimização da reação por PCR quantitativo em tempo real para o oligonucleotídeo iniciador <i>16S rDNA</i>	24
13. Curva de dissociação.....	25
14. Estabelecimento da curva padrão para quantificação absoluta por PCR em tempo real.....	25
15. qPCR do <i>16S rRNA</i> presente no DNA genômico da amostra de referência para correlação com o número de células/ml determinado por UFC.....	26
16. Quantificação absoluta das amostras desconhecidas.....	27
17. Análise dos dados.....	27
Parte II – Aplicação da técnica de enumeração celular por qPCR em análises fisiológicas	28
1. Inoculantes.....	28
2. Ensaio de resistência à dessecação.....	29
3. Enumeração de células das amostras submetidas ao ensaio de dessecação pelo método de plaqueamento.....	31
4. Massa dos nódulos e isolamento de bacterióides.....	32
5. Extração de DNA das amostras desconhecidas e qPCR.....	32
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
Parte I – Preparação do plasmídeo pGEM16SrDNA587	34
1. Análise da amostra de DNA genômico e do produto <i>16S rDNA</i>	34
2. Clonagem do <i>16S rDNA</i> em vetor plasmidial.....	35
3. Seqüenciamento automático e análise dos clones obtidos.....	36
Parte II – Quantificação absoluta por PCR em tempo real (qPCR) ...	38
1. Confecção da curva padrão através de pGEM16SrDNA587.....	38

2. Especificidade do RT-16SrDNA utilizado na qPCR através da curva de dissociação.....	44
3. Determinação do número de moléculas plasmidiais pGEM16SrDNA587.....	46
4. Quantificação do <i>16S rDNA</i> nas amostras desconhecidas.....	48
5. Análises qualitativa e quantitativa de inoculantes líquidos comerciais puros.....	51
5.1. pH dos inoculantes.....	51
5.2. Medidas de unidades Klett dos inoculantes biológicos.....	54
5.3. Número de células/ml de bradirrizóbios nos inoculantes.....	55
6. Análises qualitativa e quantitativa de bradirrizóbios resistentes à dessecação sobre sementes de soja.....	59
6.1. Número de células dos bradirrizóbios resistentes à dessecação.....	60
6.2. Eficiência da nodulação radicular em plantas de soja, com bradirrizóbios resistentes à dessecação.....	68
6.3. Considerações finais sobre a resistência de células usadas para Inoculação.....	71
7. Determinação do número de bacterióides isolados de um nódulo radicular de soja.....	74
V. CONCLUSÕES.....	76
VI. REFERÊNCIAS.....	77
APÊNDICE.....	92
1. Meios de cultura utilizados.....	93

LISTA DE FIGURAS

	página
Figura 01: Plantas de soja em campo e nódulos obtidos em casa de vegetação.....	06
Figura 02: Fases do estabelecimento da simbiose entre leguminosa e rizóbios.....	07
Figura 03: Detalhes das fases de infecção em pêlo radicular na soja.....	08
Figura 04: Bacterióides fixadores de nitrogênio em células vegetal.....	08
Figura 05: Esquema ilustrativo de PCR em tempo real com o sistema SYBR Green.	15
Figura 06: Fases do ciclo da PCR em tempo real.....	16
Figura 07: Esquema do vetor pGEM–T Easy.....	20
Figura 08: Inoculantes líquidos comerciais para soja (BioRhizo).....	29
Figura 09: Experimento de dessecação em casa de vegetação.....	31
Figura 10: Diagrama ilustrativo dos procedimentos.....	33
Figura 11: Perfil eletroforético do DNA genômico de <i>B. elkanii</i> SEMIA587 e da região amplificada.....	34
Figura 12: Perfil da reação de restrição do <i>16S rDNA</i> em vetor pGEM-T Easy.....	35
Figura 13: Seqüenciamento parcial, nível de similaridade pelo Rhizobase e alinhamento das seqüências <i>16S rDNA</i> consenso pelo Clustawx.....	37
Figura 14: Curva padrão obtida na qPCR pelo pGEM16SrDNA587.....	42
Figura 15: Curvas padrão obtidas pelos dados de diluição do DNA plasmidial pelo SDS.....	44
Figura 16: Curvas padrão obtidas pelos dados de diluição seriada do DNA plasmidial em Microsoft Excel.....	44
Figura 17: Curva de dissociação.....	45
Figura 18: Otimização do RT-16SrDNA.....	46
Figura 19: Amplificação da amostra de referência.....	50
Figura 20: pH dos inoculantes para soja.....	53
Figura 21: Turbidez dos inoculantes.....	55

Figura 22: Amplificação por PCR em tempo real de amostras dos inoculantes comerciais para soja.....	59
Figura 23: qPCR da ressuspensão bacteriana da superfície das sementes de soja sobre dessecação.....	67
Figura 24: Gráfico do rendimento de <i>16S rDNA</i> nas células resistentes à dessecação.....	68
Figura 25: Número médio de nódulos das plantas de soja.....	69
Figura 26: qPCR do <i>16S rDNA</i> de bacterióides isolados de um nódulo.....	75

LISTA DE TABELAS

	página
Tabela 01: Diluição seriada do DNA do plasmídeo pGEM16SrDNA por qPCR para confecção da curva padrão.....	26
Tabela 02: Resultados das réplicas das diluições por qPCR para curva padrão...	42
Tabela 03: Determinação do número de moléculas de pGEM16SrDNA587.....	48
Tabela 04: Quantificação da amostra de referência.....	50
Tabela 05: Análise comparativa das diferentes quantificações realizadas.....	59
Tabela 06: Análise comparativa das diferentes quantificações realizadas no ensaio de resistência à dessecação.....	66
Tabela 07: Massa média de um nódulo radicular de soja com 35 dias após inoculação com células de bradimirizóbios do inoculante de 2 anos.....	75

ENUMERAÇÃO CELULAR PELA QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA POR PCR EM TEMPO REAL DE CULTURAS DE BRADIRRIZÓBIOS

RESUMO – O teor protéico da semente de soja pode chegar a 42%, o que demanda uma alta quantidade de nitrogênio. *Bradyrhizobium elkanii* e *Bradyrhizobium japonicum* são bactérias fixadoras de nitrogênio que estabelecem uma simbiose com a soja convertendo o nitrogênio atmosférico em amônia, que é o composto assimilável pela planta. A maximização desta simbiose em termos de produtividade são alcançados por meio da inoculação com estirpes de bradirrizóbios, através de inoculantes comerciais. O objetivo deste trabalho consistiu em enumerar células bacterianas de inoculantes de 1, 2 e 4 anos a partir da data de fabricação e avaliar a sobrevivência das células em sementes de soja em 4, 24 e 48 h após inoculação. Os resultados de contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) foram confrontados com a técnica de quantificação absoluta por PCR (reação em cadeia da polimerase) em tempo real (qaPCR). Os números foram coerentes em ambas as técnicas em relação à proporção nos tempos de inoculação e nos inoculantes em análise, porém a qaPCR apresentou melhor acurácia e rapidez nos resultados, detectando as células incultiváveis. As células resistiram sob dessecação até t=24 h, com queda considerável em todos os inoculantes após 48 h sob dessecação. Provavelmente esta queda é resultado de alteração bioquímica e fisiológica de seu metabolismo, dispondo de mecanismos defensivos às condições adversas para sua sobrevivência. A enumeração por qaPCR pode ser usada como prova, em casos de variação encontrada na quantificação por diferentes laboratórios, considerando que o método por UFC apresenta muitas variáveis e não incluem células viáveis não cultiváveis (VBNC). O fato do estado fisiológico dos rizóbios em inoculantes ser bastante variável ao longo do período de armazenamento, a enumeração celular seja pelo método de plaqueamento ou qaPCR não revela o estado real do sistema biológico em questão. Assim é mandatário que os prazos de validade sejam obedecidos, em alguns casos reduzidos, para estes materiais.

Palavras-chave: bradirrizóbios, enumeração celular, inoculante comercial, PCR em tempo real, quantificação absoluta, soja.

ENUMERATION AND DETECTION OF BRADYRHIZOBIA CELLS BY REAL-TIME PCR QUANTIFICATION

SUMMARY - Soybean grains contain up 42% of protein, so this crop requires high amounts of nitrogen for plant development. *Bradyrhizobium elkanii* and *Bradyrhizobium japonicum* are nitrogen fixing bacteria that establish symbiosis with soybean, converting the atmospheric nitrogen into ammonia that is the assimilable inorganic nitrogen compound for the plant. The optimization of this symbiosis and the success of biological nitrogen fixation (BNF) are reached by inoculating the seeds with strains of bradyrhizobia, using commercial inoculants. The aim of this work consisted in the enumeration of bacterial cells of inoculants 1, 2, and 4 years old counting from the date of manufacture and in the evaluation of surviving cells under desiccation in soybean seeds after 4h, 24h, and 48 h. The results of counting of the colony forming colonies (CFU) were correlated with those of obtained using absolute quantification by PCR (real-time PCR qPCR). The values were coherent in both the techniques in relation to the ratio in times of inoculation and the inoculants properly. However, qPCR was quicker and more accurate; and also allowed detection of the non-culturable cells. The cells resisted under desiccation until $t=24$ h, with considerable fall in all the inoculants after 48h under desiccation. This was probably due to by biochemical and physiological changes in its metabolism, making use of defensive mechanisms to the adverse conditions for its survival. qPCR enumeration could be used as a proof when variation in cell counting by different laboratories occurs. Considering that CFU based method present a lot of variables and do not account live cells in viable but non culturable (VBNC). The fact of the physiological state in rhizobia inoculants be sufficiently changeable throughout the storage period, the cellular enumeration for both methods do not reveal real state of the biological system in question. Thus it is mandatory that the expiration data is observed or reduced in some cases for the use of these materials.

Key-words: bradyrhizobia, cellular enumeration, commercial inoculant, real time PCR, absolute quantification, soybean.

I. INTRODUÇÃO

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill], família *Fabaceae* (DELORIT & GUNN, 1986) possui em torno de 42% de proteína em algumas sementes o que demanda uma quantidade elevada de nitrogênio em sua cultura, uma vez que o mesmo é constituinte essencial de aminoácidos, clorofila, ácidos nucléicos, bases nitrogenadas, entre outras moléculas CRAWFORD et al. (2000). O Brasil é o segundo maior produtor de soja no mundo. A safra de 2009 prevê uma produção de 57 milhões de toneladas, em uma área cultivada de 21 milhões hectares (CONAB, 2009). As principais fontes de nitrogênio para a cultura de soja são: o solo, através da decomposição da matéria orgânica e das rochas; a aplicação de adubos nitrogenados e a fixação biológica de nitrogênio atmosférico (FBN), através da associação simbiótica entre a leguminosa e bactérias do gênero *Bradyrhizobium* (ARAÚJO, 2006). A maximização deste processo é atingida com o uso de inoculantes comerciais líquidos, descartando a necessidade de aplicação de fertilizantes nitrogenados (ZILLI et al. 2005).

Devido à ampla aplicação biotecnológica dos microrganismos, a enumeração celular tornou-se de suma importância para área industrial, envolvendo a necessidade de quantificar células em amostras de inoculantes para culturas agrônomicas. As estirpes de bradirrizóbios recomendadas para a produção de inoculantes para soja são as SEMIA (seção de microbiologia agrícola) 5019 (*B.elkanii*) (29W) e SEMIA 587 (*B. elkanii*), sendo posteriormente incluídas as estirpes SEMIA 5079 (*B. japonicum*) (CPAC 15) e a SEMIA 5080 (*B. japonicum*) (CPAC 7) (JARDIM-FREIRE & VERNETTI, 1999; JARDIM-FREIRE et al. 2006). A legislação que rege a produção de inoculantes é regulamentada pelas instruções normativas nº 5 (10/08/2004) e nº 10 (24/03/2006), do MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), que recomenda que os inoculantes líquidos devem apresentar concentração mínima de $1,0 \times 10^9$ células viáveis por grama ou mililitro de produto, até a data de vencimento que é de no mínimo seis meses (FREIRE, 1992; HUNGRIA et al. 1997). Rizóbios são tradicionalmente enumerados através da quantificação de colônias viáveis por método de diluição seriada, por plaqueamento em meio sólido de cultura. Para superar possíveis

desvantagens dos métodos tradicionais de contagem celular, e incluir a detecção e enumeração de células viáveis, mas não cultiváveis (“vialble but not culturable” – VBNC), novas técnicas foram desenvolvidas usando tecnologias moleculares.

O MAPA exige um controle periódico dos inoculantes comerciais e comprovou que em alguns casos há uma discrepância entre o número de células detectadas pelo método de contagem de UFC (Unidades Formadoras de Colônias), por diluição seriada em placas, obtidos nos laboratórios dos produtores e o laboratório da FEPAGRO (Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária/RS), que é o órgão responsável pelas análises de inoculantes requeridas pelo MAPA. A técnica de PCR quantitativo em tempo real torna possível detectar a concentração de uma determinada amostra de DNA, permitindo uma estimativa confiável do número de células, com rapidez. Considerando isto, a enumeração celular associada pela quantificação de *16Sr RNA*, por PCR em tempo real, é uma proposta inovadora e eficiente.

O objetivo deste trabalho consistiu em desenvolver e aplicar a técnica para a enumeração celular de bradimirizóbios em inoculantes comerciais para soja, visando sua aplicação como método quantitativo recomendado, comparado ao método tradicional de contagem de células por determinação de UFC após diluição seriada. A técnica está embasada na quantificação absoluta do gene *16S rRNA*; o *16S rRNA* faz parte da maquinaria básica de tradução e síntese de proteínas constituída nos ribossomos. A quantificação celular pela PCR em tempo real foi comparada ao método tradicional de diluição seriada e plaqueamento. A análise foi realizada com culturas de inoculantes comerciais líquidos para soja, em diferentes períodos de armazenamento, e em ensaios de dessecação que avaliam a resistência das células sobre as sementes de soja.

O desenvolvimento desta técnica como principal objetivo deste trabalho deixa claro que o método quantitativo absoluto deve ser empregado em casos que necessitem de uma confirmação da contagem de UFC por diluição seriada em placas.

A metodologia proposta deverá ser utilizada como um fator de decisão quando necessário. Esta análise permitirá a enumeração celular por quantificação absoluta de células de bradimirizóbios.

II. REVISÃO DE LITERATURA

1. Importância da avaliação da qualidade de inoculantes comerciais para soja

Os solos de uma maneira geral, possuem uma população natural de rizóbios capazes de nodular a soja, entretanto, essas bactérias nem sempre são suficientes e eficientes no processo de fixação biológica do nitrogênio (FBN). Para que ocorra uma maximização deste processo com um custo relativamente reduzido para o agricultor, o uso de inoculantes comerciais é imprescindível para que a produção de soja seja de excelente qualidade no Brasil. Pesquisas indicam que não há a necessidade de aplicação de fertilizantes nitrogenados para a cultura de soja, pois o uso adequado dos inoculantes comerciais é suficiente para o sucesso da FBN (ARAÚJO, 1997; ZILLI et al. 2005).

A recomendação de estirpes de bactérias para produção de inoculantes comerciais é feita pela RELARE (Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola). As estirpes de bradirrizóbios atualmente estão depositadas parte da coleção de rizóbios da FEPAGRO, que é a instituição responsável pela manutenção e distribuição das estirpes recomendadas, enquanto o MAPA normatiza a produção de inoculantes comerciais em âmbito federal.

Rizóbios são tradicionalmente enumerados através da quantificação de colônias viáveis por método de diluição seriada, por plaqueamento em meio sólido de cultura. Contudo, diversos parâmetros podem causar uma limitação no processo de quantificação de unidades formadoras de colônias e, portanto, na enumeração propriamente dita. Para superar as possíveis desvantagens dos métodos tradicionais de contagem celular, e incluir a detecção e enumeração de células viáveis mas não cultiváveis, novas técnicas foram desenvolvidas usando tecnologias moleculares. Entre estas, destacam-se o método de hibridização fluorescente "in situ", epifluorescência e PCR quantitativo em tempo real.

Contudo, os métodos tradicionais de detecção, incluindo as análises bioquímicas e/ou de cultivo celular, demoram no mínimo dois dias para se ter resultados. Em particular, para *B. elkanii*, um rizóbio de crescimento lento, o resultado de plaqueamento de uma diluição seriada demora entre 06-10 dias para que as colônias cresçam (RUMJANECK et al. 1993). Considerando a expectativa da indústria e mercado de inoculantes comerciais, este tempo pode ser considerado como um prazo prolongado para se obter resultados.

A técnica de PCR quantitativo em tempo real desenvolveu-se como uma ferramenta fácil, sensível e confiável para quantificação bacteriana em amostras ambientais (HUIJSDENS et al. 2002). Esta técnica torna possível detectar a concentração inicial de um determinado ácido nucléico, permitindo uma estimativa confiável do número de células correlacionadas. Outro fator favorável é a rapidez com que os resultados podem ser adquiridos, comparado aos métodos tradicionais de enumeração celular.

O MAPA realiza um controle periódico dos inoculantes comerciais e comprovou que em alguns casos, há uma discrepância entre o número de células detectadas pelo método de contagem de UFC por diluição seriada em placas, entre os diferentes laboratórios dos produtores, e o laboratório da FEPAGRO, que é o órgão responsável oficial das análises de inoculantes pelo MAPA. A metodologia proposta neste trabalho deveria ser utilizada como um fator de decisão quando necessário.

2. A cultura da soja e a fixação biológica do nitrogênio

O Brasil é o segundo maior produtor de soja no mundo. A safra de 2009 prevê uma produção de 57 milhões toneladas, em uma área cultivada de 21 milhões hectares (CONAB). A soja possui um alto teor protéico, em torno de 42% em algumas sementes (PANIZZI & MANDARINO, 1994), o que demanda uma quantidade elevada de nitrogênio que é constituinte essencial de proteínas, aminoácidos, clorofila, ácidos nucléicos, bases nitrogenadas, entre outras moléculas (CRAWFORD et al. 2000).

A maximização da simbiose pode ser alcançada através da inoculação com estirpes de rizóbios com características selecionadas. Isto reduz significativamente os custos da produção da soja no Brasil em mais de um bilhão de dólares, através da aplicação de inoculantes comerciais, fator que contribui também com a diminuição da poluição no meio ambiente (MENDES & HUNGRIA, 2001). Fica claro que a viabilidade econômica da cultura de soja no Brasil deve-se à ação dessas bactérias que trabalham para o agricultor.

As principais fontes de nitrogênio para a cultura de soja são: o solo, através da decomposição da matéria orgânica e das rochas; a aplicação de adubos nitrogenados e a fixação biológica de nitrogênio atmosférico, através da associação simbiótica entre a leguminosa e rizóbios (ARAÚJO, 2006). Os solos tropicais brasileiros possuem uma fonte muito limitada de nitrogênio, uma vez que as nossas condições de altas temperaturas aceleram o processo de decomposição da matéria orgânica, liberando rapidamente o nitrogênio e provocando sua posterior perda do solo através da lixiviação e da desnitrificação. Sendo assim, os solos tropicais de um modo geral, são muito pobres em nitrogênio, com teores máximos em torno de 0,3%.

A maior reserva de nitrogênio na natureza encontra-se no ar, o qual contém cerca de 80% deste elemento na forma de dinitrogênio gasoso (N_2), não assimilável pelas plantas. O processo de FBN, que envolve a transformação do gás N_2 em amônia (NH_3), requer um grande gasto de energia devido à ligação química tripla entre estes átomos. A energia necessária para romper esta ligação covalente pode ser oriunda de fontes biológicas, como no caso da FBN, ou de fontes energéticas não renováveis, como ocorre no processo industrial de produção dos adubos nitrogenados. O processo Haber-Bosch funciona por meio da combinação de gases de nitrogênio e hidrogênio sob altas temperaturas e pressão na presença de um agente catalisador. O calor e a pressão proporcionados exigem grande quantidade de energia e o hidrogênio é suprido pelo petróleo, carvão ou, mais freqüentemente, por gás natural (combustíveis fósseis). Estudos estimam que sejam gastos seis barris de petróleo para cada tonelada de NH_3 sintetizada através do processo industrial de fixação de nitrogênio (HUNGRIA et al. 2001).

Bactérias fixadoras de nitrogênio possuem um complexo enzimático denominado nitrogenase, capaz de quebrar a tripla ligação entre átomos de nitrogênio atmosférico, convertendo esse nitrogênio em amônia, a qual é absorvida pela planta (BURKS & BURRIS, 1941; BURRIS, 1974). Os rizóbios são bactérias habitantes do solo que se associam intimamente com os pêlos radiculares das plantas (Figura 01B). Trocas de sinais moleculares entre os simbiosites iniciam o processo de nodulação, dando origem aos nódulos, que são estruturas especializadas onde a simbiose é estabelecida (Figura 02) (PERRET et al. 2000). As leguminosas liberam compostos flavonóides propiciando uma quimiotaxia do rizóbio em direção à superfície dos pêlos radiculares da planta. Os rizóbios uma vez direcionados à rizosfera induzem a diferenciação do primórdio do nódulo. Os rizóbios infectam as células vegetais através do cordão de infecção, formado inicialmente pelo encurvamento dos pelos radiculares e abrigo dos rizóbios até atingirem as células vegetais (Figura 03). O crescimento do nódulo radicular ocorre com a multiplicação dos rizóbios no interior da planta, onde se diferenciam morfológicamente em bacterióide dando início ao processo de FBN (Figura 04). O bacterióide utiliza as fontes de energia da planta para sua manutenção e multiplicação, e a planta aproveita o nitrogênio fixado diretamente nas raízes, distribuindo-o para os demais órgãos (Figura 01A).



Figura 01: A) Plantas de soja não inoculadas (esquerda) e inoculadas (direita) (Foto de João Campanharo - Campo de Avaré/SP). B) Nódulos em plantas de soja cultivadas em casa de vegetação.

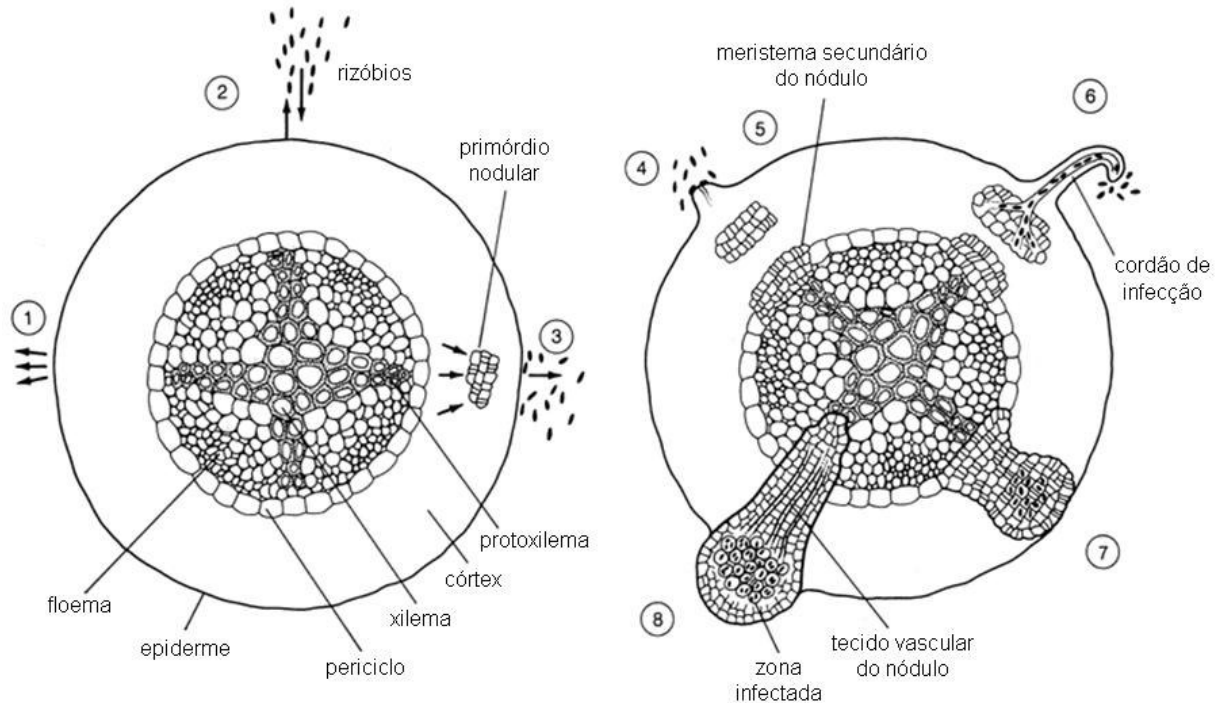


Figura 02: Fases do estabelecimento da simbiose entre leguminosas e rizóbios.
 Fonte: www.plantphys.net

1. Liberação de flavonóides pelas raízes da planta;
2. Quimiotaxia do rizóbio em direção à superfície das raízes;
3. Proliferação do rizóbio na rizosfera e indução da diferenciação do primórdio do nódulo;
4. Aderência do rizóbio às raízes;
5. Diferenciação do meristema secundário do nódulo (conexão vascular);
6. Encurvamento do pêlo radicular e formação da via de infecção;
7. Múltipla infecção das células do nódulo e crescimento do nódulo;
8. Crescimento do nódulo, diferenciação dos bacterióides e começo da fixação simbiótica de nitrogênio.

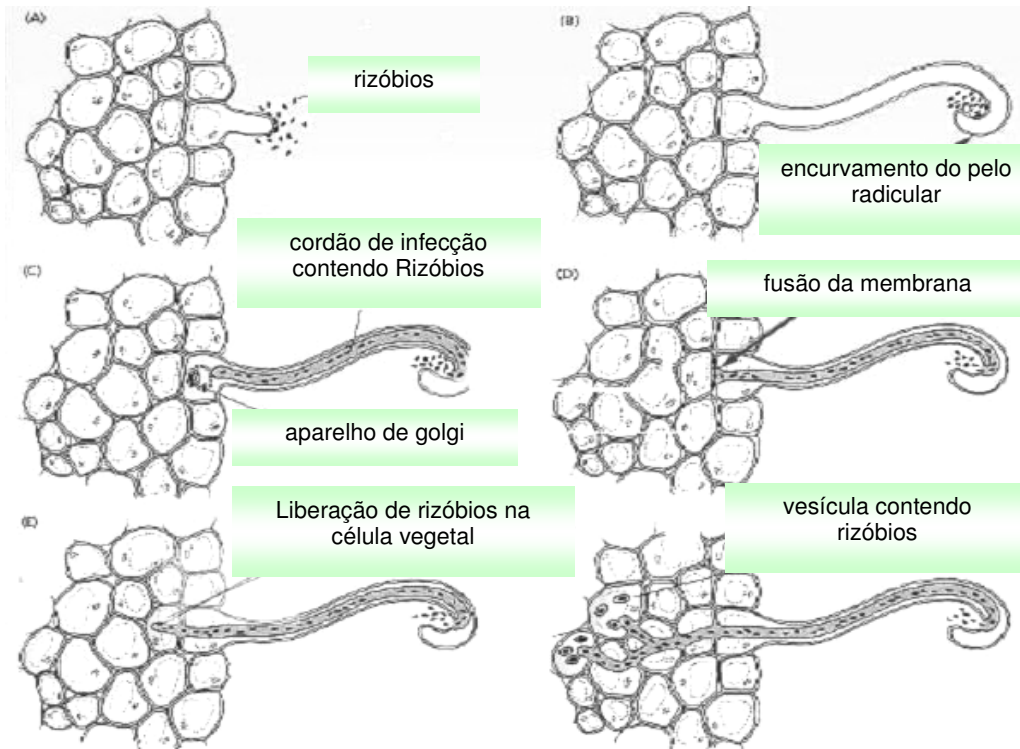


Figura 03: Detalhes das fases de infecção da raiz de uma planta por rizóbios.
Fonte: www.plantphys.net

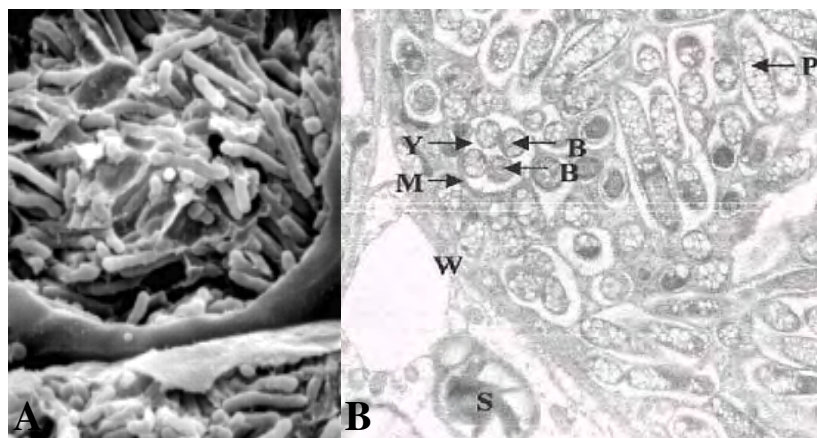


Figura 04: (A): Bacterióides fixadores de nitrogênio (KUYKENDAL, 2005). (B): Secção transversal de um nódulo determinado de feijão, como o de soja, mostrando a formação do simbiossoma. B – bacterióide; Y – espaço peribacterióide; M – membrana peribacterióide; W – parede celular vegetal; P – grânulo de PHB; S – amido. (CRAWFORD *et AL.*, 2000).

3. Inoculantes Comerciais: tipos e aplicações

Os inoculantes comerciais podem vir na forma de turfa, que é um substrato com elevado teor de matéria orgânica (ARAÚJO, 1997), ou na forma líquida devido à praticidade de aplicação por parte do agricultor. A utilização de inoculantes comerciais na forma líquida é mais promissora, o qual vem apresentado em embalagens que consistem de frascos plásticos, que mantém na sua formulação as células viáveis durante o período de seu armazenamento. O prazo de validade dos inoculantes comerciais é de no mínimo seis meses após sua fabricação e a aplicação é realizada diretamente na semente ou via sulco de plantio (MAPA, 2009). As aplicações devem ser realizadas anualmente, pelo menos nos primeiros anos da cultura. Isto é importante para que, independente da presença ou não de bradirrízobios no solo, a simbiose se dê sempre com as estirpes presentes no inoculante (OLIVEIRA & VIDOR, 1984; VARGAS & HUNGRIA, 1997). Isso possibilita uma maior eficiência na FBN.

Os inoculantes em sua maioria utilizavam a turfa como veículo e deveriam ser aplicados às sementes antes do plantio, através de um processo trabalhoso e que muitas vezes poderia levar à morte dos microrganismos ou inoculação de organismos patogênicos nas sementes. A turfa é caracterizada por ser um material orgânico, importado e esterilizado antes de sua utilização na produção de inoculantes. Isso torna o produto caro e, muitas vezes é responsável pela má qualidade do inoculante, principalmente com relação à presença de microrganismos contaminantes.

O desenvolvimento de tecnologia visando à produção de inoculantes líquidos se tornou importante para a diminuição dos custos de produção dos inoculantes e para a facilitação da utilização desse insumo pelos produtores de soja. Dessa maneira uma formulação líquida contendo rizóbios fixadores biológicos de nitrogênio em soja foi desenvolvida. Essa formulação permite a manutenção da viabilidade dessa bactéria, livre de contaminação, mais econômica e com maior facilidade de aplicação nas sementes no momento do plantio. Paralelamente foram desenvolvidas formulações para aplicação de estirpes em inoculantes via sulco de plantio. Estas formulações foram enriquecidas com componentes direcionados para o fortalecimento da estrutura celular

das bactérias do gênero *Bradyrhizobium* objetivando maior vigor e conseqüente longevidade no solo.

4. Filogenia e taxonomia de rizóbios

Para classificar as diversas espécies de rizóbios foram tradicionalmente utilizados testes morfológicos, fisiológicos, bioquímicos e simbióticos, tais como, o cultivo em meios com diferentes fontes de carbono e a habilidade em nodular diferentes leguminosas hospedeiras, dentre outros (JORDAN, 1984). Contudo, particularmente nas últimas duas décadas, as técnicas de biologia molecular vêm ganhando um espaço crescente nos estudos de taxonomia, competitividade e ecologia de rizóbios.

Os RNAs ribossômicos (rRNA) são componentes essenciais na fisiologia celular. Estes componentes interagem de modo específico com as proteínas ribossômicas para formar as subunidades dos ribossomos que atuam na síntese de proteínas. Os rRNAs são o principal produto da transcrição em qualquer célula, constituindo geralmente de 80 a 90% da massa de RNA total dos procariontes e eucariontes. As seqüências que codificam para rRNAs são reiteradas, ocorrendo em número variável nos diversos organismos estudados. Os RNAs ribossômicos são classificados conforme seu coeficiente de sedimentação sob campo centrífugo, que depende tanto do tamanho, assim como da densidade da molécula, nas unidades Svedberg (de símbolo S). Nos procariontes há ocorrência de 3 tipos de rRNAs: 3S, 16S e 23S, sendo que ocorre uma região que geralmente não são transcritas denominada ITS (non transcribed spacer) (GORAB, 2001).

Os rRNAs contém regiões com seqüência conservada e variável que pode ser utilizada como cronômetro molecular permitindo estimar a distância filogenética. Regiões de baixa variabilidade permitem inferências do tipo intra-específica na relação entre membros de um determinado domínio, seja *Archaea*, *Eubacteria* e *Eucarya*. Regiões mais variáveis oferecem uma discriminação entre organismos em nível de gênero e espécie (LIU & STAHL, 2002).

Avanços na utilização de técnicas de biologia molecular estão sendo obtidos pela comparação das seqüências de nucleotídeos do DNA, em especial na região que codifica o gene *16S rRNA*. Esta região é considerada conservada entre as bactérias, mas, ao mesmo tempo, com variabilidade e quantidade de informações suficientes para revelar as relações filogenéticas entre as espécies (WOESE, 1987; WEISBURG et al. 1991; WILLEMS & COLLINS, 1993).

Os estudos de filogenia também se beneficiaram pela técnica de PCR (análise pela reação em cadeia da polimerase), que permite a amplificação de seqüências definidas do DNA (SAIKI et al. 1988), o que facilitou as análises da molécula do 16S rDNA (YOUNG et al. 1991; YANAGI & YAMASATO, 1993).

Atualmente, segundo o Manual de Bacteriologia Sistemática de Bergey (GARRITY, 2005), baseado na análise filogenética da seqüência do *16S rRNA* são definidas quatro famílias que englobam os gêneros de rizóbios: *Bradyrhizobiaceae* (*Bradyrhizobium*), *Rhizobiaceae* (*Rhizobium*, *Allorhizobium* e *Ensifer* (*Sinorhizobium*)), *Phyllobacteriaceae* (*Mesorhizobium*) e *Hyphomicrobiaceae* (*Azorhizobium*). O gênero *Sinorhizobium* recebeu uma nova classificação recentemente, sendo renomeado como *Ensifer*, devido à semelhança íntima entre os dois gêneros.

Embora amplamente utilizado para avaliação da diversidade e filogenia de populações microbianas, o gene *16S rRNA* também pode ser empregado nos métodos moleculares para determinação direta de densidade ou abundância de células microbianas, em ambientes naturais ou “in vitro”.

5. Métodos de contagem de células

Enumeração celular ou medidas de biomassa são de grande importância na ecologia, uma vez que os microrganismos além de constituir a base da cadeia alimentar, realizam importantes processos na ciclagem de nutrientes em diferentes ciclos biogeoquímicos. Atualmente, devido à ampla aplicação biotecnológica dos microrganismos, a contagem celular tornou-se de suma importância para área

industrial. Neste contexto, encaixa-se a importância do número de células em amostras de inoculantes para culturas agrônomicas (PINKART et al. 2002).

Tradicionalmente, os microbiologistas têm quantificado a biomassa microbiana em uma determinada amostra por meio do número de células coradas em uma alíquota, ou pela detecção de células em um contador viável, com a subsequente conversão do número de células em conteúdo de carbono. Métodos bioquímicos envolvem a quantificação de componentes celulares dos microrganismos, tais como lipídeos, proteínas ou açúcares (PINKART et al. 2002).

Contudo, as técnicas microbiológicas clássicas, ou os métodos bioquímicos tradicionais, amplamente empregados, mostram baixa eficiência na determinação adequada de biomassa ou organização estrutural populacional de comunidades microbianas. Têm sido relatados, repetidamente, que métodos de enumeração celular para bactérias de diversas amostras ambientais são limitados e podem representar apenas uma proporção pequena da extensa comunidade real de células viáveis (RINGELBERG et al. 1988; SHAHAMAT et al. 1993). Adicionalmente, microrganismos podem ser metabolicamente ativos e potencialmente infecciosos ainda que não sejam cultiváveis (XU et al. 1982).

Bactérias Gram-negativas podem entrar em um estado conhecido como viável, mas não cultivável (“viable but non-culturable” – VBNC), um fenômeno que tem sido considerado análogo a esporulação de bactérias Gram-positivas (MCDUGALD, 1998).

Em resposta a estresses ambientais, como alta ou baixa temperatura, privação de fontes de nitrogênio ou carbono, choque osmótico, radiação, salinidade ou saturação de oxigênio, algumas espécies bacterianas podem entrar no estado VBNC. Tais espécies incluem: *Vibrio vulnificus*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* e *Helicobacter pylori*. Neste estado metabólico, as células perdem sua habilidade em crescer nos meios convencionais, que as sustentam, e sofrem mudanças fisiológicas e morfológicas, tais como resistência a sonicação, alteração na estrutura de membrana e parede celular e mudanças no conteúdo lipídico e protéico (LINDER & OLIVER, 1989; MUKAMOLOVA et al. 1995; WALSH et al. (1995).

O fenômeno de VBNC também foi descrito em algumas bactérias de solo, incluindo espécies de rizóbios, como, *Ensifer (Sinorhizobium) meliloti* (BASAGLIA et al. 2006) *Bradryrhizobium japonicum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhizobium "hedysari"* e *Rhizobium leguminosarum*. MAURICE et al. (2001) trabalhando com inoculantes líquidos, comerciais para soja, observaram a presença de células mortas ou em VBNC de *B. japonicum*. Eles relatam uma diminuição no número de células viáveis sobre sementes inoculadas ou nos inoculantes armazenados por vários anos. Estas células envelhecidas também apresentaram alterações em suas propriedades fisiológicas, baseado na relação bioquímica de matéria/carbono/nitrogênio/proteínas.

Três métodos destacam-se na enumeração celular, a saber: 1) o método de contagem direta de células totais através da câmara de contagem Neubauer, com recurso de microscópio ótico; 2) a citometria de fluxo, que utiliza uma combinação de componentes fluidos, ópticos e eletrônicos para analisar células em nível individual e corroborar essa informação para posterior análise; 3) a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC), em placas de Petri contendo meio sólido de cultura.

MAURICE et al. (2001) relatam, em termos práticos, a dificuldade em relação aos testes de qualidade de inoculantes comerciais, em particular contendo células em estado VBNC. O tempo de aparecimento de colônias em placas aumentou para os inoculantes armazenados por longos períodos, sendo que a análise englobou amostras com até oito anos de idade. Um dos critérios de qualidade mais importantes na avaliação de inoculantes comerciais consiste no número de células capazes de produzir nódulos eficientes e fixar o nitrogênio. Este critério é avaliado através da enumeração de células pelo método de determinação de UFC, em meio YMA ("Yeast-Mannitol Agar") (VINCENT, 1970).

O modo usual de realizar contagem de células viáveis consiste em determinar o número de células capazes de formar colônias num meio de cultura sólido com composição adequada ao crescimento do microrganismo. Assume-se que cada colônia é originada a partir de uma única célula viável, embora duas ou mais células que formem um agregado darão origem a uma única colônia. O procedimento geral com vista à contagem de UFC numa suspensão celular baseia-se no aparecimento e

contagem das colônias isoladas espalhadas sobre o substrato, após sujeição da suspensão de células à diluições seriadas sucessivas. Pretende-se que as células fiquem distanciadas de modo a que, após várias divisões celulares, originem colônias visíveis e bem isoladas umas das outras. Este método, embora amplamente empregado, pode apresentar modificações experimentais inerentes que são significativas considerando o padrão de análises que deve ser homogêneo entre os diferentes laboratórios. Tais procedimentos são: 1) ressuspensão deficiente da amostra de inoculante a ser analisada, por falta de uma agitação adequada e vigorosa; 2) deficiência cometida nas diluições; 3) separação inadequada das células presentes nas amostras diluídas; 4) aquecimento inadequado do espalhador de vidro, após esterilização pelo calor na chama do bico de Bunsen; 5) espalhamento incorreto sobre a placa de Petri. Isso pode causar uma variação dos resultados levando a divergência na análise de produtos comercializados e conflito entre os órgãos oficiais de fiscalização e a empresas produtoras de inoculante.

Com base nos relatos que demonstram que a atividade fisiológica de células de rizóbios em inoculantes comerciais se altera após períodos de estocagem e na possível deficiência dos métodos de contagem celular tradicionais, novos métodos de avaliação de inoculantes são necessários. Considerando isto, a enumeração celular associada ao perfil quantitativo do *16S rDNA* por PCR em tempo real, é uma proposta inovadora e eficiente. Fica claro que o método quantitativo absoluto deve ser empregado em casos que necessitem de uma confirmação da contagem de UFC por diluição seriada em placas.

6. PCR quantitativo em tempo real

O primeiro conceito de PCR (“Polymerase Chain Reaction”) surgiu em 1971 por GHOBIND KHORANA e colaboradores embora a idéia não tenha sido colocada em prática. Em 1985, KARY MULLIS e colaboradores publicaram o método de amplificação do DNA com êxito. Contudo, a automação na PCR ocorreu após a descoberta da *Taq* DNA Polimerase termoestável em 1989, por HOFFMANN-LA ROCHE Inc. & CETUS.

Em 1992 HIGUCHI e colaboradores adaptaram e desenvolveram a técnica de PCR em tempo real. Com este avanço biotecnológico, análises clínicas, agropecuárias e científicas podem ser realizadas com maior rapidez e precisão.

A PCR quantitativa em tempo real (qPCR) consiste numa reação de PCR cuja detecção dos amplicons é simultânea à amplificação, não necessitando de etapas posteriores como gel de eletroforese, detecção radioativa, ELISA ou Blots. Esta qPCR tem sido usada para detecção de patógenos, análise de expressão gênica, polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP), análises de aberrações cromossômicas (KUBISTA et al. 2006).

Este sistema está embasado na detecção e quantificação de um repórter fluorescente, enquanto ocorre a amplificação (Figura 05). Para isso, utilizam-se oligonucleotídeos e sondas específicas, ou fluoróforos intercalantes na cadeia do DNA, que emitem fluorescência a cada hibridização e a cada passo de amplificação (KUBISTA et al. 2006).

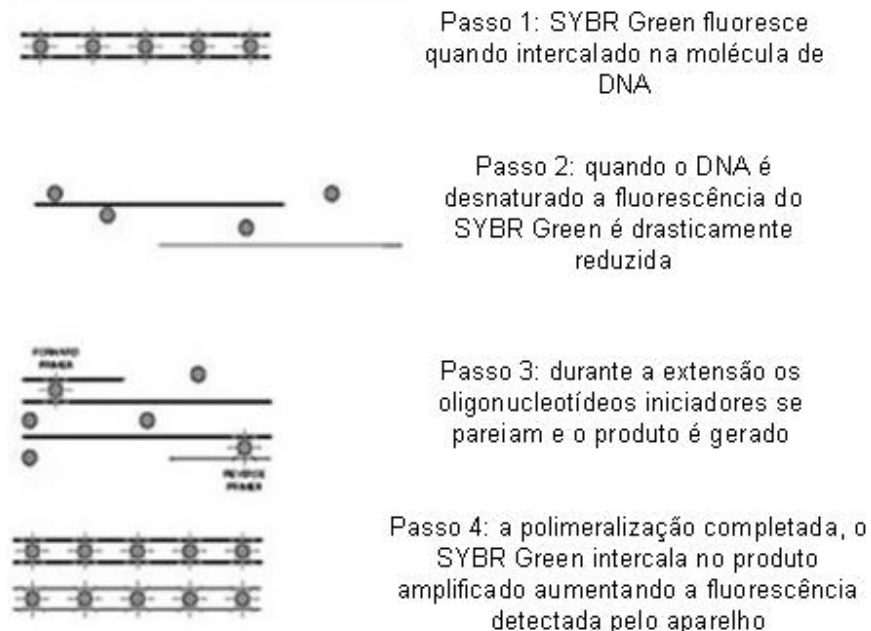


Figura 05: Esquema ilustrativo de PCR em tempo real com o sistema SYBR Green.

O sinal fluorescente é detectado após cada ciclo da PCR, durante a fase exponencial. O dobro da quantidade do produto é acumulado a cada ciclo, assumindo 100% de eficiência da reação. O sinal aumenta de uma forma diretamente proporcional à quantidade de produto de PCR na reação, enquanto a cinética de amplificação permite monitorar a acumulação do produto em tempo real especificamente durante a fase exponencial da reação (Figura 06). Estas características fazem da PCR quantitativa em tempo real a técnica mais precisa e reprodutível para a análise biotecnológica (KUBISTA et al. 2006).

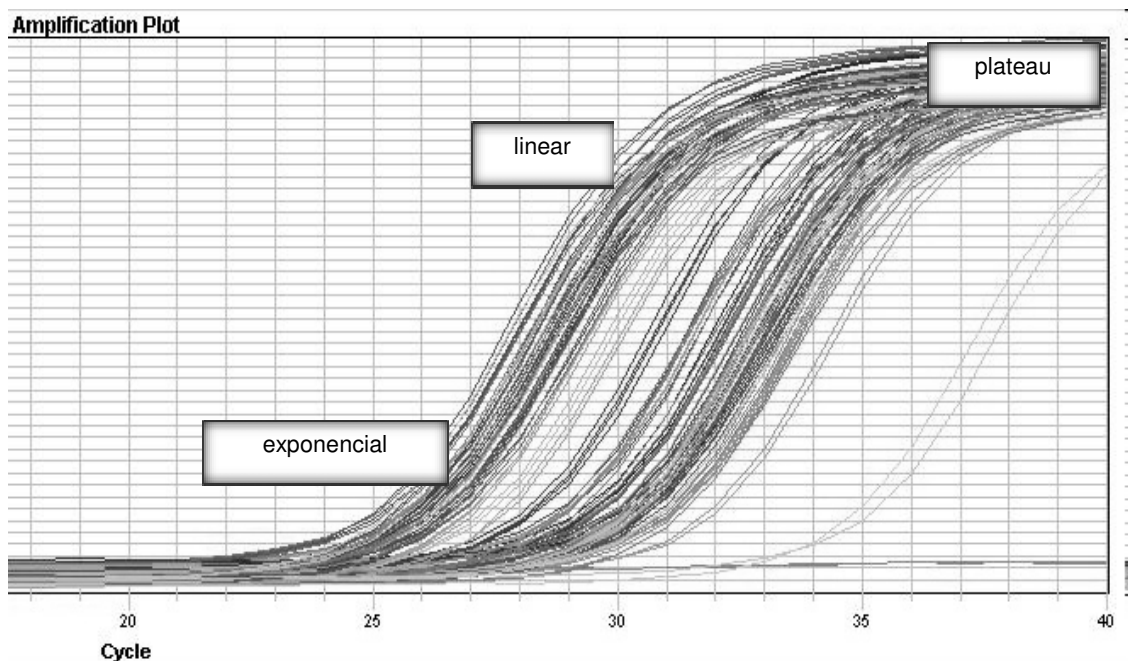


Figura 06: Fases do ciclo da PCR em tempo real.

A qPCR permite a obtenção de valores numéricos, tais como, número de cópias ou quantidade em ng de DNA, presente em determinada amostra. É preciso ter uma amostra padrão previamente quantificada por método independente, para quantificação da amostra de interesse. Com isto, a qPCR vem sendo empregada para determinação de carga viral e quantificação de transgenes em organismos geneticamente modificados (OGMs). Contudo, muitos experimentos utilizam da metodologia de titulação de

amostras padrões, para quantificação de amostras desconhecidas. Desta forma, um título, como um fator de diluição, por exemplo, é associado aos pontos da curva padrão, oferecendo um valor comparativo para as amostras desconhecidas.

Neste contexto, o método proposto neste trabalho permitirá enumeração celular rápida e segura por quantificação absoluta de células de bradimirizóbios em amostras de interesse agrícola.

III. MATERIAL E MÉTODOS

Os protocolos, quando não especificados pelo fornecedor dos kits ou reagentes, foram fundamentados em (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). Tais técnicas não oferecem risco para o meio ambiente e saúde humana, encaixando-se nos padrões de biossegurança (NB-1).

Parte I - Desenvolvimento da técnica de enumeração celular baseado na qaPCR

1. Descrição das amostras experimentais e suas finalidades

a) Inoculante Comercial para soja

Os inoculantes para soja armazenados por diferentes períodos foram utilizados em experimentos em casa de vegetação para determinar sua viabilidade em nodular raízes da leguminosa sob condição de dessecação sobre sementes de soja, em períodos distintos. A determinação do número de células dos inoculantes puros foi realizada por de plaqueamento e qaPCR.

b) Células de bradirrizóbios adsorvidas na superfície das sementes de soja

Durante a condição de dessecação a que os inoculantes foram submetidos, as células de bradirrizóbios aderidas nas sementes em cada período foram recuperadas lavando-as com água, e após diluição seriada, o número de células/ml foi determinado e uma alíquota foi utilizada para qPCR. As sementes sob dessecação foram plantadas em casa de vegetação para avaliar a resistência e eficiência dos bradirrizóbios em nodular as plantas de soja quando sujeitos à condição de estresse.

c) Confecção do plasmídeo pGEM16SrDNA587

O plasmídeo pGEM16SrDNA contendo o gene *16S rRNA* de *B. elkanii* foi obtido pela clonagem do produto de amplificação da região de interesse no DNA genômico de *B. elkanii* e pGEM-T Easy utilizado para confecção da curva padrão do PCR em tempo real por diluições seriadas. A finalidade da clonagem plasmidial foi obter uma cópia do gene *16Sr RNA* por plasmídeo, para posterior quantificação de 16Sr DNA nas amostras de interesse.

As diluições seriadas foram obtidas a partir de uma solução de pGEM16SrDNA quantificado usando o Nanodrop ND-1000 (Roche). Com base na quantificação inicial foram estabelecidos valores dos títulos de cada diluição e suas respectivas concentrações em ng/μl. Estes valores posteriormente inseridos no “Sequence Detection Software” - SDS do ABI 7500 para obtenção da curva padrão. Os valores foram gerados pela curva padrão forneceram uma fórmula a qual serviu como base para os posteriores cálculos.

d) Amostra de referência

Bradyrhizobium japonicum foi cultivado em laboratório em meio de cultura específico e utilizado como referência para as análises comparativas de contagem por

UFC e qPCR. A determinação da qPCR de amostras desconhecidas é realizada somente com uma amostra previamente quantificada sem interferência de fatores adversos a seu desenvolvimento para relacioná-la às amostras de interesse.

2. Extração de DNA genômico de *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587

Foi utilizado o protocolo segundo (MARMUR, J. 1961) dobrando a quantidade de RNase nas reações. Células da estirpe *B. elkanii* SEMIA 587 foram cultivadas em meio YMB (“Yeast-Manitol-Broth”) durante 72 h a 140rpm, em constante agitação orbital. A suspensão contendo bactérias foi centrifugada a 12000xg por 30 min a 4°C. O sedimento foi lavado com solução salina (0,85%) para remoção de resíduos de meio de cultivo. Em seguida foram adicionados 20 mg/ml de lisozima, 10 mg/ml de RNase e SDS 20%, para lise da parede celular e da membrana plasmática e a degradação de RNA. Acetato de sódio 3M foi adicionado, seguido pela extração com a mistura de 24:1 de clorofórmio e álcool isoamílico. A precipitação do DNA ocorreu adicionando-se posteriormente um volume de isopropanol à amostra. As amostras foram centrifugadas a 15.600xg por 30 min a 4°C, e em seguida lavadas com etanol 70%. O DNA obtido foi seco a temperatura ambiente e dissolvido em 100 µl de água ultra-pura. Após extração, o DNA foi quantificado em Nanodrop e analisado em gel de agarose 0,8%. Os estoques de DNA permaneceram a -20°C.

3. Amplificação do DNA e purificação do produto de PCR

A reação de PCR qualitativo foi realizada utilizando-se 20 ng/µl de DNA genômico de *B. elkanii* em uma reação contendo: 2 mM de MgCl₂; 200 µM de dNTPs; 1U da enzima *Taq* polimerase; 2µl de tampão de reação [10x]; 5pmol de cada oligonucleotídeo iniciador fD1 e rD1, contendo a seqüência de bases conforme descrito por (WEISBURG et al. 1991): 5'-ccgaattcgtcgcacaacAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' e 5'-cccgggatccaagcTTAAGGAGGTGATCCAGCC-3', para fD1 e rD1 respectivamente. As condições da PCR consistiram de: 1) 94°C por 5 min; 2) 35 ciclos de 94°C por 30 s

(desnaturação das fitas de DNA), 56°C por 40 s (pareamento) e 72°C por 90 s (extensão); 3) 72°C por 5 min. A reação foi conduzida em um termociclador, e ao término as amostras foram analisadas em gel de agarose 1%.

A purificação do produto amplificado foi realizada para eliminar possíveis restos de reação que poderiam interferir no posterior seqüenciamento. O produto foi purificado utilizando-se o Kit GFX (GE Healthcare), seguindo as recomendações do fornecedor, e ressuspensos em 20 µl de água ultra-pura.

4. Reação de ligação

O produto de PCR purificado foi utilizado para a reação de ligação utilizando-se o vetor pGEM-T Easy (Promega), o qual apresenta gene de resistência a ampicilina (Amp^r), origem de replicação (ori), região *lacZ* (permite seleção de recombinantes) e é preparado para posterior digestão com *EcoRI* (Figura 07). A reação de ligação foi realizada utilizando os parâmetros [1:1] para inserto:vetor (50 ng/µl); 5 µl de tampão de reação [10x] e 1 µl de T4 ligase (3 U/µl). A reação foi mantida a 4°C em termociclador, por 16 h.

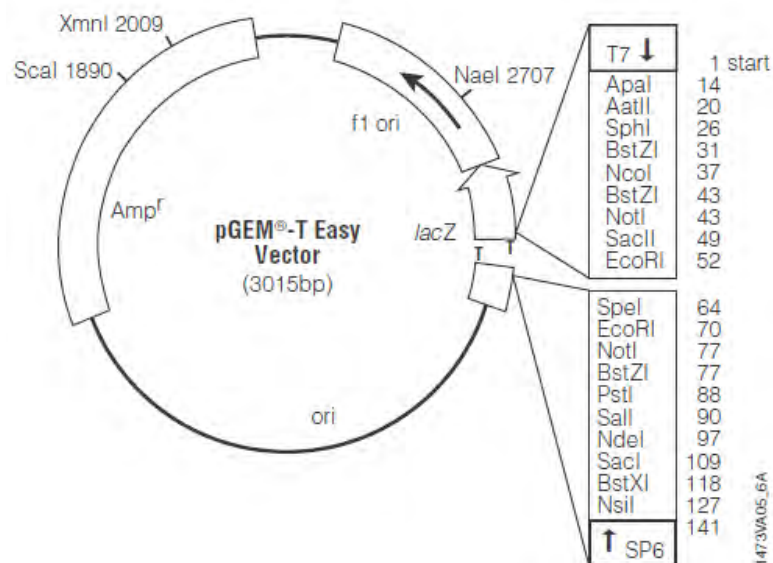


Figura 07: Ilustração do vetor pGEM-T Easy (Promega).

5. Transformação em célula competente de *Escherichia coli* DH5α através de choque térmico.

O produto da ligação foi adicionado a um tubo estéril contendo 200 µl de célula competente (*Escherichia coli* DH5α). A mistura foi gentilmente homogeneizada e incubada em gelo por 15 min. As células foram aquecidas em banho a 42 °C por 90 s, e imediatamente colocadas sobre o gelo por 2 min. Posteriormente foram adicionados 800µl de meio SOC e incubou-se a reação a 37 °C, em constante agitação de 220 rpm. As células foram cultivadas em placas de meio de cultura sólido LB (Luria-Bertani) contendo 50 mg/ml de ampicilina, 100 µl/placa de IPTG (isopropil-tio-β-D-galactopiranosídeo) 100 mM e 100 µl/placa de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-α-D-galactosídeo / 40 mg/ml em dimetil-formamida). As placas foram incubadas a 37 °C durante 16 h.

Após incubação, as colônias brancas foram selecionadas fenotipicamente entre as azuis e os clones transformados foram repicados em tubo estéril contendo meio de cultura líquido LB, mantidos em constante agitação orbital de 220rpm a 37 °C durante 22 h. Após o tempo de incubação, uma alíquota de cada clone foi transferida a tubos contendo glicerol 40%, imediatamente congelados com nitrogênio líquido e estocados a -80 °C. As células restantes foram centrifugadas a 15.600xg por 15 min a 4 °C, lavadas com solução salina (0,85%) e novamente centrifugadas, como descrito anteriormente, para proceder-se a extração de DNA.

6. Extração de DNA plasmidial

As células sedimentadas foram ressuspensas em 100 µl de solução GET gelada (50 mM glicose; 23 mM Tris-HCl – pH 8,0; 10 mM EDTA) contendo RNase (10 mg/ml) para degradação de RNA. Em seguida foram adicionados 200 µl de solução de lise celular preparada no momento da extração (0,2 N NaOH / 1% SDS). Após suave agitação, adicionou-se 150 µl de KOAc 3M para precipitação do DNA plasmidial e em seguida as amostras foram mantidas em gelo por 5 min. As amostras foram

centrifugadas a 15.600xg, por 5 min a 4°C, e posteriormente, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. O DNA plasmidial foi precipitado com 1 volume de isopropanol misturado por inversão dos tubos. As amostras permaneceram em temperatura ambiente após centrifugação por 2 min, e em seguida procedeu-se uma nova centrifugação como já descrito. O sobrenadante foi descartado e 1 ml de etanol 70% gelado foi adicionado para lavar o DNA de possíveis resíduos de soluções anteriores. Após este procedimento, o DNA plasmidial foi seco a temperatura ambiente por 10 min e, em seguida, ressuspendido em 30 µl de água ultra-pura e estocado a -20°C. As amostras foram analisadas em gel de agarose 0,8%.

7. Análise de restrição dos clones obtidos

A confirmação da clonagem foi realizada numa reação de restrição dos plasmídeos isolados utilizando-se a enzima *EcoRI* (BioLabs) para liberação do inserto. A reação continha: 180 ng do DNA plasmidial; 14 U da enzima *EcoRI* (1U é a quantidade suficiente para digerir 1 µg de DNA em 1 h nas condições de temperatura e tampão específicos); 2 µl do tampão de reação [10x] (BioLabs), com um volume final de 15 µl de reação. A reação foi conduzida a 37°C por 3 h e analisada em gel de agarose 1%.

8. Reação de PCR e sequenciamento do inserto 16S rDNA

As reações de seqüenciamento foram realizadas utilizando os oligonucleotídeos iniciadores específicos para o inserto 16S rDNA (fD1 e rD1) e os específicos para a região flanqueadora do inserto, oligonucleotídeos T7 e SP6 “forward” e “reverse”, nas condições apropriadas para um. Para os oligonucleotídeos fD1 e rD1 a reação continha: 5 pmol de fD1 ou rD1; 90 ng ou 60 ng do produto clonado (duas reações); 1 µl de DYEnamic (reagente terminador fluorescente para sequenciamento) e tampão de reação. A reação com os oligonucleotídeos iniciadores T7/SP6 continha: 5 pmol de cada oligonucleotídeo; 0,5 µl de DYEnamic; 90 ng do produto clonado e tampão da

reação. As reações totalizaram um volume de 10 µl cada e conduzidas em termocicladores seguindo os ciclos de cada reação separadamente. A reação para fD1 e rD1 contou com 35 ciclos consistindo de 95°C por 20 s (desnaturação); 56°C por 30 s (pareamento) e 60°C por 2 min (extensão). A reação com os T7/SP6 contou com 40 ciclos consistindo de 95°C por 20 s; (desnaturação); 50°C por 15 s (pareamento) e 60°C por 2 min (extensão). Após amplificação, as amostras foram precipitadas com 80 µl de isopropanol 75% e lavadas com 180 µl de etanol 70%. O produto foi seco em temperatura ambiente durante 1 h. Em seguida adicionou-se 9 µl de Hi-Di-Formamida para desnaturação das fitas de DNA a 95°C por 5 min, e imediatamente as mesmas foram mantidas no gelo por 5 min. O seqüenciamento automático foi realizado em um aparelho 3700 DNA Analyser ABI Prism (Applied Biosystems).

9. Análise do seqüenciamento

Os dados do eletroferograma gerado pelo seqüenciador foram analisados pelo programa PhredPhrap (EWING et al. 1998; EWING & GREEN, 1998) e Consed (GORDON et al. 1998). Os mesmos geram seqüências FASTA, que possibilitam seu alinhamento. As seqüências FASTA submetidas foram comparadas através da ferramenta BLASTN com o banco de nucleotídeos depositados no “Rhizobase” – “The Genome Database for Rhizobia”.

10. Oligonucleotídeos iniciadores para a qaPCR

Os oligonucleotídeos iniciadores para a qaPCR foram desenhados pelo alinhamento das seqüências de 16S rDNA presentes do banco de dados “Rhizobase” com o programa Clustalx. Parte da região consenso entre os bradirrizóbios foi selecionada e submetida ao programa “Primer Express software”, versão 2.0 (Applied Biosystems Foster City, EUA). Os oligonucleotídeos foram sintetizados pela “Bioneer Oligo Synthesis”. A seqüência foi a seguinte: 1) RT16SrRNA-F: 5'-TTAGCCGTCGGGCAGTTTAC-3'; e 2) RT16SrRNA-R: 5'-

CCCAGGCGGAATGTTTAATG-3', o que amplifica a região *16S rDNA* no DNA genômico bacteriano.

11. PCR qualitativo para validar o RT-*16S rDNA* usado na qPCR

Foi realizada uma PCR qualitativa para validar o par de oligonucleotídeos iniciadores *16S rDNA* antes de usar nas reações de PCR em tempo real. Foram utilizados diferentes concentrações de DNA genômico de *B. elkanii* SEMIA 587, a saber: 20, 10 e 5 ng; 200 µM de cada dNTP; 2,5 µl de tampão de reação [10x] (Fermentas); 1,5 mM de MgCl₂; 0,5 U da enzima *Taq* polimerase (produzida no LBMP – Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas) e 0,2 uM ou 0,4 uM dos oligonucleotídeos. As reações foram realizadas em réplicas. As amostras permaneceram em termociclador utilizando o programa: 1) 94°C por 5 min; 2) 35 ciclos de 94°C por 30 s, 56°C por 40 s e 72°C por 90 s; 3) 72°C por 5 min. Para as reações utilizando-se DNA plasmidial como molde, as quantidades do mesmo foi de 10 e 5 ng, mantendo-se as demais condições da reação. Ao término de cada reação, as amostras foram analisadas em gel de agarose 2%.

12. Otimização da reação por PCR quantitativo em tempo real para o oligonucleotídeo iniciador *16S rDNA*

A análise dos oligonucleotídeos iniciadores foi realizada por amplificação em PCR em tempo real nas seguintes concentrações: 100, 200, 400, 600 e 800 nM. A reação de PCR para validar o RT-*16S rDNA* foi também analisada em gel de agarose 2%. As amostras amplificaram com sucesso a região *16S rDNA*. A concentração de DNA plasmidial pGEM16SrDNA molde, variou entre 501,3 ng/µl à 0,23 ng/µl, e as condições de amplificação ocorreram conforme o aparelho ABI 7500: 1) 40°C por 2 min; 2) 95°C por 10 min; 3) 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 min (Applied Biosystems).

13. Curva de dissociação

A especificidade do oligonucleotídeo iniciador é especialmente importante quando a PCR em tempo real está associada com SYBR Green I. Este corante intercalador não é específico e detecta todos os fragmentos de DNA dupla fita como dímeros de oligonucleotídeos ou produto de amplificação de DNA não específico a partir de outras linhagens. Dissociações são geradas no fim da qPCR por aumento progressivo da temperatura na reação, calculando a proporção de emissão da fluorescência do repórter, obtendo o nível de especificidade do oligonucleotídeo indiretamente através da desnaturação do amplicon gerado.

14. Estabelecimento da curva padrão para quantificação absoluta por PCR em tempo real

A curva padrão foi gerada pela amplificação do gene *16S rDNA* a partir do inserto pGEM16SrDNA nas diluições seriadas com fator de [1:3], como ilustra a tabela 01. As diluições seriadas de [1:3] partiram da quantificação inicial do pGEM16SrDNA pelo Nanodrop. Com base na quantificação inicial foram estabelecidos valores dos títulos de cada diluição e suas respectivas concentrações em ng/μl, valores posteriormente inseridos na planilha do “Sequence Detection Software” (SDS) do ABI 7500 (Applied Biosystems) para obtenção da curva padrão. Os dados gerados pela curva padrão forneceram uma reta padrão através de regressão linear, integrando os valores de Ct (“Cycle threshold”) no eixo das ordenadas e o logaritmo da concentração de DNA no eixo das abcissas. A fórmula da regressão linear desta reta-padrão ($y=mx + b$) serve como base para os cálculos posteriores na determinação de amostras desconhecidas.

Tabela 01: Diluição seriada do DNA plasmidial pGEM16SrDNA587 e seus valores de título e concentração submetidas à reação qPCR para confecção da curva-padrão.

pGEM16SrDNA587				
Nome	Diluição	Concentração	Fator	Título
P1	36 µl pDNA 557 ng/ul+4 µl água	501,3 ng/µl	3x	1
P2	10 µl P1 501,3 ng/ul+ 20 µl água	167,1 ng/µl	3x	0,33
P3	10 µl P2 167,1 ng/ul + 20 µl água	55,7 ng/µl	3x	0,11
P4	10 µl P3 55,7 ng/ul+ 20 µl água	18,56 ng/µl	3x	0,037
P5	10 µl P4 18,56 ng/ul + 20 µl água	6,19 ng/µl	3x	0,0123
P6	10 µl P5 6,19 ng/ul+ 20 µl água	2,06 ng/µl	3x	0,0041
P7	10 µl P6 2,06 ng/ul + 20 µl água	0,69 ng/µl	3x	0,00137
P8	10 µl P7 0,69 ng/ul + 20 µl água	0,23 ng/µl	3x	0,000457

15. qPCR do 16S rRNA presente no DNA genômico da amostra de referência para correlação com o número de células/ml determinado por UFC

Para determinação de amostras desconhecidas em quantificação absoluta, é preciso uma amostra previamente quantificada para relacioná-la às amostras desconhecidas. Uma amostra de *B. japonicum* foi submetida à análise de qPCR e nomeada de amostra referência. Para produzir a referência, *B. japonicum* esteve inicialmente cultivada em frasco de erlenmeyer de 500 ml com 150 ml de meio de cultura líquido YML autoclavado. O frasco com meio YML inoculado foi mantido em constante agitação a 140 rpm em agitador orbital onde a temperatura permaneceu à 28°C durante 48 h. Medidas de pH, densidade óptica e turbidez foram tomadas. Este primeiro cultivo consistiu no pré-inóculo.

O meio de cultura líquido YML foi preparado e colocado em frasco de erlenmeyer de 1L com um volume exato de 135 ml, autoclavado e resfriado em temperatura ambiente. Em seguida 15 ml do pré-inóculo foi adicionado ao meio fresco. O inóculo com 150 ml foi mantido em constante agitação a 140 rpm em agitador orbital onde a temperatura permaneceu em 28°C durante 48 h. Foi retirado desta cultura 1 ml para diluição seriada, e 30 ml para extração de DNA. Posterior ao seu cultivo, análises

bioquímicas, microbiológicas e determinação de número de células/ml por UFC foram realizadas. As células para extração de DNA foram lavadas com solução salina 0,85%, sedimentadas e congeladas à -20°C. A quantificação da amostra de DNA da referência foi realizada em Nanodrop e em seguida submetida à quantificação absoluta em tempo real.

16. Quantificação absoluta das amostras desconhecidas

As amostras desconhecidas foram submetidas à extração de DNA genômico conforme descrito e posteriormente, foram conduzidas a qPCR. As amplificações foram realizadas, em termociclador para PCR em tempo real (Applied Biosystems, 7500 Real Time PCR System), em triplicata para cada uma das amostras, utilizando-se 12,5 µl de Universal Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, EUA). A amplificação foi realizada iniciando-se com uma incubação a 50°C por 2 min, seguida de desnaturação a 95°C por 10 min e 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 60 s. Para verificação interna da reação foi utilizado um controle negativo, no qual não foi adicionado DNA. Os resultados das amplificações das amostras (valores dos Cts) pela qPCR foram analisadas no “Sequence Detection Software” (Applied Biosystems, Foster City, EUA).

17. Análise dos dados

Os resultados das amplificações das amostras (valores dos Cts) pela qPCR foram analisados no “Sequence Detection Software” (SDS) (Applied Biosystems, Foster City, EUA). Os pontos dos Cts gerados na PCR das amostras desconhecidas foram relacionados com os Cts da curva padrão, calculados por meio da equação de regressão linear da reta. Os valores das amostras foram calculados seguindo as recomendações da Applied Biosystems e LIVAK & SCHMITTGE, 2001. A determinação das quantidades de *16S rDNA* (ng/µl) nas amostras desconhecidas foi obtida pela

equação da curva padrão: $y=mx+b$, onde “y” corresponde ao Ct ; “m” representa a inclinação da curva e “b” corresponde ao ponto de intercessão dos eixos da curva.

Baseado no estabelecimento da curva padrão pelo pGEM16SrDNA por qPCR e das análises microbiológicas de qPCR da amostra de referência, foram determinados 3 parâmetros:

- a) nanogramas de *16S rDNA* em relação ao número de células/ml ;
- b) concentração ou rendimento de *16S rRNA* no volume (ml) da amostra inicial;
- c) porcentagem de *16S rRNA* presente no DNA total genômico.

De acordo com os parâmetros estabelecidos foi realizada a análise comparativa com as amostras de interesse.

O diagrama das etapas do experimento está ilustrado na figura 10.

Parte II- Aplicação da técnica de enumeração celular por qPCR em análises fisiológicas

1. Inoculantes

Para o teste de eficiência de nodulação foram utilizados diferentes amostras da formulação líquida que compõem inoculantes comerciais para soja (BioRhizo Soja), contendo células bacterianas das estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5079 e armazenados nos diferentes períodos nas condições apropriadas para comercialização (Figura 08). Para os estudos de associação simbiótica, foram utilizados sementes de soja cultivar M-SOY 8000RR, inoculada segundo recomendação do fabricante com inoculantes de 1, 2 e 4 anos a partir da data de fabricação. Um volume de 1 ml de cada inoculante foi retirado para posterior extração de DNA.



Figura 08: Inoculantes Comerciais para soja em diferentes períodos de armazenamento (BioRhizo Soja).

2. Ensaio de resistência à dessecação

Sementes de soja (*G. max*) foram inoculadas com formulação comercial líquida para soja sob diferentes tratamentos e em diferentes períodos de armazenamento. Foi adicionado ciclohexamida à mistura do inoculante junto às sementes. A ciclohexamida foi relatada pela primeira vez em 1946 por WHIFFEN, BOHONAS e EMERSON, sendo isolada de *Streptomyces griseus*. Nos eucariotes, o antibiótico ciclohexamida inibe a síntese de proteínas no citoplasma, e nos procariontes a síntese protéica é inibida por cloranfenicol e não pela ciclohexamida. As atividades da ciclohexamida estão relacionadas com seu alto poder de inibição da síntese de proteínas por impedir a liberação do t-RNA desacilado do sítio peptidil (P) do ribossomo dos eucariotes. Segundo STRYER (1998), a ciclohexamida inibe a síntese de proteínas, pois inibe a atividade da pepitil-transferase da subunidade 60S do ribossomo. A ciclohexamida não interfere em aspecto algum nas atividades normais de procariontes.

O ensaio de dessecação foi realizado conforme descrito por REVELLIN et al. (1993), adaptado para inoculante líquido.

Células de bradirrizóbios presentes nos inoculantes biológicos foram submetidas a diferentes períodos de dessecação sobre sementes de soja inoculadas conforme recomendado pelo fabricante na presença de ciclohexamida (1 mg/ml). Foi utilizado o inoculante comercial BioRhizo Soja com diferentes idades, a partir da data de fabricação, a saber 1, 2 e 4 anos. O ensaio de dessecação avaliou a aderência e sobrevivência das células quando incubadas sobre as sementes de soja por diferentes tempos. A observação das células viáveis se deu pela visualização de unidades formadoras de colônias em placas contendo meio “Yeast-Mannitol-Agar” (YMA). O plantio foi realizado em casa de vegetação com seis repetições (Figura 09).

Foram utilizados 50 g de sementes de soja misturadas à 300 µl de inoculante, 200 µl de ciclohexamida e 1500 µl de água estéril, em um recipiente de vidro, e em seguida homogeneizados. As sementes foram distribuídas em 4 recipientes de vidro estéreis (50 sementes cada) de 125 ml incubados em temperatura ambiente por 0, 4, 24 e 48 h. Para cada período de dessecação, 18 sementes foram retiradas para o estudo de nodulação em casa de vegetação (3 sementes por tubete). O cultivo das plantas de soja foi realizado em tubetes preenchidos com vermiculita autoclavada, com 6 repetições para cada tratamento, onde permaneceram 28 dias após plantio e inoculação. O ensaio de dessecação foi realizado com a ressuspensão das células sob 50 sementes. As sementes foram ressuspendidas em 2 ml de água estéril e procedeu-se a diluição seriada para posterior plaqueamento e contagem de células.

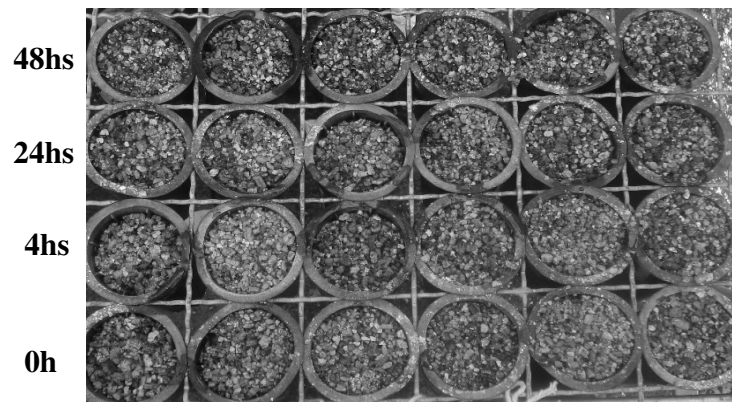


Figura 09: Plantio e cultivo de sementes de soja oriundas dos ensaios de resistência a dessecação.

3. Enumeração de células das amostras submetidas ao ensaio de dessecação pelo método de plaqueamento

Foram utilizadas amostras da ressuspensão de células referente a cada período de dessecação sobre sementes de soja. Para contagem do número de células/ml nas amostras, foi determinado a UFC, através do processo de diluição seriada, onde foram retirados 100 μl de cada amostra e adicionados a um microtubo estéril contendo 900 μl de água pura. A suspensão foi homogeneizada através de 05 pipetagens sucessivas originando uma solução 10^{-1} . Posteriormente, foram retirados 100 μl da solução 10^{-1} e misturados com 900 μl de água estéril, seguindo o procedimento descrito anteriormente originando a diluição 10^{-2} . O processo de diluição foi realizado sucessivamente até a obtenção da diluição 10^{-4} . Alíquotas de 100 μl das diluições 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} foram distribuídas em placas de Petri contendo meio YMA (VICENT, 1970). Este procedimento foi realizado em triplicata. Após a inoculação, as placas foram mantidas invertidas em B.O.D. a 28°C durante 10 dias, quando foi realizada a contagem das UFC para o cálculo do número de células/ml, o qual foi determinado através da fórmula: n° células/ml = n° de UFC x fator de diluição x 10.

O volume restante de cada amostra de células ressuspendidas, a partir das sementes de soja, foi sedimentado e lavado com solução salina (0,85%) para posterior extração de DNA.

4. Massa dos nódulos e isolamento de bacterióides

Inoculante líquido comercial para soja contendo as SEMIAs 587 e 5079, com data de validade de 24 meses, foi utilizado para inoculação em sementes de soja. O inoculante foi misturado à semente seguindo instruções do fabricante (100 – 300 ml/50 Kg sementes). Em seguida, as sementes foram plantadas em tubetes com substrato vermiculita previamente autoclavado. Em cada tubete foram plantadas 03 sementes com a mistura do inoculante, aguadas sempre com água destilada 03 vezes por semana, sem reinoculação durante 35 dias e o desbaste foi efetuado quando observamos necessidade, permanecendo assim, uma única planta por tubete. Dado o tempo de 35 dap (dias após plantio) as plantas foram colhidas da casa de vegetação.

O peso fresco dos nódulos produzidos foi determinado em balança analítica, e em seguida desinfestados. Os nódulos foram separados de forma a se ter apenas 01 único nódulo por tubo de 1,5 ml. Após a desinfestação dos nódulos, foram adicionados a cada amostra 50 mg de polivinilpolipirrolidona (PVPP – elimina compostos fenólicos liberados pela planta) e 01 ml de solução salina (0,85%) para maceração dos nódulos com auxílio de bastão de vidro estéril para extração e isolamento de bacterióides contidos em um nódulo. Posteriormente as amostras das células de bacterióide foram sedimentadas e congeladas em -20 °C para extração de DNA.

5. Extração de DNA das amostras desconhecidas e qPCR

As amostras selecionadas conforme descrito nos itens 1, 3 e 4 foram submetidas à extração de DNA genômico, a partir dos volumes determinados de cada amostra, modificado a partir de MARMUR, J. (1961). O DNA resultante foi conduzido a análise

por qPCR para dosagem do *16S rRNA*, em cada amostra desconhecida. As reações de qPCR foram realizadas em triplicata.

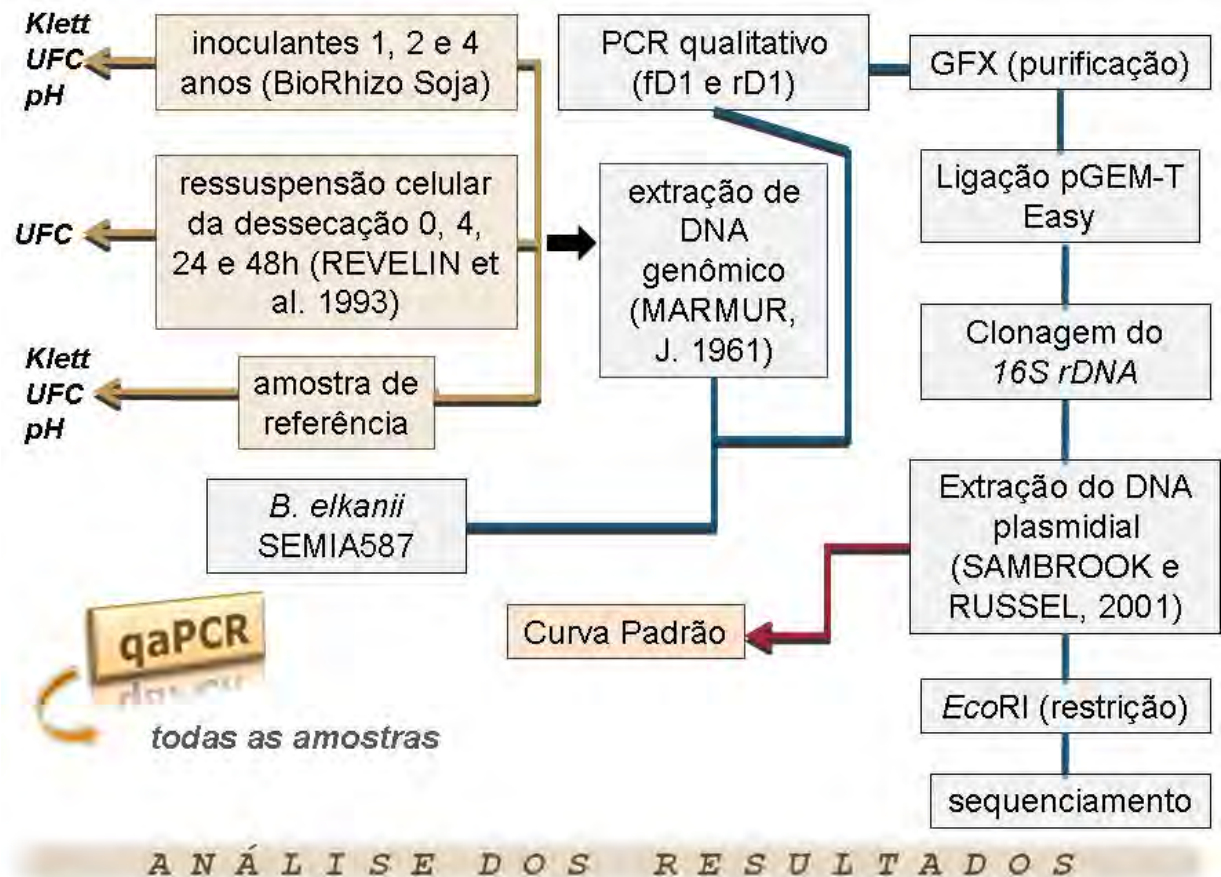


Figura 10: Diagrama ilustrando as etapas do experimento.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Parte I – Preparação do plasmídeo pGEM16SrDNA587

1. Análise da amostra de DNA genômico e do produto *16S rDNA*

O perfil eletroforético em gel 0,8% de agarose do DNA genômico de *B. elkanii* SEMIA587 está na figura 11A. O DNA genômico não apresentou contaminação por RNA e mostrou-se íntegro, após o processo de extração.

A amplificação da região do *16S rDNA* foi realizada com uma solução de DNA genômico na concentração de 20 ng/μl. O produto da PCR obtido foi uma banda única de 1,5 Kb não apresentando restos de reação como dímeros e fragmentos inespecíficos (Figura 11B).

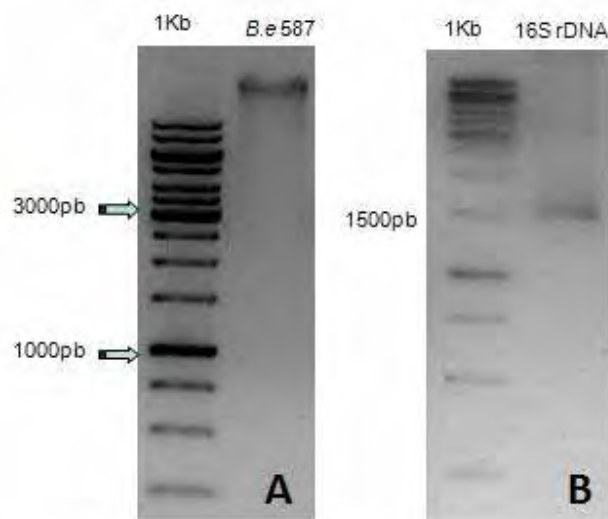


Figura 11: Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% da amostra de DNA genômico Be587 (A) e do produto *16S rDNA* amplificado por PCR (B).

2. Clonagem do 16S rDNA em vetor plasmidial

Após purificação do produto de PCR, foi realizado uma ligação em vetor pGEM-T Easy (Promega) e o produto ligado ao vetor foi inserido em célula competente de *E. coli* DH5 α . A transformação resultou em 05 clones, que foram coletados e estocados em glicerol 40% a -80°C. Uma alíquota dos clones foi utilizada para extração de DNA plasmidial. A qualidade do DNA plasmidial foi analisada em gel de agarose 0,8%. A extração plasmidial obteve êxito, sem contaminação de DNA genômico e/ou restos de reação.

Posteriormente, o DNA plasmidial foi utilizado em uma reação de restrição, utilizando a enzima *EcoRI* (Biolabs). Esta enzima permite a liberação do inserto, cuja presença ou ausência foi verificada através da visualização em gel de agarose 1%. Dos 05 clones iniciais, os clones 02 e 03 ilustrados na figura 12 foram selecionados para seqüenciamento, devido à presença do fragmento de 1,5 Kb e do vetor pGEM-T Easy (3015pb), confirmado assim êxito na ligação realizada anteriormente entre DNA e vetor de ligação (Figura 12).

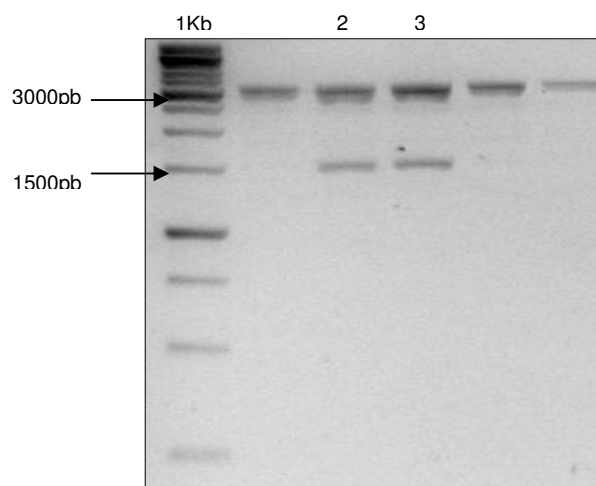


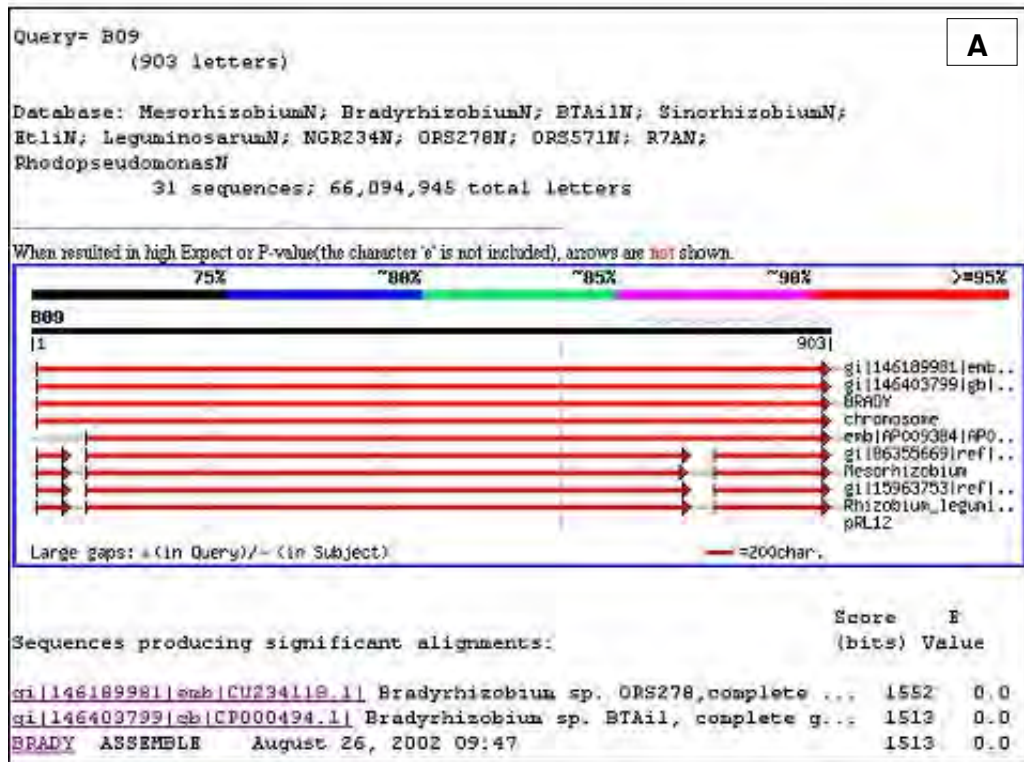
Figura 12: Perfil eletroforético da restrição dos clones 02 e 03 em gel de agarose 0,8%.

3. Sequenciamento automático e análise dos clones obtidos

A reação de PCR de seqüenciamento foi realizada com os oligonucleotídeos iniciadores do vetor (T7 e SP6) e do gene *16S rRNA* (fD1 e rD1). Por meio do programa BLASTN, que permitiu a comparação com seqüências de nucleotídeos já depositadas no banco de dados, foi constatado que a seqüência obtida possui 97% de identidade com *Bradyrhizobium sp* (Figura 13 B).

Os dados obtidos confirmaram o gênero da bactéria em estudo, uma vez que o DNA molde foi originado de *B. elkanii* (Figura 13 A). O plasmídeo contendo o gene *16S rDNA* clonado foi denominado pGEM16SrDNA587. A obtenção deste plasmídeo permitiu segurança de se conduzir a curva padrão de qaPCR com uma amostra de DNA molde contendo apenas uma cópia do gene alvo por replicon.

A análise de alinhamento entre a seqüência consenso do *16S rDNA* dos diferentes rizóbios, com o fragmento deste gene clonado em vetor pGEM-T Easy (pGEM16SrDNA587) e o amplicon gerado por qaPCR é mostrada na figura 13 C. Este resultado mostrou similaridade entres estas seqüências e comprova que os oligonucleotídeos iniciadores desenhados para qaPCR alinham com o fragmento 16SrDNA clonado, o qual foi utilizado para confecção da curva padrão.



>gi|146189981|emb|CU234118.1| Bradyrhizobium sp. ORS278,complete sequence
Length = 7456587
Score = 1552 its (783), Expect = 0.0
Identities = 873/899 (**97%**), Gaps = 3/899 (0%)

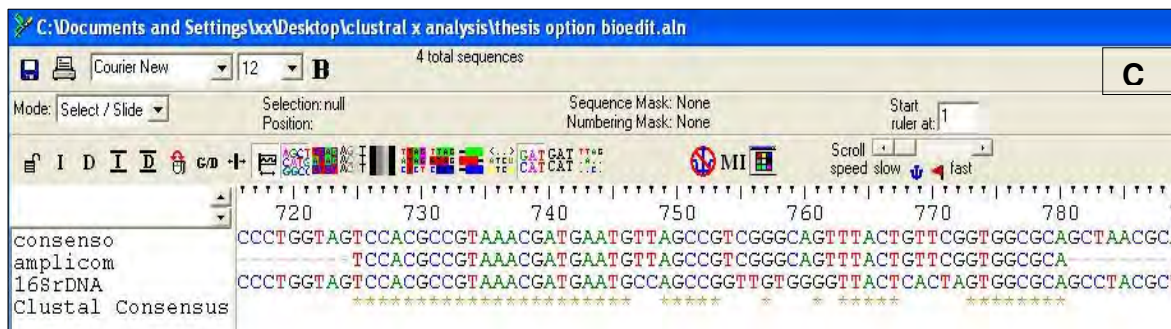


Figura 13: (A) Resultado do seqüenciamento do 16S rDNA pelo Rhizobase. (B) 97% de similaridade com *Bradyrhizobium sp.* (C) Alinhamento das seqüências 16S rDNA consenso, amplicon qPCR e do fragmento clonado em pGEM-T Easy, pelo programa Clustalx.

Parte II – Quantificação absoluta por PCR em tempo real (qaPCR)

1. Confecção da Curva Padrão através de pGEM16SrDNA587

O método qaPCR permite a determinação da quantidade absoluta de uma seqüência alvo de ácido nucléico de uma amostra desconhecida. Para a determinação de quantidades das amostras desconhecidas é preciso confeccionar uma curva padrão com quantidades pré-estabelecidas. Os valores fornecidos pela qaPCR das amostras desconhecidas são comparadas aos valores da curva padrão determinando a quantidade das mesmas com base na equação da curva. Plasmídeos são comumente utilizados para preparar um padrão absoluto. Neste trabalho, pGEM16SrDNA587 teve sua concentração determinada por outra ferramenta quantitativa, através da leitura em Nanodrop ND-1000. Posteriormente, foram realizadas diluições seriadas obtendo valores de todas as concentrações e títulos como fatores de diluição, resultando ao final, uma correspondência entre estes valores e um valor de Ct (“Cycle Threshold”) do início da amplificação na fase exponencial.

LIVAK e SCHIMITTEGEN (2001) afirmam que a quantificação absoluta determina o número de cópias de um alvo de interesse relacionando o sinal emitido pela PCR com os dados fornecidos pela curva padrão. Para GIULIETTI et al. (2001) os padrões são derivados de DNA plasmidial purificados, RNA transcrito *in vitro* ou ssDNA sintetizado *in vitro*. Os métodos correntes na produção padrão para a quantificação absoluta em tempo real podem ser tecnicamente tediosos (GIULIETTI et al. 2001), envolvendo clonagem molecular da seqüência alvo em sistema de vetor específico e amplificação em *E. coli*. Outrossim, pode-se dizer que a elaboração de curvas padrão para qaPCR é laboriosa e dispendiosa, mas, nunca tediosa.

LEONG et al. (2007) desenvolveram um estudo introduzindo outro método de quantificação absoluta para quantificar cópias de mRNA usando técnicas de PCR em tempo real que não envolvem etapas de clonagem molecular para obtenção de um padrão. Este método foi realizado utilizando fita dupla de DNA purificado após PCR convencional, contendo a seqüência do gene alvo. O mRNA do controle positivo foi

transcrito em cDNA e desenhados oligonucleotídeos iniciadores apropriados à região de interesse. A seqüência alvo foi amplificada pelo método de PCR convencional. O produto da reação de PCR foi confirmado em gel de agarose e a banda de interesse foi isolada do gel, submetida ao sequenciamento confirmando a seqüência alvo. Os produtos de dsDNA foram quantificados e diluídos através de diluição seriada para a produção da curva padrão. Os autores concluíram que a quantificação absoluta com PCR em tempo real resultou em melhor segurança do que a metodologia de PCR qualitativo. Por este método, não houve a necessidade de incorporar etapas de clonagem molecular no protocolo para quantificar a expressão gênica por qPCR por estes pesquisadores.

Contudo, utilizando qPCR a partir da clonagem molecular do alvo em plasmídeo, WHELAN et al. (2003) obtiveram um bom coeficiente de correlação ($R^2 = 0.9956$), e detectaram entre 8 e $1,6 \times 10^7$ moléculas de DNA plasmidial. LEONG et al. (2007) obtiveram $R^2 = 0.9964$, sem a realização de etapas de clonagem molecular para a construção de uma curva padrão, mostrando assim que a clonagem do alvo em plasmídeo é em muitos casos desnecessário.

YUN et al. (2006) utilizaram DNA genômico (gDNA) de amostras de tecido de camundongos para a confecção da curva padrão em PCR quantitativo, para validar a expressão de RNAm de genes identificados em microarranjos e determinar cópias de genes em células de camundongos transgênicos. Consideraram essencial confeccionar oligonucleotídeos altamente específicos para a seqüência alvo de interesse, isenta de introns, no caso de eucariotos. A curva padrão gerada apresentou $R^2 = 0.999$ e inclinação de -3.329. Desde que todas as seqüências de genes para uma dada espécie sejam representativos, gDNA serviu como um padrão universal para a quantificação absoluta de alguns genes expressos.

Enquanto gDNA têm a vantagem de representar uma fonte para inúmeros genes alvo, também contêm um excesso de seqüências não-alvo. Em contraste, plasmídeos ou cDNA padrões contêm uma soma relativamente pequena de seqüências não-alvo. A eficiência da qPCR é afetada pela complexidade de materiais nos quais o alvo é amplificado, tanto a quantidade como a composição de origem do DNA. A PCR em

tempo real é inibida em altas concentrações de gDNA. Nestas circunstâncias, os efeitos inibitórios podem ser superados pela fragmentação moderada do gDNA, a qual remove algumas de suas complexidades.

Com base nos resultados de YUN et al. (2006) testou-se inicialmente neste trabalho, construir uma curva padrão utilizando gDNA da bactéria *B. elkanii*. Contudo, os resultados obtidos não foram satisfatórios, já que não houve uma correlação entre as diluições seriadas e o decréscimo nos níveis de detecção das seqüências alvo, *16S rDNA*.

Neste trabalho, optamos pela clonagem molecular do gene *16S rRNA* de *B. elkanii*. Foi testado o método sem a clonagem molecular em plasmídeo, porém, ao clonar o gene os resultados apresentados foram melhores, uma vez que cada fragmento opera uma cópia.

TOLEDO et al. (2009) utilizaram o *16S rDNA* para a caracterização de rizóbios indicados para a produção de inoculantes, por meio do sequenciamento parcial deste gene, e afirmaram que a caracterização de estirpes da coleção que considera genes conservados e simbióticos é essencial para comparar e identificar os rizóbios nativos do solo brasileiro. Essa classificação pode ser realizada com marcadores moleculares. O produto do gene *16S rRNA* é o principal componente da subunidade ribossômica menor dos procariotos (BROSIUS et al. 1978), constituída por moléculas de ácido ribonucléico e proteínas, a qual é parte da maquinaria celular responsável pela síntese protéica. Este gene está presente em todas as bactérias, apresentando características conservadas ao longo da evolução, e pode servir como indicador de como os microrganismos evoluíram (OLSEN & WOESE, 1993). Gene do RNA ribossomal, em particular o *16S rRNA*, são usados extensivamente para identificar estirpes de bactérias em amostras ambientais complexas (THERON e CLOETE, 2000; RUDI et al. 2000).

Diversas técnicas baseadas no *16S rDNA* para quantificar bactérias são utilizadas, como a PCR em tempo real com o detector SYBR Green I, que provê um método sensível e preciso (HEIN et al. 2001; STUBNER, 2002; NEWBY et al. 2003; MORILLO et al. 2003; DE MÉDICCI et al. 2003). No presente trabalho, o DNA plasmidial pGEM16SrDNA587 foi utilizado para a construção da curva padrão para qPCR. A

concentração do DNA plasmidial foi determinada através de espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 e o valor fornecido foi de 557 ng/μl. O pGEM16SrDNA587 foi submetido a diluição seriada com fator de diluição [1:3], e a curva padrão (Figura 14) foi gerada pela amplificação de cada diluição, alcançando pontos de 167,1-0.69 ng/μl (Tabela 02). Valores de Ct foram determinados e plotados contra uma e com um coeficiente de regressão linear (R^2) 0.992498 e inclinação de -3.333453.

A molécula intercalante SYBR Green emitiu fluorescência repórter que foi determinada ao final de cada ciclo da PCR. O “cycle treshold” (Ct) é definido como o número do ciclo nos quais a reação inicia a sua fase exponencial de amplificação, cruzando o “threshold” (limiar) que é definido pela linha de início de sinais gerados. Em todas as reações foi utilizado o corante ROX como referência passiva, o qual normaliza a fluorescência presente no meio e a fluorescência do repórter. A eficiência da amplificação foi determinada pela fórmula:

$$E = (10^{(-1/slope)} - 1) \times 100\%$$

A eficiência é, entretanto definida através da inclinação da curva de -3.33, assumindo 100% de amplificação.

A eficiência de amplificação alcançada nas reações qPCR para a sequência alvo 16SrDNA587 clonada foi de 1,24 ($E= 1,24$), correspondendo a 124%. Segundo Pfaffl (2004), a eficiência da PCR deve ser de $E= 100 \pm 20\%$, correspondente a $-3,6 < \text{inclinação} < -3,1$. Assim, pode-se destacar duas propriedades importantes desta curva-padrão que nos permitiu obter resultados com alta confiabilidade e precisão:

Coeficiente de Correlação Linear (R^2)	Eficiência da amplificação (E)
0,9924	1,2497

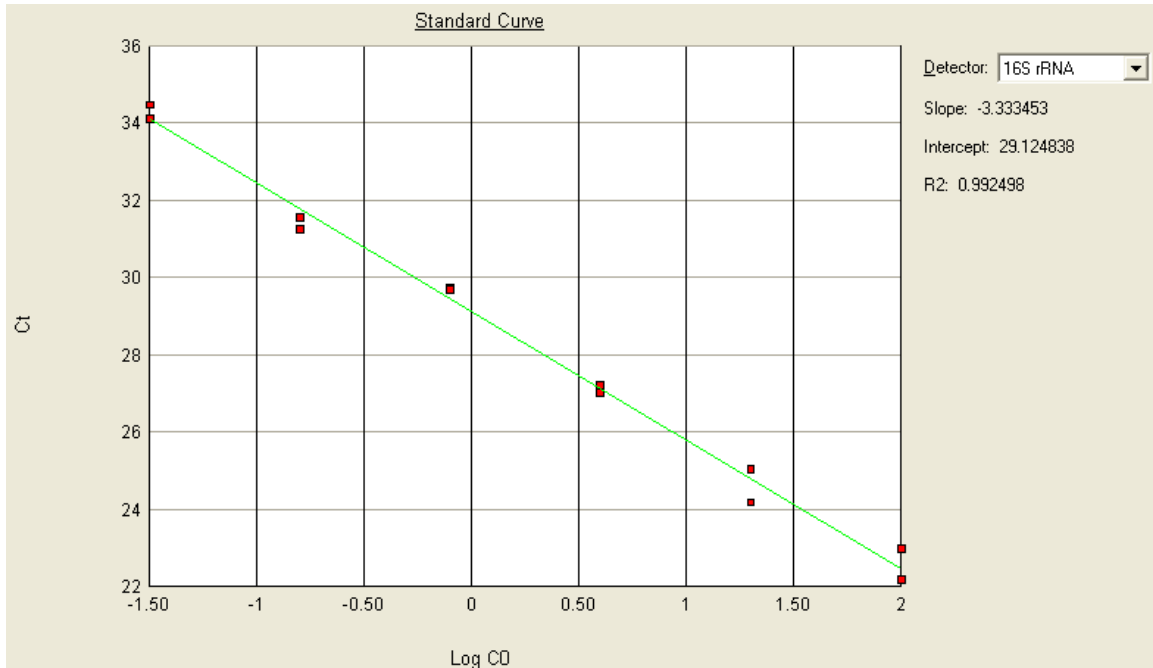


Figura 14: Curva padrão obtida na qPCR por diluição seriada de DNA plasmidial pGEM16SrDNA587.

Tabela 02: Resultados obtidos nas réplicas das diluições por qPCR para a curva padrão.

Padrão	Ct	Desvio Padrão	Título	DNA (ng/μl)	Tm
P7	34,11± 0,258	0,258	1,37E-03	0,69	78,4
P7	34,48± 0,258	0,258	1,37E-03	0,69	78
P6	31,57± 0,235	0,235	4,10E-03	2,06	78,4
P6	31,23± 0,235	0,235	4,10E-03	2,06	78,4
P5	29,73± 0,028	0,028	1,23E-03	6,19	78
P5	29,69± 0,028	0,028	1,23E-03	6,19	78,4
P4	27,01± 0,143	0,143	3,70E-02	18,56	78
P4	27,21± 0,143	0,143	3,70E-02	18,56	78
P3	24,17± 0,617	0,617	1,11E-02	55,7	78
P3	25,04± 0,617	0,617	1,11E-02	55,7	78
P2	22,98± 0,574	0,574	3,33E-01	167,1	77,7
P2	22,17± 0,574	0,574	3,33E-01	167,1	77,7

A fórmula da reta padrão determinada pelo cálculo de regressão linear para a curva padrão qPCR é,

$$y = mx + b$$

Na qual y representa o Ct, m é o valor da inclinação da curva, b é a intercessão dos eixos, e o valor de x determinará a concentração em escala logarítima da amostra de interesse. Os valores obtidos pela curva padrão gerada neste trabalho são representados pela equação da reta, a saber:

$$y = -3.333453x + 29.124838$$

A intercessão é o ponto onde o eixo do gráfico que define a concentração em valores logarítmicos, cruza com um determinado Ct no ponto zero da escala logarítima (abscissa), o qual apresentou o valor de **29.124838**. Valores dos dados dos gráficos de regressão foram exportados para a Microsoft Excel para uma análise somatória em termos de resultado, permitindo explorar e enriquecer os dados gerados pela qPCR através de outros métodos de confecção de retas padrão, não limitando a análise somente ao software em questão. Foram geradas quatro curvas, duas delas pelo software SDS e as outras duas pelo Microsoft Excel (Figura 15 e 16). Todas apresentaram coeficiente de regressão linear (R^2) ≥ 0.97 , portanto qualquer das curvas padrão poderia ser usada para quantificar as amostras desconhecidas. Utilizamos a Curva Padrão ilustrada na figura 14.

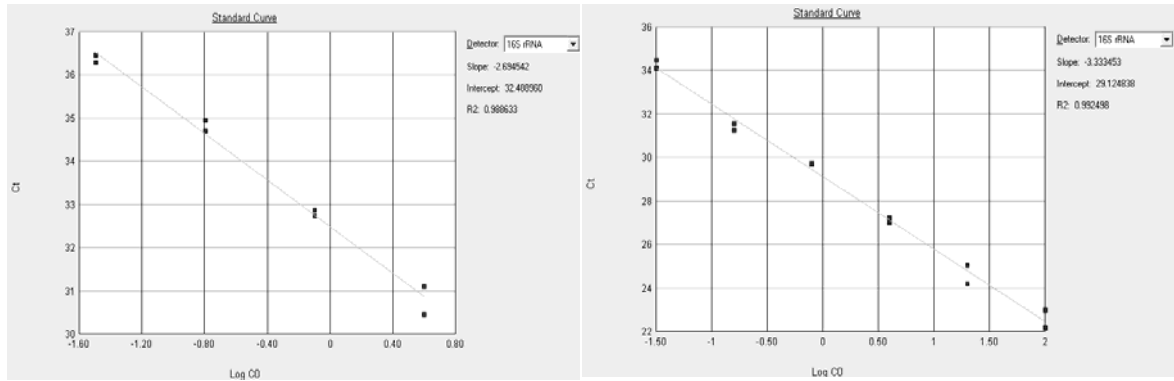


Figura 15: Curvas padrão obtidas pela diluição seriada de DNA plasmidial com fator de diluição de [1:3] pelo software SDS (Applied Biosystems).

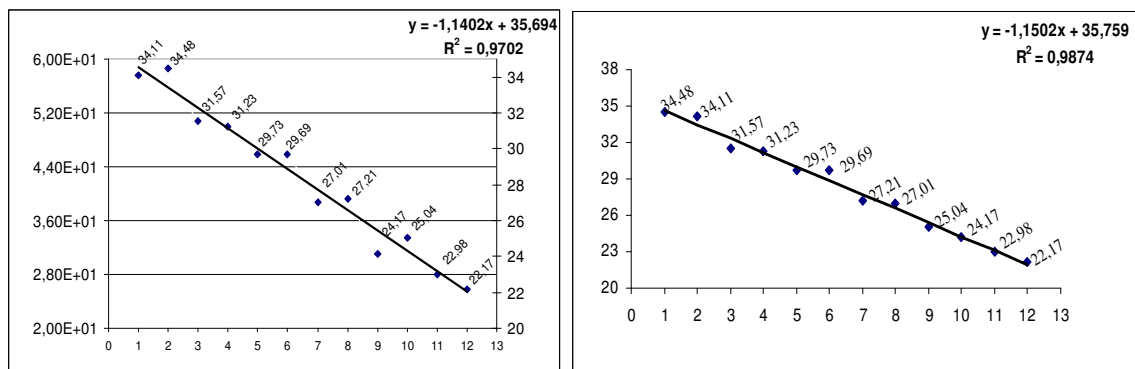


Figura 16: Curvas padrão obtidas pelos dados da diluição seriada do DNA plasmidial de [1:3] em Microsoft Excel.

2. Especificidade do par de oligonucleotídeos iniciadores RT16SrDNA utilizado na qPCR através da Curva de Dissociação

A especificidade do par de oligonucleotídeos RT *16S rRNA* foi analisada pela curva de dissociação gerada após reação de PCR em tempo real. O pico da curva ocorreu na temperatura de fusão de 78°C correspondendo a um único amplicon. A análise das curvas de dissociação após cada corrida de PCR em tempo real não revelaram outro pico, indicando que os oligonucleotídeos produziram apenas 1

fragmento de PCR (Figura 17). Também verificou-se qual a melhor concentração de oligonucleotídeo para o desenvolvimento da amplificação por qPCR (Figura 18). Tendo em vista que em 800 nM de oligonucleotídeo obtivemos menores valores de Ct (30), otimizamos as reações posteriores com 1000 nM de cada par de oligonucleotídeo. Quanto menor o Ct maior a quantidade de DNA utilizada na reação antecedendo a fase exponencial na PCR.

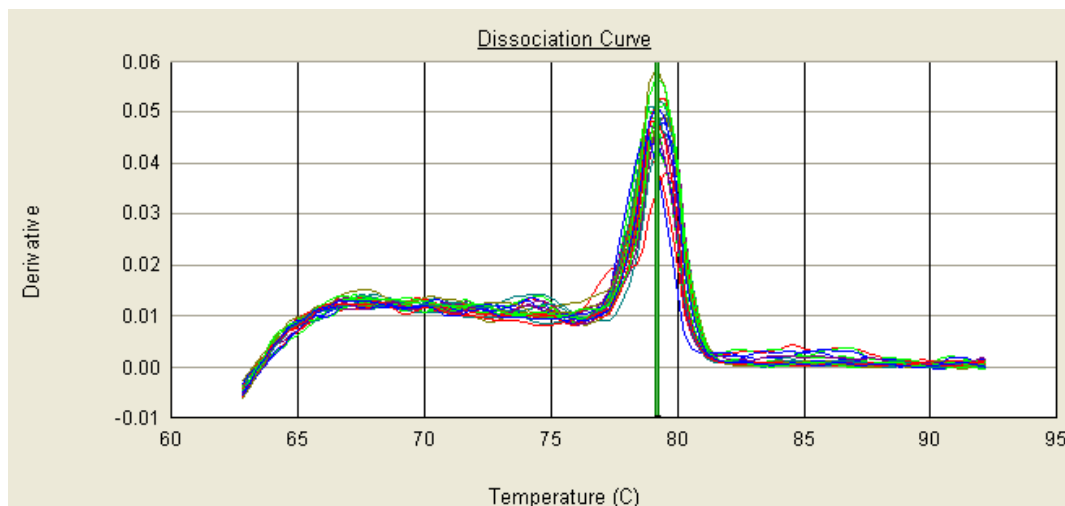


Figura 17: Curva de dissociação gerada para produto de PCR obtido com o par de oligonucleotídeos iniciadores RT16SrDNA.

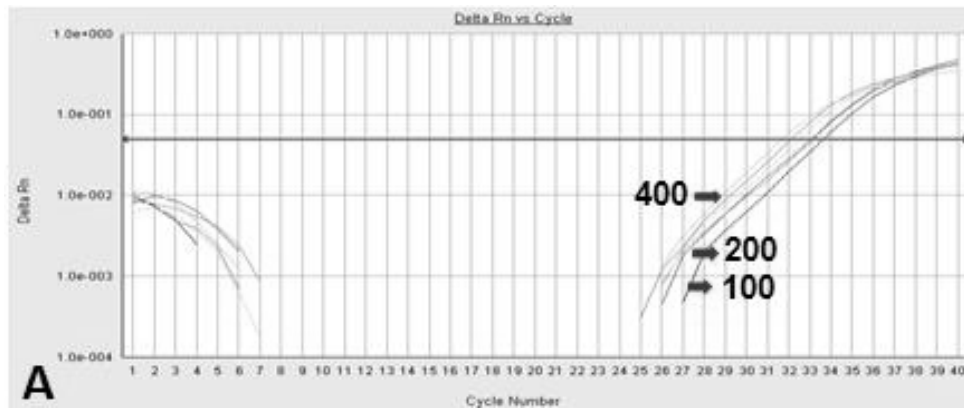


Figura 18: (A) Otimização do oligonucleotídeo RT16SrDNA à 100 nM, 200 nM e 400 nM.

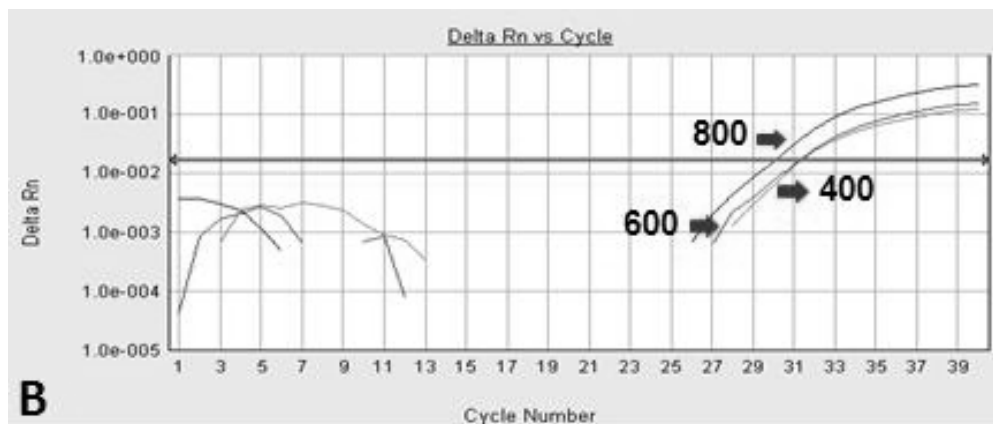


Figura 18: (B) Otimização do oligonucleotídeo RT16SrDNA à 400 nM, 600 nM e 800 nM.

3. Determinação do número de moléculas plasmidiais pGEM16SrDNA587

O gene *16S rRNA* utilizado neste trabalho vem sendo aplicado extensivamente, como discutido anteriormente, em análise filogenéticas por possuir regiões conservadas e variáveis, além de ser comum a todas as bactérias. Entretanto, um fato tem que sido observado é que múltiplas cópias deste gene estão frequentemente presentes em

determinadas bactérias. Estas cópias genômicas podem diferir em suas seqüências de DNA nas regiões distintas.

CASE et al. (2007) ao explicarem a existência de múltiplos operons do *16S rRNA* levantaram a hipótese de que esta ocorrência permite um efeito multiplicador na tradução, permitindo que uma bactéria cresça rapidamente em resposta a mudanças ambientais, e a diferenciação funcional entre operons de rRNA tem permitido a expressão diferencial de operons do rRNA também em resposta à mudanças ambientais.

DELROISSE et al. (2008) realizaram quantificação de bactérias presentes no trato gastrointestinal de ratos pela técnica de PCR em tempo real. O método foi desenvolvido baseado no *16S rDNA* para detectar e quantificar estas bactérias em amostra fecal. Os oligonucleotídeos iniciadores foram construídos com base nas regiões variáveis da seqüência do gene *16S rRNA* para detectar alguns grupos de microrganismos predominantes no trato gastrointestinal dos ratos. Concluíram que a PCR em tempo real é a técnica mais sensível e precisa para quantificação extensiva de *Bifidobacterium spp* e *Lactobacillus spp*.

Considerando estes fatores, além da determinação em ng/μl do DNA pGEM16SrDNA587 para as análises de amostras com concentrações desconhecidas, é importante ressaltar a necessidade de se conhecer o número de moléculas plasmidiais pGEM16SrDNA587 por microlitro de amostra. Uma vez que cada plasmídeo contém apenas um inserto, portanto, uma única cópia de *16S rDNA*, efetuou-se a determinação do número de moléculas plasmidiais para pGEM16SrDNA587 nas amostras utilizadas para confecção da curva padrão (YUN et al. 2006). Para este propósito utilizou-se a seguinte fórmula:

$$n^{\circ} \text{ de cópias DNA} = (x \text{ g}/\mu\text{l} / [\text{tamanho do plasmídeo em pb} \times 660]) \times 6,022 \times 10^{23}$$

x = concentração do DNA;

Tamanho do plasmídeo pGEM16SrDNA587 = 3015 pb pGEM T-easy + 1500 pb
16SrDNA = 4515 pb.

O número de moléculas ou cópias de pGEM16SrDNA587 nas diversas soluções está mostrado na tabela 03.

Tabela 03: Determinação do número de moléculas de pGEM16SrDNA587

Padrão	Nº de moléculas ou cópias de pGEM16SrDNA587 por microlitro	Fator de diluição calculado
P2	$3,3748 \times 10^{10}$	---
P3	$1,1256 \times 10^{10}$	2,9982
P4	$3,7386 \times 10^9$	3,0107
P5	$1,2509 \times 10^9$	2,9887
P6	$4,1629 \times 10^8$	3,0048
P7	$1,3944 \times 10^8$	2,9854

4. Quantificação do 16S rDNA nas amostras desconhecidas

A quantificação absoluta neste trabalho foi dada pela correlação direta entre ng/ μ l de DNA dos padrões determinados por qPCR e os Cts das amostras desconhecidas. Esta correlação corresponde a fórmula da regressão linear da reta padrão ($y = mx + b$), na qual “x” representa a concentração de DNA que se quer calcular, enquanto “y” corresponde ao Ct determinado pela qPCR.

Valores de Ct contra o logaritmo da concentração padrão dá uma relação linear e permite determinar a concentração de DNA de *B. elkanii* e *B. japonicum* nas amostras. Para controle negativo, o molde foi substituído por água. A curva padrão nos permitiu, por meio da equação da reta, correlacionar os dados e calcular o número de células/ml nas condições analisadas em nosso trabalho.

A unidade matemática resultante dos Cts das amostras desconhecidas quando calculadas pela regressão linear da curva padrão, é em concentração logarítima [\log (CO)], necessitando de transpor os valores que nos permite obter unidade em ng/ul. O cálculo para este procedimento segue a fórmula:

$$= 10^{\wedge} [\text{valor log da equação da reta}]$$

Este cálculo realizado no Microsoft Excel resultou na concentração em ng/ul das amostras desconhecidas. Obtendo valores de ng/ul, prosseguimos as análises para resultados em células/ml. Para determinar valores desconhecidos em quantificação absoluta foi preciso relacionar valores de uma amostra conhecida, que nos forneceu todos os resultados, como UFC, quantidade de DNA, volumes inicial e final corretamente obtidos. Com estes valores, o Ct desta amostra foi inserido na equação da reta, gerando resultados comparativos ao final dos cálculos com as amostras de interesse.

Com este propósito, o número de células/ml foi determinado para uma amostra de referência *B. japonicum* SEMIA5079 através de contagem de UFC. Esta amostra de referência foi submetida à extração de DNA genômico e teve seu *16S rDNA* determinado por qPCR (Figura 19) comparado aos valores obtidos na curva padrão confeccionada com pGEM16SrDNA587.

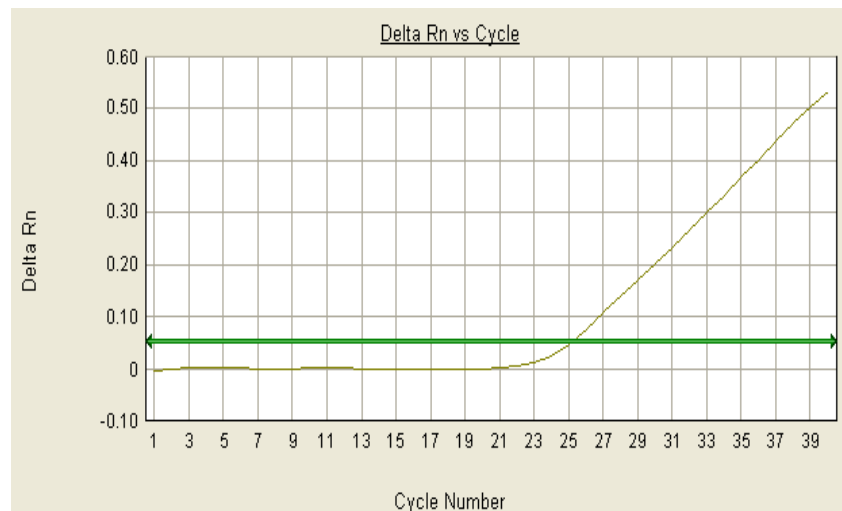


Figura 19: Gráfico de amplificação da qPCR da amostra de referência.

Os resultados obtidos estão na tabela 04.

Tabela 04: Quantificação de *16S rDNA* em *B. japonicum*.

Referência	Células/ml	DNA total (ng/μl) Nanodrop	Ct	16S rDNA (ng/μl) qaPCR	n° cópias do 16S rDNA / μl
Células	$1,14 \times 10^{10}$	---	---	---	---
gDNA	---	147,62	25,18	0,65553	$1,32 \times 10^8$

O valor correspondente ao Ct (25.18) foi submetido à fórmula da equação da reta e em seguida convertimos o valor dado, $\log(CO)$, resultando em 0,65553 ng/μl de *16S rDNA* na amostra de referência. A quantidade de *16S rDNA* na cultura é igual a 13,1106 ng em 30 ml do volume inicial da cultura de referência utilizadas na extração de DNA.

Em 1 ml de cultura têm 0,43702 ng de *16S rDNA*. Relacionando os dados de PCR em tempo real e UFC para a amostra de referência obtivemos três conclusões importantes para o delineamento das análises das amostras desconhecidas:

- (i) 30 ml de suspensão bacteriana continha 13,1106 ng de *16S rDNA*;
- (ii) $1,14 \times 10^{10}$ células têm 0,43702 ng/ml de *16S rDNA* pelo real-time;
- (iii) $2,96 \times 10^{-4}\%$ de *16S rDNA* que corresponde à 0,3% de DNA total na concentração fornecida pelo nanodrop.

Com base nestes 03 resultados qualquer amostra desconhecida pode ter seus valores de concentração, % de *16S rDNA* e número de células definido.

5. Análises qualitativa e quantitativa de inoculantes líquidos comerciais puros

Os inoculantes utilizados neste trabalho consistem em células de *B. elkanii* e *B. japonicum*, mantidas em uma formulação nutritiva a base de aminoácidos, sulfato de magnésio, fosfato monopotássico, glicose, sacarose, água deionizada, polímero, extrato de levedura, cloreto de sódio e Fe-EDTA. A formulação líquida pura é chamada de caldo puro.

5.1 pH dos inoculantes

Os inoculantes utilizados no ensaio de dessecação (1, 2 e 4 anos) foram submetidos às análises de acidez, turbidez e densidade óptica, pois com o tempo podem sofrer alterações fisiológicas e bioquímicas no meio que os compõem. MAURICE et al. (2001), relatam que células envelhecidas apresentaram alterações em suas propriedades fisiológicas, com base na relação bioquímica de matéria/carbono/nitrogênio/proteínas.

O pH dos inoculantes não variou significativamente (Figura 20), mantendo-se entre 6,70 e 7,09 (pequena alcalinização), podendo, porém ocorrer alteração no estado fisiológico das células.

Rizóbios de crescimento lento tendem a alcalinizar o meio de cultura, enquanto os de crescimento rápido geralmente acidificam o meio. TAN & BROUGHTON (1981), sugerem que as mudanças de pH promovidas pelo rizóbio no meio de cultura são

devido a utilização preferencial de açúcares pelas estirpes de crescimento rápido seguida de excreção de ácidos orgânicos e de compostos de nitrogênio pelas estirpes de crescimento lento e conseqüente liberação de cátions. Ao contrário do esperado, as estirpes produtoras de ácido em meio de cultura não são mais tolerantes a acidez do solo NORRIS (1965), mas, seu crescimento rápido parece conferir certa vantagem competitiva na rizosfera devido à maior competição com outros microrganismos.

Estirpes de crescimento rápido e lento de rizóbios têm muito pouco em comum, tanto fisiológica como bioquimicamente. Uma teoria propõe que estirpes de crescimento rápido, produtoras de ácido, co-evoluíram com as tribos mais avançadas de leguminosas adaptadas aos solos mais novos e alcalinos das regiões temperadas. Estas estirpes foram, inicialmente, descritas como mais evoluídas por causa de sua faixa simbiótica estreita e seu requerimento por pH alto do solo, disponibilidade de nutrientes e carbono. Esta teoria tem sido corroborada pela presença de intermediários evolucionários que possuem características comuns tanto as estirpes de crescimento lento quanto às de crescimento rápido (MARTINS et al. 1997).

Bioquimicamente, rizóbios de crescimento lento e rápido diferem quanto ao metabolismo e excreção de vários compostos de carbono e nitrogênio. Rizóbios de crescimento rápido necessitam menos nitrogênio (tanto na forma NH_4^+ ou de NO_3^-) fósforo e potássio do que os organismos de crescimento lento. Em relação às fontes de nitrogênio, os organismos de crescimento lento metabolizam mais glutamato e α -cetoglutarato do que os organismos de crescimento rápido, enquanto o manitol é utilizado do mesmo modo por ambos. Enquanto os rizóbios de crescimento rápido utilizam seletivamente açúcares, os organismos de crescimento lento preferem compostos nitrogenados. As taxas de crescimento são decorrentes da eficiência destes organismos na utilização da maioria dos substratos.

MARTINS et al. (1997) isolando rizóbio capaz de nodular caupi, mostraram que a maioria das estirpes seguem tendência típica em relação a alteração do pH do meio, ou seja, as de crescimento rápido acidificam o meio enquanto as de crescimento lento alcalinizam. Em 1978, HALLIDAY já havia constatado que a produção de ácido ou base é conseqüência da fonte de carbono e não uma característica intrínseca do rizóbio, o

que sugere que o comportamento seja dependente do tipo de solo, quantidade e qualidade de nutrientes disponíveis. A preferência por uma fonte de carbono e/ou nitrogênio é uma particularidade dependente da estirpe. Rízóbios de crescimento lento apresentam uma maior variação dos padrões de utilização de carboidrato do que os de crescimento rápido. Bradirrizóbios utilizam hexoses (galactose, gluconato, glucose e manose). Contudo, entre os rizóbios de crescimento lento, existem exceções. Em 1990, PADMANABHAN et al. encontraram 7 isolados de *Bradyrhizobium* que, dependendo do carboidrato utilizado podem baixar o pH do meio. Dois isolados apresentaram este tipo de resposta com 5 diferentes carboidratos. Estes dados sugerem que estirpes de *Bradyrhizobium spp.* podem, dependendo das fontes de carbono e/ou nitrogênio, regular o pH do ambiente de acordo com os produtos excretados.

As estirpes de bradirrizóbios presentes nos inoculantes comerciais para soja, utilizados neste trabalho, apresentaram certa alcalinização quando estocados por longos períodos em relação ao inoculante de 1 ano (Figura 20). Estes resultados confirmam que os rizóbios de crescimento lento presentes nestas amostras tendem a alcalinizar o meio utilizando compostos disponíveis e excretando cátions, o que confere aumento de pH conforme o tempo de armazenamento e disponibilidade de nutrientes.

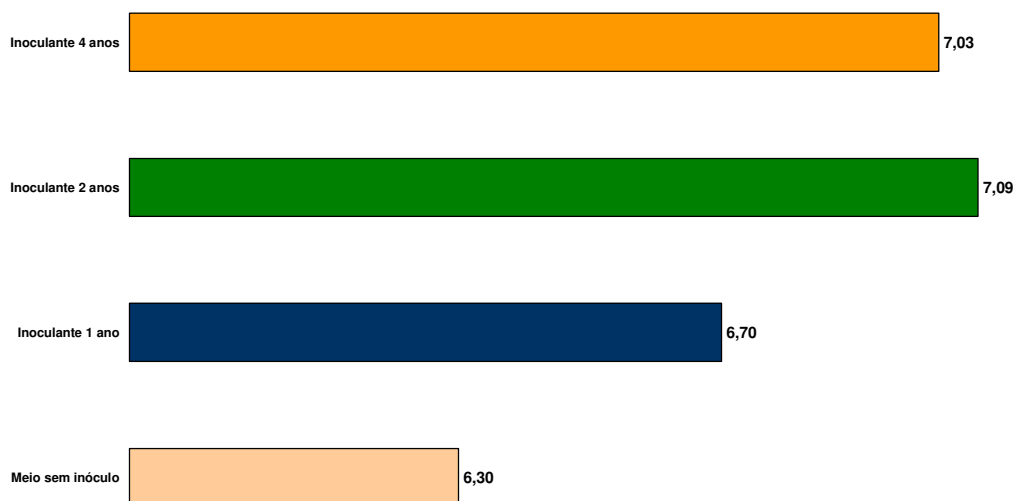


Figura 20: pH dos inoculantes comerciais para soja.

5.2 Medidas de unidades Klett dos inoculantes biológicos

Os inoculantes foram analisados quanto à turbidez através da leitura com filtro vermelho em um fotolorímetro Klett-Summerson (KLETT MFG). As unidades Klett nos inoculantes de 2 e 4 apresentaram um valor elevado em relação ao inoculante de 1 ano. Os inoculantes 1, 2 e 4 anos apresentaram 131, 300 e 345 unidades Klett, respectivamente (Figura 21). O fato de o inoculante de 4 anos apresentar maior turbidez levanta a hipótese de que inoculantes armazenados ao longo dos anos podem apresentar EPS (exopolissacarídeo) em quantidades altas. Quanto mais antigo o inoculante maior concentração de EPS este possui.

O inoculante 2 apresentou maior variação em relação ao inoculante de 1 ano, sugerindo que pode haver um número maior de células vivas, em VBNC, mortas, EPS, ou outros compostos no meio.

Colônias de rizóbios produzem muco butírico e muco viscoso. Isolados de crescimento lento que promovem a fixação de nitrogênio em soja compreende estirpes de *B. japonicum* produtoras de muco butírico e de *B. elkanii* produtoras de muco viscoso. De modo geral, os isolados produtores de muco butírico são capazes de acumular taxas maiores de nitrogênio em soja. Na maior parte das estirpes a quantidade de muco produzida coincide com o tempo de crescimento MARTINS et al. (1997). Este fator sugere que conforme o tempo de permanência das estirpes bacterianas nos inoculantes, a produção de muco é acentuada por cada uma delas, aumentando com isso a turbidez do meio, observada nas amostras em diferentes períodos de armazenamento (Figura 21).

A produção de polissacarídeos pode agir como uma barreira protetora contra fatores bióticos e abióticos, possibilitando a sobrevivência e persistência das bactérias no solo. O muco produzido pelas bactérias apresenta como componentes principais, os carboidratos EPS e CPS (polissacarídeo capsular) que interferem na passagem de substâncias para dentro da célula bacteriana. A consistência do muco é obtida a partir de meio de cultura, onde o carbono e o nitrogênio não devem estar limitando o crescimento celular.

O EPS extracelular pode aumentar a tolerância à dessecação, conforme sugerido por DEAKER et al. (2004) quando estudaram fatores que afetam a sobrevivência de bradirrizóbios em culturas líquidas aplicadas sobre sementes de soja. A resistência à dessecação induz algumas células a desenvolverem estratégias de sobrevivência que alteram sua fisiologia, quando submetidas às condições de estresse induzidas ou naturais (ex. inoculantes antigos). O efeito desta alteração leva muitas vezes a produção excessiva de EPS extracelular. Neste trabalho, o aumento de turbidez observado nas formulações comerciais líquidas, vem de encontro com estudos já realizados sobre dessecação, confirmando a hipótese levantada.

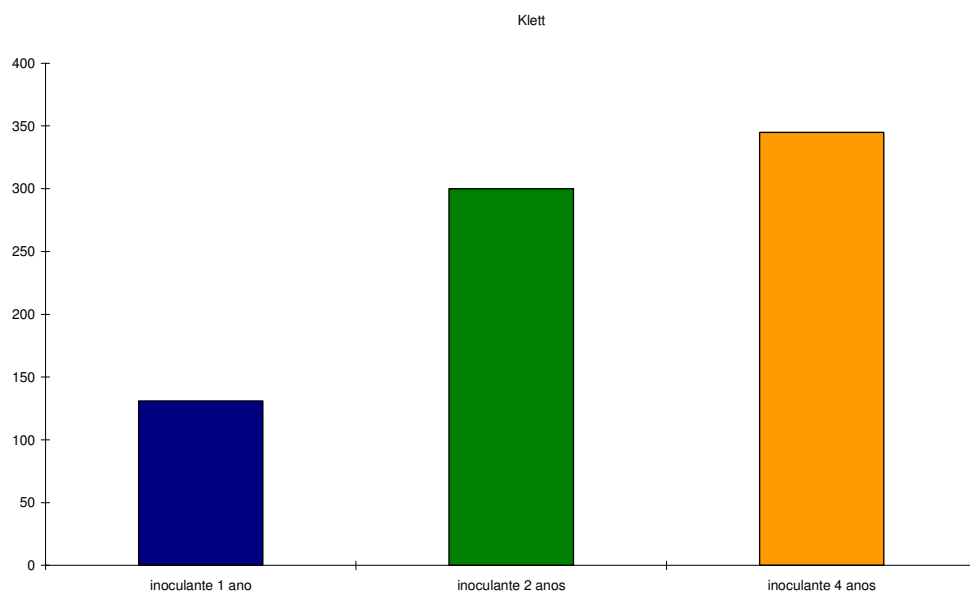


Figura 21: Análise da turbidez dos inoculante.

5.3. Número de células/ml de bradirrizóbios nos inoculantes

A quantidade de células viáveis por mililitro de produto foi avaliada em placas de meio de cultivo YMA (Yeast-Manitol-Agar). A contagem de células foi realizada por meio de diluições seriadas de cada inoculante puro utilizado neste experimento, por meio de UFCs (Tabela 05).

Cada inoculante utilizado neste trabalho também foi submetido à PCR em tempo real, e seus resultados analisados conforme as fórmulas descritas anteriormente. Cada Ct foi submetido à equação de regressão linear da curva padrão e uma vez encontrado seu valor na escala logarítmica, foi convertido em ng/μl de *16S rDNA*. A partir dos dados da amostra de referência encontramos o número de células/ml dos inoculantes puros, conforme ilustrado na tabela 06. Apenas foi possível quantificar os inoculantes 1 e 4, ilustrado no gráfico de amplificação (Figura 22).

O resultado do número de células/ml no inoculante 1 se apresentou nas devidas condições comerciais exigidas pelos órgãos fiscalizadores, embora seu prazo de validade tenha ultrapassado 6 meses. A segunda amostra apresentou alto número de células, ultrapassando a concentração mínima recomendado para comercialização do produto. Houve um pico na quantidade de células do inoculante 2, fato que foi relacionado com o número de nódulos no ensaio de dessecação. Uma das estratégias de sobrevivência das células provavelmente é aumentar em número para resistirem viáveis por maior período de tempo.

O inoculante de 1 ano apresentou um número elevado de células, ultrapassando o limite indicado pelos órgãos fiscalizadores, devido ao prazo de validade estar vencido. Embora tenha grande número de células/ml, estas, puderam ser quantificadas pela qPCR, considerando que esta quantificação pode indicar células vivas ou em VBNC e até as que já morreram, pois os resultados de UFC (não apresenta incultiváveis), apresentou um valor consideravelmente inferior ao do PCR em tempo real.

O DNA do inoculante de 2 anos possivelmente excedeu o limite de detecção pelo aparelho de PCR em tempo real, impossibilitando sua análise por meio do Ct. Isso confirma todos os resultados sobre as condições verificadas nesta amostra, como alto número de células na contagem por UFC, ilustrado nas tabelas 01 e 02, e também a eficiente nodulação nas plantas de soja observadas em casa de vegetação, resistindo à dessecação por período de tempo de até 48 h. Neste inoculante, passado 2 anos do seu prazo de validade, possivelmente ocorreu uma indução genética das células bacterianas a utilizarem as reservas nutricionais disponíveis no meio, preparando-as para resistir a posteriores condições adversas.

O inoculante 4 apresentou número reduzido de células através da contagem por UFC, não indicando, portanto, número viável das mesmas para ser comercializado. Conforme já descrito por (MAURICE et al. 2001), bactérias gram-negativas podem entrar em estado de VBNC. A presença de células em VBNC ou a presença de células mortas será observada com maior clareza com posterior análise em dados de PCR em tempo real. Microorganismos em condições de estresse, segundo (CYTRYN et al. 2007), podem entrar neste estado, ou a morte acaba ocorrendo muitas vezes. O estado em VBNC é mais uma estratégia de sobrevivência de células a resistirem a condições de estresse. O estoque de inoculantes segundo estes autores, pode levar a morte, ou ao estado VBNC das células em muitos casos.

O aumento do número de células no inoculante de 2 anos se deu pelo fato de que provavelmente as células utilizaram as reservas do meio requeridas para seu desenvolvimento. As reservas no caldo e na própria célula serviram para o aumento em número das mesmas, possibilitando a sua sobrevivência por um maior período de tempo. A utilização dessas reservas diminuiu no inoculante de 4 anos, conseqüentemente diminuindo a quantidade de células no produto. As células de 2 anos utilizaram grande parte da reserva no meio e após 4 anos armazenado, o inoculante apresentou células mortas que serviram como nutriente para as células que ainda estavam vivas. Possivelmente devido a este e a outro fator como resistência das células apresentou nodulação eficiente, mesmo com inferior número de células em relação ao inoculante de 2 anos. A eficiência da nodulação e a posterior análise por PCR em tempo real poderá diferenciar se as células observadas por meio da contagem presentes no inoculante 4 estavam viáveis e/ou ocorre presença de não-cultiváveis.

A amostra do inoculante 4 foi a que apresentou um valor maior em relação à de 1 ano, indicando que as células em VBNC e as mortas certamente foram quantificadas, tendo em vista a eficiência de nodulação em casa de vegetação para este inoculante, porém os bacterióides não resistiram a períodos longos sob condição de dessecação.

Realizando uma análise comparativa entre as quantificações por UFC e qPCR, verificamos que a PCR em tempo real possibilita efetuar uma enumeração mais precisa

quantificando células bacterianas em estado de VBNC, o que é limitante pelo método de plaqueamento para contagem das UFC, ilustrado na tabela 05.

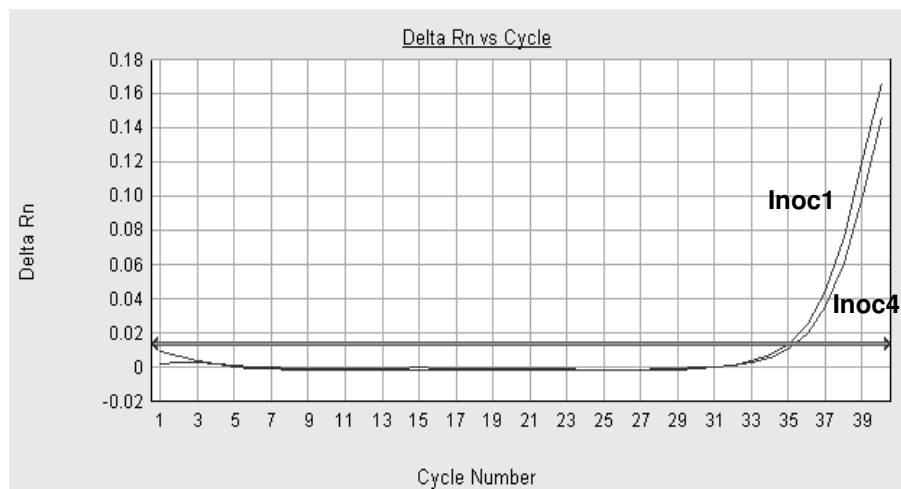
O protocolo de quantificação absoluta por PCR em tempo real apresentou melhor acurácia quando comparado a metodologia de PCR qualitativo. A qPCR mostrou alta sensibilidade e precisão nos resultados, possibilitando com isso, detectar células incultiváveis em meio de cultivo laboratorial. A qPCR é uma ferramenta viável na enumeração de células de inoculantes comerciais para soja, em casos de discrepância nos resultados por UFC nos laboratórios responsáveis pela análises dos insumos biológicos.

Um estudo paralelo sobre o metabolismo respiratório de *Bradyrhizobium sp* em condições de aerobiose, microaerobiose e anaerobiose em inoculantes comerciais para soja em casa de vegetação, avaliou a expressão gênica da cascata regulatória de entrada de oxigênio por quantificação relativa em tempo real. Observou-se que ocorre uma queda na expressão dos genes intimamente relacionados com o processo de fixação tais como *fixN*, *rpoN1*, *nifA* e *nifH*, decaindo a expressão a medida que aumenta o tempo de estocagem dos inoculantes. Concluiu-se que, a estocagem dos inoculantes por longos períodos pode ser inviável, pois a idade do mesmo esteve diretamente relacionada com a capacidade de funcionamento dos genes relacionados ao processo de fixação biológica do nitrogênio.

Os resultados de qPCR somados à quantificação relativa evidenciam que, as células alteram sua fisiologia e se adaptam a condições de estresse apresentando inclusive aparente eficiência na nodulação em casa de vegetação em inoculantes mais antigos por longos períodos sob dessecação. Assim, inoculantes com prazo de validade ultrapassando o indicado pela legislação, não devem ser utilizados pelo produtor, pois embora ocorra formação de nódulos não há fixação biológica de nitrogênio nas plantas de soja.

Tabela 05: Análise comparativa das diferentes quantificações realizadas

Análises	Inoculante 1 ano	Inoculante 2 anos	Inoculante 4 anos
Cél/ml (UFC)	$1,43 \times 10^9$	$3,32 \times 10^9$	$1,48 \times 10^8$
Cél/ml (qaPCR)	$3,60 \times 10^{10}$	---	$6,43 \times 10^{12}$
Ct	35	---	35,29

**Figura 22:** Gráfico da amplificação do *16S rDNA* por qaPCR das amostras dos inoculantes líquidos para soja.

6. Análises qualitativa e quantitativa de bradimirizóbios resistentes à dessecação sobre sementes de soja

As amostras de cada tratamento dos inoculantes sobre as sementes de soja foram ressuspensas em água estéril, onde posteriormente foi realizada análise de densidade óptica de cada uma.

O valor da D.O não esclarece o número exato de células, pois a técnica também mensura outros compostos, necessitando de uma posterior confirmação por contagem de células através de UFC. Para afirmar se a queda na D.O realmente está relacionada unicamente ao número de células, foi realizado a PCR em tempo real, que nos mostrou

com precisão o número exato de células sem interferência de possíveis compostos detectados na medida por absorvância.

A diferença no valor das D.O nas amostras conduzidas no ensaio de dessecação e o resultado obtido dos inoculantes puros devem-se ao fato de que existiam muitos resíduos das próprias sementes e do antifúngico utilizado que superestimaram o resultado, devendo ser considerados e descontados. Neste caso, a enumeração celular por métodos quantitativos eficazes são fortemente requeridos para uma avaliação acurada da eficiência destes produtos.

6.1. Número de células/ml dos bradirrizóbios resistentes à dessecação

Nesta análise de determinação do número de células, foram observados dados de células resistentes à dessecação, sobre sementes de soja, oriundas dos inoculantes líquidos comerciais em diferentes idades 1, 2 e 4 anos. O ensaio de resistência para cada inoculante foi efetuado em diferentes períodos, 0, 4, 24 e 48 h, antes do momento de ressuspensão das células para contagem das células sobreviventes (Tabela 06).

Os dados da tabela 06 indicam que as células resistentes à dessecação proveniente dos inoculantes 1 e 2 apresentam aproximadamente 20.000 células nas 50 sementes de soja, correspondendo a 1.000 células por semente, enquanto que o inoculante de 4 anos apresenta apenas 500 células em cada semente, quando determinado por UFC.

Com base nas conclusões obtidas pela amostra de referência, os dados das amostras desconhecidas foram, por conseguinte relacionados, resultando em número de células/ml sobrevivendo nas sementes de soja, quando submetidas ao estresse por dessecação, por qPCR (Tabela 06). Os dados das amostras referentes a 24 h nos inoculantes 2 e 4 não puderam ser gerados, devido a um fator experimental. Esta análise ampliou a contagem de células para amostras que não foram detectadas pelo método de diluição seriada para contagem de UFC.

A discussão do número de células/ml das amostras sob dessecação pelos dados de UFC no item 2.2, mostram a contagem da diluição em t=0 h sob dessecação

apenas, pois não foi possível quantificar as células bacterianas por UFC nas outras diluições. Este fato nos levou a comparação do número de células/ml em t=0 h das contagens de UFC comparando-as com os valores obtidos por PCR em tempo real.

STREETER et al. (2007), estudaram fatores que afetam a sobrevivência de bradimirizóbios em cultura líquida de soja aplicados em sementes. Bactérias em cultura líquida foram aplicadas em sementes de soja e o número de sobreviventes foi quantificado após 2, 24, 48 e 96 h, e observaram que o maior impedimento das estirpes de rizóbio é a rápida morte das bactérias quando aplicadas nas sementes ou no solo. O número de células/ml diminuiu das primeiras 2 h até 48 h de dessecação. O estresse por dessecação tem sido a principal causa de morte entre as bactérias nas sementes, e muitos estudos laboratoriais de estresse por dessecação e tolerância em rizóbios vem sendo estudados nos últimos 40 anos (VICENT et al. 1962; BUSHBY e MARSHALL, 1977; JANSEN VAN RENSBURG e STRIJDOM, 1980; MARY et al. 1986; KOSANKE et al. 1992; CLIQUET e CATROUX, 1994; VRIEZEN et al. 2006). Entretanto, poucos estudos envolvem a análise de sobrevivência nas sementes, alguns com adição de vários materiais durante a aplicação de culturas líquidas. STREETER et al. (2007) observaram que a adição de extrato de levedura no meio de cultura aumenta a sobrevivência das células nas sementes de 50 para 80 vezes (contêm 4,3% de trealose no extrato de levedura comumente usado nos laboratórios). A adição de NaCl no meio, duplica ou triplica a acumulação de trealose nas células, aumentando com isso a sobrevivência das mesmas. Adicionando NaCl e trealose juntos resultou em um efeito adicional, juntamente com a umidade relativa controlada, aumentando em 100 vezes ou mais as diferenças na sobrevivência das células bacterianas nas sementes.

A composição, segundo o fabricante, dos inoculantes comerciais para soja utilizados neste trabalho possui: solução nutritiva (aminoácidos, sulfato de magnésio, fosfato monopotássico, glicose, sacarose, água deionizada, polímero, extrato de levedura, cloreto de sódio, Fe-EDTA), *B. elkanii* e *B. japonicum*. Esta composição potencializa a resistência das membranas das células das estirpes bacterianas sob condições adversas extremas em sementes de soja por determinado período.

ROUGHLEY et al. (1993), realizaram um único estudo que se compara ao de STREETER et al. 2007. Em células de bradirrizóbios em sementes de *Lupinus* por meio de inoculante turfoso, foi observado morte de 95% das bactérias nas primeiras horas e 99% nas 22 h seguintes. Em muitos trabalhos de estresse por dessecação, os mecanismos básicos de morte bacteriana ainda não estão totalmente claros. Alteração na composição da membrana e permeabilidade tem sido sugerida como mecanismos potenciais de sobrevivência. Efeitos no potencial hídrico e no crescimento e morfologia celular têm sido também documentados (SALEMA et al. 1982; BUSSE e BOTTOMLY 1989; MARY et al. 1994). Sugere-se também que o aumento na produção de EPS aumenta a tolerância à dessecação (DEAKER et al. 2004). STREETER et al. (2003), observaram que aumentando a concentração de trealose em *B. japonicum*, aumenta a sobrevivência da bactéria nas sementes de soja. Em 2007, os mesmos autores estenderam esta prévia observação a outras estratégias para aumentar a sobrevivência das células bacterianas nas sementes.

Com base nestes estudos, o número de células/ml das amostras de ressuspensão celular nas sementes obtidas neste trabalho foi coerente com pesquisas realizadas avaliando estresse de rizóbios sob condições de dessecação, pois embora as células do inoculante 4 apresentassem número de células/ml menor do que os outros, ainda assim houve eficiente nodulação nos pêlos radiculares das plantas de soja. Células resistiram após 4 anos de armazenamento do produto, sendo viáveis em nodularem raízes de soja. Estas células resistiram à dessecação, pois provavelmente apresentaram estratégias de sobrevivência, conforme discutido anteriormente.

Para que a simbiose se estabeleça, através de um processo de nodulação bem sucedido, a bactéria necessita de condições adequadas para a sua sobrevivência, desde a saída da fábrica até o momento da inoculação. Muitas vezes essas condições não são atendidas, reduzindo o número de bactérias no inoculante (CAMPOS, 1999). Quando o inoculante é disponibilizado no solo, a bactéria deve alterar toda a sua maquinaria bioquímica tendo em vista as novas condições metabólicas a que será submetida no solo e no interior da planta (LODWING & POOLE, 2003).

Análises de transcriptomas realizadas por SOUZA (2006) em duas condições diferentes de cultivo trazem perspectivas promissoras para futuras análises funcionais de genes independentes, ou de conjuntos de genes envolvidos em determinada função ou via metabólica. A indução de genes envolvidos na simbiose e fixação do nitrogênio, durante o cultivo de *B. elkanii*, deve ser considerada ao avaliar preparações de inoculantes comerciais. A simulação de um ambiente com baixa tensão de oxigênio pode estar acontecendo dentro das embalagens comerciais, durante a estocagem do produto líquido. O processo de indução destes genes poderia vir a ocorrer nas formulações de inoculantes líquidos SOUZA (2006). A baixa concentração de oxigênio influencia negativamente no crescimento das culturas bacterianas.

As células possivelmente alteraram seu metabolismo respiratório quando retiradas da embalagem e permaneceram mais tempo expostas ao oxigênio, o que levou a morte após longos períodos de armazenamento. Bradirrizóbios na embalagem dos inoculantes podem viver restritos de oxigênio limitando até certo ponto seu crescimento. Quando retirados da embalagem e expostos ao gás, aumentam em número, pois possuem oxigênio suficiente para se desenvolverem adequadamente. Situações em que o número de células/ml diminuiu consideravelmente se devem ao fato de que quando restritas de oxigênio ficam impedidas de crescer, e quando expostas novamente a atmosfera, reprogramam a expressão gênica alterando seu metabolismo respiratório, utilizando o oxigênio disponível para seu desenvolvimento, o que reflete na boa eficiência na nodulação, mesmo com baixo número de células. Contudo, não se pode afirmar que o processo de fixação do nitrogênio seja tão eficiente quanto aquele observado por células originadas de inoculantes mais novos.

O método quantitativo em tempo real absoluto nos permitiu analisar, a grande possibilidade de que as células entraram em estado VBNC, levando em consideração os diversos trabalhos que evidenciam a presença de células neste estado. MILLET & LONVAUD-FUNEL (2000), afirmam a evidente existência de bactérias em estado de VBNC, indicando que sob certas condições as células podem não crescer. Similarmente, DU TOIT et al. (2005) analisaram a sobrevivência de *A. pasteurianus* em vinho sob condições anaeróbicas, e observaram que a contagem por plaqueamento foi

menor que a contagem por epifluorescência (método que detecta células vivas, mortas ou em VBNC). Em contrapartida, este fator não deve ser generalizado, pois GONZÁLES et al. (2006), realizou enumeração e detecção de bactérias em amostras de vinho por PCR em tempo real, e em seus resultados, obtiveram números equivalentes do RT-PCR, da microscopia e o número de UCF por plaqueamento. Assim, quando não há a necessidade de plaqueamento, células em VBNC não constituem um problema considerando que estas células são promovidas sob condições adversas.

O inoculante 1 apresentou um decréscimo no número de células até $t=24$ h, sendo que em $t=48$ h houve um aumento significativo das mesmas, o que nos leva a entender que houve uma alteração fisiológica permitindo a célula buscar meios de sobrevivência. Acumularam reserva nutricional aproveitando os nutrientes das células que morreram ao decorrer do tempo de dessecação, levando a sua multiplicação até sessar completamente os recursos disponíveis para a sua sobrevivência. O acúmulo de substâncias osmoprotetoras na parede celular das células bacterianas certamente realçou a possibilidade de tolerar à dessecação, haja visto a eficiente nodulação radicular, embora o número de nódulos tenha decaído no ensaio em casa de vegetação. Deve ser ressaltado com isso, que a qPCR nos permite enumerar células vivas, em VBNC e possivelmente células mortas, por isso o número de nódulos eficientes cai um $t=48$ h, mas, o número de células verificado por qPCR foi maior. Já as células oriundas do inoculante 2 não apresentou diferenças significativas em $t=4$ h e em $t=48$ h, pois este inoculante passado o prazo de validade, nos mostrou em experimentos anteriores que suas células utilizaram as reservas do meio requeridas para seu desenvolvimento, fato decorrente da condição de estresse. Em $t=0$ h as células quando retiradas da embalagem permaneceram expostas ao oxigênio, não restando tempo suficiente para que sua maquinaria bioquímica disponibilizasse condições para enfrentar a situação de dessecação. A UFC deixa evidente o maior número de células deste inoculante em relação ao de 1 ano, pois as células estão no auge de utilização dos recursos para uma posterior condição limitante.

As células do inoculante 4 apresentaram resultados muito interessantes, pois possivelmente as células aproveitaram ao máximo o que lhes apetece adquirir do meio externo para que a morte celular venha a ocorrer quando todos os nutrientes no meio estejam escassos. Em $t=4$ h apresentaram uma queda em relação aos outros períodos sob dessecação, sendo que em $t=0$ h estão em um número considerável, morrendo ao passar por 4 h expostas ao meio externo. Ocorre em maior número em $t=48$ h, deixando evidente a ocorrência anterior de células em estado VBNC, que possivelmente foram quantificadas por PCR em tempo real e não evidenciadas na contagem de células por plaqueamento.

GRATTEPANCHE et al. (2005) estudaram a quantificação por PCR em tempo real de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* em culturas de leite, e discutem em seus resultados a possibilidade de uma extração de DNA incompleta ou uma mudança fisiológica em células que morreram diminuindo a replicação de DNA. Sob condições de acidez, uma diminuição na produção de energia e um aumento da energia disponibilizada levaram a acidificação do citoplasma pelo aumento da concentração de algumas enzimas, conduzindo a limitações energéticas para a síntese da biomassa em células de *Lactococcus lactis* (EVEN et al. 2002) e conseqüentemente para a replicação do DNA. Como a quantificação de células bacterianas pelo PCR em tempo real está baseada no DNA, diferenças na quantidade extraída de DNA a partir das células poderiam levar a diferentes estimativas da população bacteriana.

O inoculante de 1 ano foi o que apresentou uma queda na quantidade de células bacterianas a cada período de exposição até $t=24$ h sob as sementes de soja, pois as células provavelmente ainda não apresentavam síntese de trealose em grande proporção, para fortalecer sua parede celular. Possivelmente disponibilizaram este recurso, quando deparadas à necessidade encontrada em $t=48$ h. No inoculante 2, os recursos bioquímicos já se encontraram evidentes mostrando que aumentando o período de dessecação, as células estavam preparadas fisiologicamente para tolerar condições adversas. Após 4 anos de vencimento e em condições de dessecação, a biossíntese da trealose, juntamente com outros osmoprotetores, certamente possibilitou que o impacto provocado na dessecação fosse superado pelo reforço adquirido ao

longo dos anos, amortecendo uma possível perda de nutrientes pela parede e membrana celular.

Os Cts da qaPCR estão ilustrados na figura 23. O DNA das amostras sob dessecação foram ressuspensos em 20 µl de água pura e a quantidade de *16S rDNA* desta ressuspensão está ilustrada na figura 24.

Tabela 06: Análise comparativa das diferentes quantificações realizadas no ensaio de resistência à dessecação

Amostras / Análises		Resistentes Inoc 1 ano	Resistentes Inoc 2 anos	Resistentes Inoc 4 anos
0hs	Células/ml (UFC)	$2,09 \times 10^4$	$2,18 \times 10^4$	$1,06 \times 10^4$
	Células/ml (qaPCR)	$9,50 \times 10^{10}$	$1,80 \times 10^{10}$	$2,16 \times 10^{11}$
	Ct	26,66	24,25	21,85
4hs	Células/ml (UFC)	---	---	---
	Células/ml (qaPCR)	$6,24 \times 10^{10}$	$7,83 \times 10^{10}$	$5,86 \times 10^{10}$
	Ct	26,05	26,38	25,96
24hs	Células/ml (UFC)	---	---	---
	Células/ml (qaPCR)	$3,64 \times 10^{10}$	---	---
	Ct	25,27	---	---
48hs	Células/ml (UFC)	---	---	---
	Células/ml (qaPCR)	$2,07 \times 10^{11}$	$6,82 \times 10^{10}$	$4,85 \times 10^{11}$
	Ct	27,79	26,18	29,02

Observou-se que as aferições para o número de células resistentes a dessecação, calculado por qaPCR, foram superiores àqueles obtidos para os inoculantes puros, mesmo para tempo inicial (t=0 h). Isto aparentemente é contraditório aos resultados esperado, uma vez que foram inoculados 300 µl de inoculante líquido

em apenas 50 sementes. Considerando que as sementes não foram descontaminadas, a superfície das mesmas possivelmente continham bradimirizóbios naturalmente aderidos durante o processo de colheita e processamento dos grãos. O sobrenadante obtido das amostras para realização da sedimentação de células pode ter sido contaminado com estas bactérias, concentrando o número de células durante o ensaio de dessecação. Esta hipótese pode ser corroborada pela especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores *16S rDNA* para qPCR.

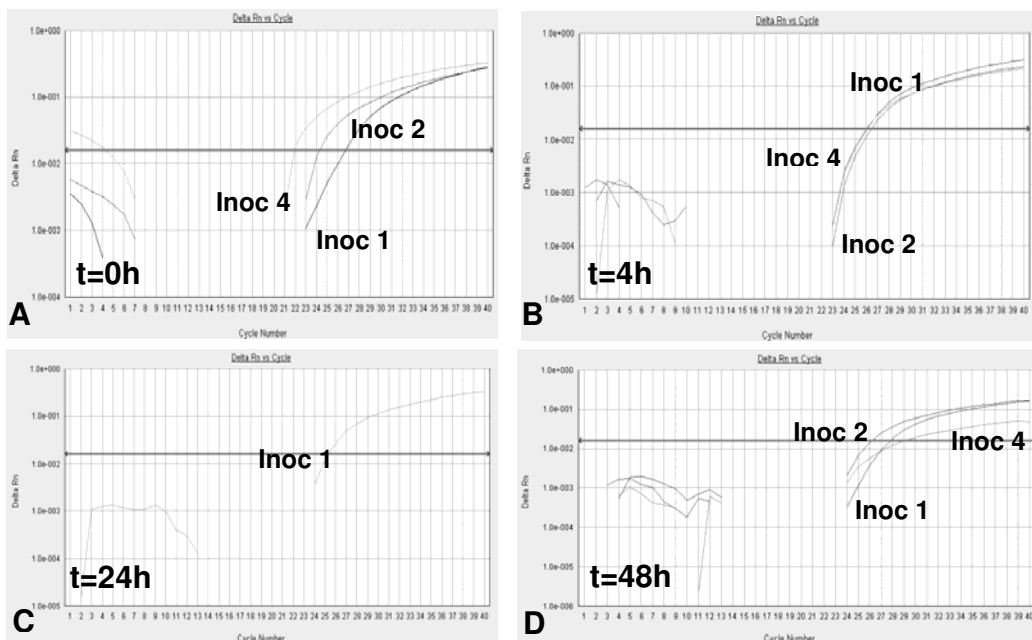


Figura 23: Amplificações por qPCR de cada amostra da ressuspensão de células bacterianas dos inoculantes submetidos ao ensaio de dessecação. A, B, C e D indicam 0, 4, 24 e 48 h sob dessecação nas sementes de soja, respectivamente.

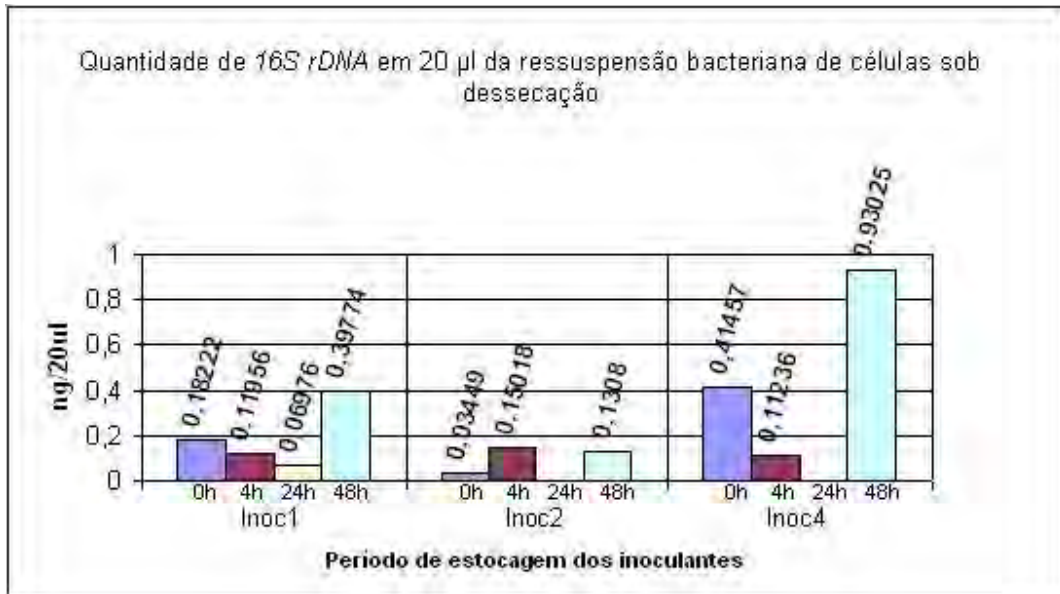


Figura 24: Análise quantitativa do rendimento de 16S rDNA em células submetidas ao ensaio de dessecação ressuspensas em 20 µl de água pura.

6.2. Eficiência da nodulação radicular em plantas de soja, com bradirrizóbios resistentes à dessecação

O ensaio de dessecação avaliou a aderência e sobrevivência das células bacterianas quando inoculadas sobre as sementes de soja em diferentes tempos: 0, 4, 24 e 48 horas. O plantio foi realizado em casa de vegetação com seis repetições. A eficiência dos inoculantes foi avaliada pela contagem dos nódulos referente a cada período de dessecação (Figura 25).

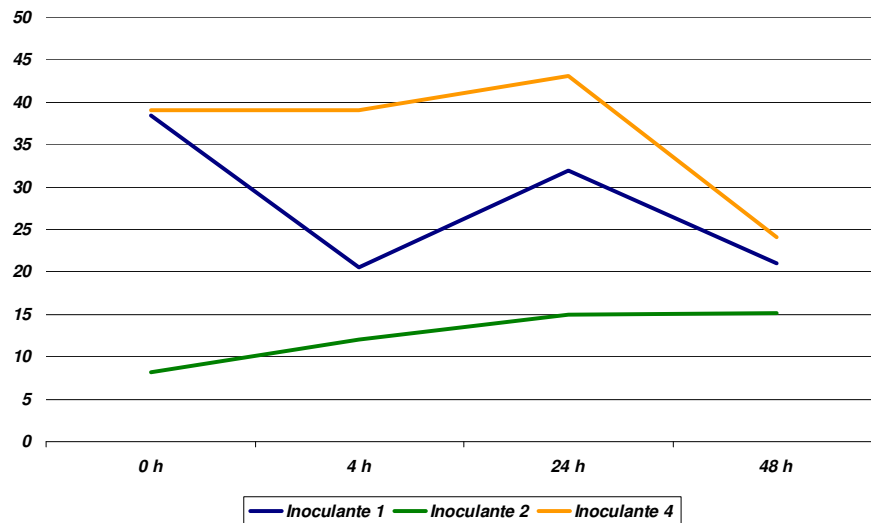


Figura 25: Número médio de nódulos de plantas de soja (28 dap). Ensaio de dessecação sobre sementes tratadas com ciclohexamida.

A habilidade das células de bradirrizóbios em sobreviver à dessecação e induzir a formação de nódulos decresceu à medida que o tempo de dessecação aumentou, exceto para o inoculante de 2 anos. Células de bradirrizóbio no inoculante de 4 anos apresentaram número considerável de nódulos mesmo após 24 h de aderência às sementes, provavelmente devido à parede celular mais espessa adquirida ao longo do tempo, o que confere maior resistência às células.

MCINTYRE et al. (2007) estudaram a síntese endógena da trealose na tolerância a dessecação na bactéria *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* e com mutantes em genes responsáveis pela biossíntese deste dissacarídeo, e observaram que a trealose é um osmoprotetor que auxilia na resistência a dessecação. Os mutantes do *treY* e do *ostA* (genes responsáveis pela biossíntese da trealose) falharam no acúmulo de trealose e eram mais sensíveis aos efeitos da secagem. Sua sobrevivência foi danificada comparada à bactéria do tipo selvagem e eram menos competidores na rizosfera pela ocupação do nódulo na planta.

CYTRYN et al. (2007) estudando genes envolvidos na síntese da trealose por dados microarranjos e qRT-PCR observaram aumento do transcrito do gene da

trealose-6-fosfato sintase, e elevada concentração intracelular de trealose em células de *B. japonicum* incubadas sob condições de dessecação. Isto sustenta a hipótese de que a trealose tem um importante e proeminente papel na promoção da tolerância a dessecação em *B. japonicum*. Isto é também mostrado pelos dados de que a trealose exógena realça a sobrevivência da estirpe USDA 110 de *B. japonicum* em resposta a dessecação. Os genes *ostA*, *ostB* e *treY* foram significativamente regulados na dessecação *versus* células hidratadas, e estes dados foram obtidos e confirmados pelas análises de PCR em tempo real. Isto confronta os resultados de MCINTYRE et al. (2007), que demonstraram que para mutantes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* foram mais sensíveis aos efeitos de secagem do que as estirpes selvagens. Por outro lado, os estudos com *R. leguminosarum* mostraram que os genes *ostA* e *treY* foram expressos continuamente em qualquer fase de crescimento, ao contrário do que descrito por CYTRYN et al. (2007), para *B. japonicum* que sugere que a trealose somente é sintetizada em condições de estresse. Isto implica que a regulação da trealose pode ser diferentemente distinta tanto filogeneticamente quanto fisiologicamente em diferentes bactérias que nodulam raízes de plantas.

Os genes envolvidos no metabolismo da trealose mostram padrões diferenciais de regulação e expressão, dependendo da espécie de rizóbio e do nível de estresse em que as células são submetidas.

Embora o número de células/ml e dados bioquímicos mostraram que o inoculante de 4 anos apresentou condições impróprias de uso no campo, as células sobreviventes possuem uma parede celular possivelmente com alto acúmulo de trealose ou outro osmoprotetor, o que possibilitou eficácia na nodulação das plantas. Isto indica a resistência das células às condições de estresse, mesmo após 24 h aderidas às sementes de soja. Embora as células possuam esta capacidade estratégica de resistência em determinadas condições, há um tempo máximo para isto, que foi observado na queda do número de nódulos após 48 h, para o inoculante 1 e 4. Pode ter ocorrido morte celular no inoculante mais antigo, e um alto número de células viáveis no inoculante 2, confirmado pelo número de células/ml deste inoculante puro e turbidez do mesmo.

6.3. Considerações finais sobre a resistência de células usadas para inoculação

No Egito, ZAHRAN et al. (1999) estudando a relação simbiótica de rizóbios com leguminosas de clima árido, observaram alta capacidade simbiótica destas bactérias em condições extremas. A fixação de nitrogênio está relacionada com o estado fisiológico na raiz da planta leguminosa, não sendo expressa se alguns fatores forem limitantes como: salinidade, pH do solo desfavorável, deficiência de nutrientes, toxicidade mineral, temperaturas extremas a que a bactéria está submetida, insuficiente ou excessiva umidade no solo, fotossíntese inadequada, etc. A potencialidade da resistência à dessecação e a eficiência na fixação de nitrogênio estão relacionadas não apenas a um único fator, mas, como mencionado por ZAHRAN et al., é um somatório que limita a sobrevivência e a resistência dos rizóbios fixadores de nitrogênio.

Um determinado estresse pode apresentar mais de um efeito, por exemplo, a salinidade pode afetar o estresse hídrico, o qual afeta a capacidade fotossintética, ou pode afetar diretamente o metabolismo no interior do nódulo. A salinidade do solo e a acidez são geralmente acompanhados por toxicidade mineral, deficiência nutricional e desordem de nutrientes. A desordem pode ocorrer por sensibilidade a íons como Na^+ e Cl^- e pode ser balanceado pelo aumento da concentração de K^+ , Ca^{2+} e Cl^- . Altos níveis de salinidade (acima de 10% NaCl) diminui o conteúdo de células de rizóbios e altera o exterior da membrana celular, tornando-a disforme (ZAHRAN et al. 1999).

A tolerância de sal nas plantas é um complexo fenômeno que envolve mudanças morfológicas, fisiológicas e processos bioquímicos. Algumas espécies de plantas sustentam a fixação de nitrogênio sob condições de alta salinidade. A simbiose e formação nodular nos legumes são mais sensíveis para sal ou estresse osmótico do que o rizóbio. A alta concentração de sal no meio inibe o passo inicial de simbiose. Os pêlos radiculares mostraram pequeno o encurvamento ou deformação quando inoculados com *B. japonicum* na presença de 170 mM de NaCl. A colonização bacteriana e o encurvamento dos pêlos radiculares de *Vicia faba* reduziu na presença de 50 a 100 mM de NaCl ou 100 a 200 mM de polietilenoglicol como agente osmótico e

a proporção de pêlos infectados reduziu 30 e 52% na presença de NaCl e polietilenoglicol, respectivamente (DELGADO et al. 1994; NAIR et al. 1993).

Efeitos de estresse salino na nodulação e fixação de nitrogênio em legumes têm sido estudados há muito tempo (ABDEL-WAHAB et al. 1981; AHRAN et al. 1986; EL-SHINNAWI et al. 1989; VELAGALETI et al. 1990; IKEDA et al. 1992). Alterações na fisiologia biológica por estresse salino é geralmente atribuída por uma redução na respiração dos nódulos e a redução na produção de proteína citosólica, especificamente a leghemoglobina, pelo nódulo. A presença de sal deforma a estrutura do nódulo, podendo ser razão para o declínio na proporção da fixação de nitrogênio por legumes sujeito a estresse por sal. As bactérias que colonizam nódulo na raiz são mais tolerantes ao sal do que raízes de leguminosas que mostram variação na tolerância ao sal (ZHRAN et al. 1999).

Algumas espécies de bactérias se adaptam em condições de salinidade pela acumulação intracelular de solutos orgânicos de baixo peso molecular chamados osmólitos. A acumulação de osmólitos contém o efeito de desidratação, diminuindo a atividade de água no meio, mas não interfere com a estrutura ou função macromolecular. A acumulação desses osmólitos depende do nível de estresse osmótico, a fase de crescimento da cultura, a fonte de carbono e a presença de osmólitos no meio de crescimento (ZHRAN et al. 1999).

A glicina betaína é um osmoprotetor produzido pelo rizóbio, acumulando-se intracelularmente, e tem um importante papel na manutenção da atividade da nitrogenase nos bacterióides sob condições de estresse hídrico. O principal papel fisiológico da glicina betaína na família Rhizobiaceae parece estar como uma fonte de energia, contribuição restrita para certas estirpes. Além destes osmoprotetores, a ectoína não se acumula intracelularmente e não reprime a síntese de solutos endógenos compatíveis como glutamato e trealose, isto pode ter um papel chave em provocar a síntese de osmolitos endógenos. Existem pelo menos duas classes de osmoprotetores distintos: aqueles como glicina betaína ou glutamato (atuam como osmolito genuíno) e aqueles como ectoína (atuam como mediadores químicos).

O cálcio é um elemento fundamental para que ocorra a formação do nódulo, uma vez que este componente impossibilita o ataque do rizóbio nas células dos pêlos radiculares se a concentração de cálcio nestas células for muito alta, impedindo que os pêlos se encurvem para recepção dos rizóbios facilitando a infecção na planta. Deste modo, é preciso que este elemento químico esteja equilibrado tanto no meio a que a bactéria está como a planta e a própria bactéria, contribuindo assim com o balanço osmótico e conseqüente êxito na formação do nódulo. O estresse por sal reduz o ataque e a colonização nos pêlos radiculares das leguminosas, fator atribuído a disposição de cálcio pelo sal. Isto impede o estágio inicial de formação do nódulo afetando a capacidade de nodulação de leguminosas (ZHRAN et al. 1999).

Leguminosas com alta tolerância a estresse hídrico, geralmente exibem ajustes osmóticos. Estes ajustes estão parcialmente explicados pela alteração na turgidez celular e pela acumulação de alguns solutos osmoticamente ativos. A acumulação de solutos orgânicos específicos (osmótico) é uma resposta característica de plantas sujeitas a longos e severos períodos de estresse hídrico. Um destes solutos é a prolina, que é um dos aminoácidos presente em proteínas. Diferencia-se dos demais aminoácidos por possuir uma estrutura quimicamente coesa e rígida, sendo o aminoácido mais rígido dos 20 codificados geneticamente. A prolina se acumula nas células, tornando-as resistente até mesmo sob condições extremamente adversas. Alguns compostos como aminoácidos livres e solutos de baixo peso molecular como pinitol (o-metil-inositol), acumulam-se em leguminosas tropicais sob dessecação.

Como discutido até o momento, algumas alterações fisiológicas e bioquímicas ocorrem nas células dos bradirrizóbios nos diferentes inoculantes comerciais para soja, como também no próprio produto e posteriormente o contato destes com o solo. Estas alterações incluem diversos fatores bióticos e abióticos como os osmoprotetores e as condições a que se sujeitam.

As células sobreviventes do inoculante 4 possuem uma parede celular possivelmente com alto acúmulo de trealose ou outro osmosprotetor, o que possibilitou eficácia na nodulação das plantas, indicando a resistência das células à condição de estresse, mesmo após 24 h aderidas às sementes de soja.

7. Determinação do número de bacterióides isolados de um nódulo radicular de soja

O inoculante líquido comercial com 2 anos de idade, contendo células das SEMIA 587 e 5079, foi escolhido para inocular sementes de soja visando a determinação do número de células bacterióides que colonizaram o nódulo. O inoculante foi misturado às sementes seguindo instruções do fabricante.

Bacterióides foram isolados a partir dos nódulos gerados após 35 dias de inoculação e plantio; neste estágio a atividade de nitrogenase é alta (CATTELAN & HUNGRIA, 1994). Para determinar número de células bacterióides no interior de um único nódulo, as amostras de DNA dos bacterióides foram analisados por qPCR para determinação da quantidade de *16S rDNA* e sua correlação com número de células/ml, baseada na amostra de referência.

O cálculo para quantificar os bacterióides foi realizado conforme descrito para as amostras do ensaio de dessecação. O número de células em um nódulo e o resultado em casa de vegetação sugerem que a fixação biológica do nitrogênio foi bastante eficiente para o inoculante de 2 anos (Figura 26 e Tabela 07).

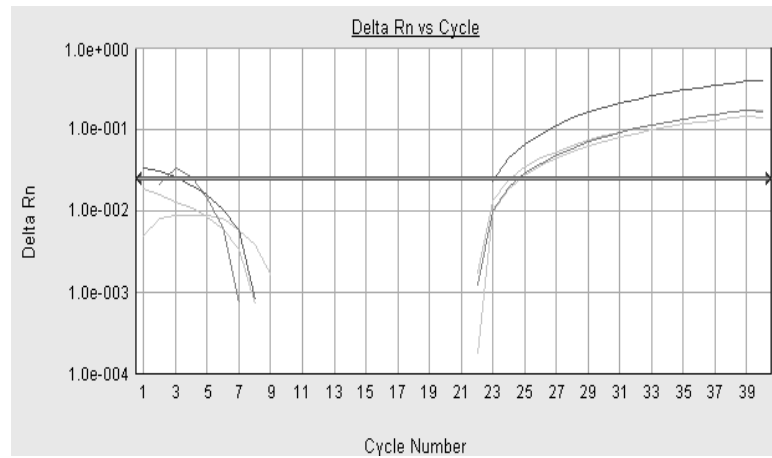


Figura 26: Amplificação por qPCR do *16S rDNA* de bacterióides isolados de um nódulo.

Tabela 07: Massa média de 01 nódulo radicular de soja com 35 dias após inoculação (dai) com células de bradirrizóbios do inoculante de 2 anos

01 nódulo 35dai (g)	Células/ml de bacterióides (qPCR)	Ct
0,015275	$6,80 \times 10^{10}$	23.98

V. CONCLUSÕES

1. $1,14 \times 10^{10}$ células de *Bradyrhizobium* na amostra de referência contêm 0,43702 ng/ml de *16S rDNA* e $1,32 \times 10^8$ cópias da molécula de *16S rDNA*.
2. $2,96 \times 10^{-4}\%$ é proporção de *16S rDNA* no DNA total de *Bradyrhizobium*, na amostra de referência.
3. A análise comparativa entre a enumeração celular pelos métodos quantitativos qPCR e UFC indicou que a qPCR é mais precisa, ampliando a quantificação para células incultiváveis em meios de cultivo adequados.
4. A qPCR tem alta sensibilidade e precisão, podendo ser utilizada em casos de discrepância nos resultados pelo método de plaqueamento tradicional.
5. As células de bradirrizóbios nos inoculantes comerciais para soja possivelmente alteraram sua fisiologia se adaptando à condição de dessecação sob sementes, apresentando número considerável de nódulos nas plantas observadas em casa de vegetação.
6. Os inoculantes analisados com prazo de validade ultrapassando o indicado pela legislação poderiam ser usados para inoculação de soja, tendo em vista o número de células detectadas por qPCR e a eficiência de nodulação, embora nenhuma afirmação possa ser feita quanto a eficiência da FBN.

VI. REFERÊNCIAS

ABDEL-WAHAB, H. H., e H. H. ZAHRAN. Effects of salt stress on nitrogenase activity and growth of four legumes. **Bio. Plant** (Prague) v.23, p.16-23, 1981.

APPLIED BIOSYSTEMS. Disponível em: <<http://www.appliedbiosystems.com>>. Acesso em 19 jun. 2009.

ARAÚJO, E.S.; JANTÁLIA, C.P.; BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S. & ALVES, B.J.R. **Importância do N₂ das raízes de soja para a produtividade da cultura sucessora e para o balanço do N₂ do sistema.** Circular Técnica, n.14, p.1-4, 2006.

ARAÚJO, S.C. **A inoculação de leguminosas. Aumento da produtividade com a fixação biológica de nitrogênio.** Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento, v.2. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br>>. Acesso em: 16 jun. 2009.

ARAÚJO, S.C. A inoculação de leguminosas. Aumento da produtividade com a fixação biológica de nitrogênio. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v.2, on-line (<http://www.biotecnologia.com.br>), 1997.

BASAGLIA, M.; POVOLO, S. & CASELLA, S. Resuscitation of Viable But Not Culturable *Sinorhizobium meliloti* 41 pRP4-*luc*: Effects of Oxygen and Host Plant. **Current Microbiology**, New York, v.54, p.167-174, 2007.

BROSIUS, J.; PALMER, M.L.; KENNEDY, P.J.; NOLLER, H.F. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. **Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America**, v.75, p.4801-4805, 1978.

BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (eds). Biochemistry and Molecular Biology of Plantas. **American Society of Plant Physiologists**, Rockville, p.786, 2000.

BURK, D. & BURRIS, R.H. Biochemical nitrogen fixation. **Annual Review of Biochemistry**, v.10, p.587-618, 1941.

BURRIS, R.H. Biological nitrogen fixation. **Plant Physiology**, v.54, p.443- 449, 1974.

BUSHBY, H. V. A. and MARSHALL, K. C. Desiccation-induced damage to the cell envelope of root-nodule bacteria. **Soil. Biol. Biochem.** v.9, 149-152, 1977b.

BUSHBY, H. V. A. and MARSHALL, K. C. Some factors affecting the survival of root-nodule bacteria on desiccation. **Soil. Biol. Biochem**, v.9, 143-147. 1977a.

BUSSE, M.D., and P.J. BOTTOMLEY. Growth and nodulation responses of *Rhizobium meliloti* to water stress induced by permeating and nonpermeating solutes. **Appl. Environ. Microbiol.** v.55, p.2431-2436, 1989.

CAMPOS, B.C Dose de inoculante turfoso para soja em plantio direto. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 29, n.3, 1999.

CATTELAN, A.J. & HUNGRIA, M. Nitrogen nutrition and inoculation. p.201-215. *In*: Tropical Soybean: improvement and production. **FAO Plant Production and Protection Series**, Roma Itália, n.27, FAO press, 1994.

CLIQUET, S. and CATROUX, G. Influence of culture medium and growth stage on the survival of *Bradyrhizobium japonicum* during desiccation and storage at two relative humidities. **Symbiosis**. v.16, p.279-287, 1994.

CONAB (Companhia Nacional do Abastecimento). Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em 16 jun. 2009.

CRAWFORD, N.M.; KAHN, M.L.; LEUSTEK, T. & LONG, S.R. Nitrogen and Sulfur. *In*: CRAWFORD, N.M.; KAHN, M.L.; LEUSTEK, T.; LONG, S.R. **Nitrogen and Sulfur**. *In*: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (eds), **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**, American Society of Plant Physiologists, Rockville, p.786, 2000.

CYTRYN, E. J., SANGURDEKAR, D. P., STREETER, J. G., FRANCK, W. L., CHANG, W., STACEY., G., EMERICH, D. W., JOSHI, T., XU, D. and SADOWSKY, M. J. Transcriptional and physiological responses of *Bradyrhizobium japonicum* to desiccation-induced stress. **Journal of Bacteriology**. vol.189, n°19, p.6751-6762, 2007.

DE MEDICE, D.; CROCI, L.; DELIBATO, E.; DI PASQUALE, S.; FILETICI, E.; TOTI, L. Evaluation of DNA extraction methods for use in combination with SYBR Green I real-time PCR to detect *Salmonella enterica* serotype enteritidis in poultry. **Applied Environmental Microbiology**, v.69, p.3456-3461, 2003.

DEAKER R, ROUGHLEY RJ, KENNEDY IR **Legume seed inoculation technology-a review 2004**.

DELORIT, R.J. & GUNN, C.R. Seeds of continental United States legumes (*Fabaceae*). Park Falls, WI, USA, F.A. **Weber and Sons**, Lithographers, 1986.

DELROISSE, J.M.; BOULVIN, A.L.; PARTMENTIER, I.; DAUPHIN, R.D.; VANDERBOL, M.; PORTETELLE.; D. Quantification of *Brifidobacterium* spp. and *Lactobacillus* spp. in rat fecal sample by real-time PCR. **Science Direct**, v.163, p.663-670, 2008.

DU TOIT, W.J.; PRETORIUS IS & LONVAUD-FUNEL, A. The effect of sulphur dioxide and oxygen on the viability and culturability of *Acetobacter pasteurianus* and strain of *Brettanomyces bruxellensis* isolated from wine. **Journal Applied Microbiology**, v.98, p.862-871, 2005.

EL-SHINNAWI, M.M., N. A. EL-SAIFY, e T. M. WALY. Influence of the ionic forms of mineral salts on growth of faba bean and *Rhizobium leguminosarum*. **World J. Microbiol. Biotechnol.** v.5, p.247-254, 1989.

EVEN, S.; LINDLEY, N.D.; LOUBIÈRE, P.; COCAIGN-BOUSQUET, M. Dynamic response of catabolic pathway to autoacidification in *Lactococcus lactis*: transcript profiling and stability in relation to metabolic and energetic constraints. **Mol Microbiol**, v.45, p.1143-1152, 2002.

EWING, B.; GREEN P. Base-calling of automated sequencer traces using *Phred*. II. Error probabilities. **Genome Research**, v.8, p.186-194, 1998.

EWING, B.; HILIER, L.D.; WENDL, M.C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using *Phred*. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v.8, p. 175-185, 1998.

FREIRE, J.R.J. Fixação do nitrogênio pela simbiose rizóbio/leguminosas. In: CARDOSO, E.J.B.N., TSAI, S.M., NEVES, M.C.P. (coord.). **Microbiologia do solo**. Campinas: SBCS, p.121-140, 1992.

GARRITY, G.M. (editor) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. second edition, vol. 2 (The *Proteobacteria*), part C (The *Alpha*-, *Beta*-, *Delta*-, and *Epsilonproteobacteria*), Springer, New York, 2005.

GIULIETTI, A.; OVERBERGH, L.; VALCKX, D.; DECALLONNE, B.; BOUILLON, R.; METHIEU, C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. **Methods**, v.25, p.386-401, 2001.

GORAB, E. Evolução de genes nucleares de RNA ribossômico. **Biologia Molecular e Evolução**. cap.6, p.64-69, 2001.

GRATTEPANCHE, F.; LACROIX, C.; AUDET, P.; LAPOINTE, G. Quantification by real-time PCR of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* in milk fermented by mixed culture. **Applied Genetics and Molecular Biotechnology**, v.66, p.414-421, 2005.

HALLIDAY, J. Field responses by tropical pasture legumes to inoculation with *Rhizobium*. Cali: **Centro Internacional de Agricultura Tropical** (CIAT), p.10, 1978.

HEIN, I.; LEHNER, A.; RIECK, P.; KLEIN, K.; BRANDL, E.; WAGNER, M. Comparison of different approaches to quantify *Staphylococcus aureus* cells by real-time quantitative PCR and application of this technique for examination of cheese. **Applied Environmental Microbiology**, v.67, p.3122-3126, 2001.

HIGUCHI, R.; DOLLINGER, G.; WALSH, P.S.; GRIFFITH, R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA-sequences. **Bio-Technology**, New York, US, v.10 p.413–417, 1992.

HUIJSDENS, X.W.; LINSKENS, R.K.; MAK, M.; MEUWISSEN, S.G.; VANDENBROUCKE-GRAUS, D.M. & SAVELKOUL, P.H. Quantification of bacteria adherent to gastrointestinal mucosa by real-time PCR. **J Clin Microbiol** v.40, p.4423-4427, 2002.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J. & MENDES, I.C. **Fixação biológica de nitrogênio na cultura de soja**. Embrapa Soja. Circular Técnica, 35. Londrina: Embrapa Soja, 48p, 2001.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T. & CAMPO, R. **A inoculação da soja**. Londrina, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Embrapa-CNPSO. Circular Técnica, 17; Embrapa-CPAC. Circular Técnica, 34, 1997b.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T.; SUHET, A.R. & PERES, J.R.R. **Fixação biológica do nitrogênio em soja**. In: ARAUJO, R.S. & HUNGRIA, M., eds. **Microrganismos de importância agrícola**. Brasília, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. p.9-89, 1994.

IKEDA, J.-L., M. KOBAYSAHI, e E. TAKAHASHI. Salt stress increases the respiratory cost of nitrogen fixation. **Soil Sci. Plant Nutr.** v.38, p.51-56, 1992.

JANSEN VAN RENSBURG, H. and STRIJDOM, B. W. Survival of fast – and slow-growing *Rhizobium* spp. Under conditions of relatively mild desiccation. **Soil. Biol. Biochem.** v.12, p.353-356, 1980.

JARDIM-FREIRE, J.R. & VERNETTI, F.J. A pesquisa com soja, a seleção de rizóbios e a produção de inoculantes no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v.5, p.117-126, 1999.

JARDIM-FREIRE, J.R.; COSTA, J.A. & STAMMEL, J.G. Principais fatores que propiciaram a expansão da soja no Brasil. **Revista Plantio Direto**, v.92, p.39-47, 2006.

JORDAN, D.C. *Rhizobiaceae* Conn 1938. In: KRIEG, N.R. & HOLT, J. G., eds. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore/London, Willians & Wilkins .p.235-244, 1974.

KOSANKE, J. W., OSBORN, R. M., SHUPPE, G. I. and SMITH, R. S. Slow rehydration improves the recovery of dried bacterial populations. **Can J Microbiol.** v.38, p.520-525, 1992.

KUBISTA, M.; ANDRADE, J.M.; BENGTSSON, M.; FOROOTAN, A.; JONÁK, J.; LIND, K.; SINDELKA, R.; SJOBACK, R.; SJOGREEN, B.; STROMBOM, L.; STAHLBERG, A. & ZORIC, N. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, 2006.

KUYKENDALL, L.D.; SAXENA, B.; DEVINE, T.E.; UDELL, S.E. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, CA, v.38, p.501-505, 1992.

LEONG, D.T.; ANURAG, G.; HUI, F.B.; GUOQIANG, W.; LI, F.Y.; HENG-PHON, T.; FOOK, T.C.; DIETMAR, W.H. Absolute quantification of gene expression in biomaterials research using real-time PCR. **Science Direct**, v.28, p.203-210, 2007.

LINDER, K. & OLIVER, J.D. Membrane fatty acid and virulence changes in the viable but nonculturable state of *Vibrio vulnificus*. **Appl Environ Microbiol** v.55, p.2837–2842, 1989.

LIU, W.T. & STHAL, D.A. Molecular Approaches for the Measurement of Density, Diversity and Phylogeny. In: **Manual of Environmental Microbiology**, p.114, 2002.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Method. **Methods** v. 25, p. 402–408, 2001.

LODWIG, E.; POOLE, P. Metabolism of *Rhizobium* bacteroids. **Critical Reviews in Plant Science**, Philadelphia, PA, v.22, p.37-78, 2003.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 16 jun. 2009.

MARMUR, J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. **Journal of Molecular Biology**, v.3, p. 208-218, 1961.

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

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

MARY, P., DUPUY, N., DOLHEM-BIREMON, C., DEFIVES, C. and TAILLEZ, R. Differences among *Rhizobium meliloti* and *Bradyrhizobium japonicum* strains in tolerance to desiccation and storage at different relative humidities. **Soil. Biol. Biochem.** v.36, p.1125-1132, 1994.

MARY, P.; OCHIN, D; TAILLIEZ, R. Growth status of rhizobia in relation to their tolerance to low water activities and desiccation stresses. **Soil Biol. Biochem.** v.18, p.179-184, 1986.

MAURICE, S.; BEAUCLAIR, P.; GIRAUD, J.J.; SOMMER G.; HARTMANN, A. & CATROUX, G. Survival and change in physiological state of *Bradyrhizobium japonicum* in soybean (*Glycine max* L. Merril) liquid inoculants after long-term storage. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.17, p.635-643, 2001.

MCDUGALD, D.; RICE, S.A.; WEICHART, D. & KJELLEBERG, S. Nonculturability: adaptation or debilitation? **FEMS Microbiol Ecol** v.25, p.1–9, 1998.

MCINTYRE, H. J., H. DAVIES, T. A. HORE, S. H. MILLER, J. P. DUFOUR, and C. W. RONSON. Trehalose biosynthesis in *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* and its role in desiccation tolerance. **Appl. Environ. Microbiol.** v.73, p.3984-3992, 2007.

MENDES, I.C.; HUNGRIA, M. **Resposta da soja à adubação nitrogenada na semeadura.** Disponível em:<
http://radiobras.gov.br/ct/artigos/2001/artigo_060701.htm>. Acesso em: 16 jun. 2009.

MILLET, V. & LONVAUD-FUNEL, A. The viable but non-culturable state of microorganisms during storage. **Lett Appl Microbiol**, v.30, p.136-141, 2000.

MORILLO, J.M.; LAU, L.; SANZ, M.; HERRERA, D.; SILVA, A. Quantitative real-time PCR based on single copy gene sequence for detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. **J Periodontal Res**, v.38, p.518-524, 2003.

MUKAMOLOVA, G.V.; KORMER, S.S.; YANOPOLSKAYA, N.D. & KAPRELYANTS, A.S. Properties of dormant cells in stationary-phase cultures of *Micrococcus luteus* during prolonged incubations. **Microbiology**, v.64, p.284–288, 1995.

NAIR, S., P. K. JHA, e C. R. BABU. Induced salt tolerant rhizobia, from extremely salt tolerant *Rhizobium* gene pools, from reduced but effective symbiosis under non-saline growth. **Microbios** v.74, p.39-51, 1993.

NEWBY, D.T.; HADFIELD, T.L.; ROBERTO, F.F. Real-time PCR detection of *Brucella abortus*: a comparative study of SYBR Green I, 5' exonuclease, and hybridization probe assay. **Applied Environmental Microbiology**, v.69, p.4753-4759, 2003.

NORRIS, D.O. Acid production by *Rhizobium* a unifying concept. **Plant and Soil**, The Hague, v.22, n.2, p.143-166, 1965.

OLIVEIRA, L.A. & VIDOR, C. Capacidade competitiva de estirpes de *Rhizobium japonicum* em solos com alta população deste *Rhizobium*. **R. Bras. Ci. Solo**, v.8, p.49-55, 1984a.

OLSEN, G.J.; WOESE, C.R. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. **Faseb Journal**, v.7, p.113-123, 1993.

PADMANABHAN, S.; HIRTZ, R.D.; BROUGHTON, W.J. Rhizobia in Tropical Legumes: Cultural characteristics of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* sp. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.22, p.23-28. 1990.

PANIZZI, M.C. e MANDARINO, J.M.G. Soybean for human consumption: nutritional quality, processing and utilization. *In*: Tropical Soybean: improvement and production. **FAO Plant Production and Protection Series**, FAO press, Roma Itália. n.27, p.241-254, 1994.

PERRET, X; STAEHELIN, C. & BROUGHTON W.J. Molecular basis of symbiotic promiscuity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.64, p.180-201, 2000.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, 29, e45, 2001.

RHIZOBASE (The Genome Database for Rhizobia). Disponível em: <http://www.kazusa.or.jp/rhizobase/>. Acesso em: 08 ago. 2008.

RINGELBERG, D.B.; DAVIS, J.D.; SMITH, G.A.; PFIFFNER, S.M.; NICHOLS, P.D.; NICKELS, J.B.; HENSEN, J.M.; WILSON, J.T.; YATES, M.; KAMPBELL, D.H.; REED, H.W.; STOCKSDALE, T.T. & WHITE, D.C. Validation of signature polar lipid fatty acid biomarkers for alkane utilizing bacteria in soils and subsurface aquifer materials. **FEMS Microb. Ecol.** v.62, p.39-50, 1988.

ROUGHLEY, R. J., GEMELL, J. G., THOMPSON, J. A. and BROCKWELL, J. The number of *Bradyrhizobium* sp. (Lupinus) applied to seed and its effect on rhizosphere colonization, nodulation and yield of Lupin. **Soil Biol Biochem.** v.25, 1453-1458, 1993.

RUDI, K.; NOVAGNA, H.K.; MOEN, B.; NISSEN, H.; BREDHOLT, S.; MORETRO, T.; NATERSTAD, K.; HOLCK, A. Development and application of new nucleic acid-based technologies for microbial community analyses in foods. **Int J Food Microbial**, v.78, p.171-180, 2002.

RUMJANEK, N.G.; DOBERT, R.C.; BERKUM, P. & TRIPLETT, E.W. Common soybean inoculant strains in Brazil are members of *Bradyrhizobium elkanii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, p.4371-4373, 1993.

SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, E.T. & ERLICH, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. **Science**, v.239, p.487-491, 1988.

SALEMA, M. P., PARKER, C. A., KIDBY, D. K., CHATEL, D. L. and ARMITAGE, T. M. Rupture of nodule bacteria on drying and rehydration. **Soil. Biol. Biochem.** v.14, p.15-22, 1982b.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular cloning: A laboratory manual**, 3.ed. New York: Cold Spring harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 2001.

SHAHAMAT, M.; MAI, U.; PASZKO-KOLVA, C.; KESSEL, M. & COLWELL, R.R. Use of autoradiography to assess viability of *Helicobacter pylori* in water. **Appl. Environ. Microbiol.** v.59, p.1231-1235, 1993.

SOUZA, J.A.M. **PERFIL TRANSCRICIONAL DE *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587 “IN VITRO” E EM SIMBIOSE COM SOJA (*Glycine max* L. Merrill) ATRAVÉS DE MICROARRANJO DE DNA.** Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

STREETER, J. G. Factors affecting the survival of *Bradyrhizobium* applied in liquid cultures to soya bean [*Glycine max* (L.) Merr.] seeds. **J. Appl. Microbiol.**, in press. 2007.

STREETER; J. Effect of trehalose on survival of *Bradyrhizobium japonicum* during desiccation. **J. Appl Microbiol** v.95, p.484-491, 2003.

STUBNER, S. Enumeration of 16S rDNA of *Desulfotomaculum* lineage 1 in rice field soil by real-time PCR with SybrGreen detection. **Journal Microbiology Methods**, v.50, p.155-164, 2002.

TAN, I.K.P.; BROUGHTON, W.J. Rhizobia in tropical legumes. XIII. Biochemical basis of acid and alkali reactions. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.13, p.389-393, 1981.

THERON, J.; CLOETE, T.E. Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environmental. **Crit Rev Microbiol**, v.26, p.37-57, 2000.

TOLEDO, B.F.B.; MARCONDES, J.; LEMOS, E.G.M. Caracterização de rizóbios indicados para produção de inoculantes por meio do seqüenciamento parcial do 16S rRNA. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.4, p.384-391, 2009.

VARGAS, M.A.T. & HUNGRIA, M. Fixação biológica do N₂ na cultura da soja. In: VARGAS, M.A.T. & HUNGRIA, M., ed. *Biologia dos solos de cerrados*. Planaltina, **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. p.297-360, 1997.

VELAGALETI, R. R., S. MARSH, D. KRAMES, ET AL. Genotyping differences in growth and nitrógeno fixation soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) cultivars grown under salt stress. **Trop. Agric.** v.67, 169-177, 1990.

VICENT, J. M., THOMPSON, J. A. and DONOVAN, K.O. Death of root-nodule bacteria on drying. **Aust J Agricult Res.** v.13, p.258-270, 1962.

VINCENT, J.M. A manual for the practical study of root nodule bacteria. ICB HandBook, 15, Oxford: **Blackwell Scientific Publications**, p.200, 1970.

VRIEZEN, J. A. C., DEBRUIJN, F. J. and NUSSLEIN, K. Desiccation responses and survival of *Sinorhizobium meliloti* USDA 1021 in relation to growth phase, temperature, chloride and sulfate availability. **LKett Appl Microbiol.** v.42, p.172-178, 2006.

WALSH, S.; LAPPIN-SCOTT, H.M.; STOCKDALE, H. & HERBERT, B.N. An assessment of the metabolic activity of starved and vegetative bacteria using two redox dyes. **J Microbiol Meth** v.24, p.1–9, 1995.

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

WHELAN, J.A.; RUSSEL, N.B.; WHELAN, M.A. A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. **J. Immunol. Methods**, v.278, p.261-269, 2003.

WILLEMS, A. & COLLINS, M.D. Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based on 16S rRNA gene sequences. **Int. J. Syst. Bacteriol.**,v. 43, p.305-313, 1993.

WILLEMS, A., FERNANDEZ-LOPEZ, M. E.; MUN˜ OZ-ADELANTADO, GORIS, J.; DE VOS, P.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; TORO, N.; GILLIS, M. Description of new Ensifer strains from nodules and proposal to transfer *Ensifer adhaerens* Casida 1982 to *Sinorhizobium* as *Sinorhizobium adhaerens* comb. nov. Request for an opinion, Int. **J. Syst. Evol. Microbiol.** v.53, p.1207–1217, 2003.

WOESE, C.R. Bacteria evolution. **Microbiol. Rev.** v.51, p.221-271, 1987.

XU, H.S.; ROBERTS, N.; SINGELTON, F.L.; ATWELL, R.W.; GRIMES, D.J & COLWELL, R.R. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. **Microb. Ecol.** v.8, p.313-323, 1982.

YANAGI, M. & YAMASATO, K. Phylogenetic analysis of the family *Rhizobiaceae* and related bacteria by sequencing of 16S rRNA gene using PCR and DNA sequencer. **FEMS Microbiol. Ecol.** v.107, p.115-120, 1993.

YOUNG, J.M.; THE GENUS NAME ENSIFER CASIDA 1982 takes priority over *Sinorhizobium* CHEN ET AL. 1988, and *Sinorhizobium morelense* WANG ET AL. 2002 Is a later synonym of *Ensifer adhaerens* Casida 1982. Is the combination “*Sinorhizobium adhaerens*” (Casida 1982) WILLEMS ET AL. 2003 legitimate? Request for an opinion, Int. **J. Syst. Evol. Microbiol.** v.53, p.2107–2110, 2003.

YOUNG, J.P.W.; DOWNER, H.L. & EARDLY, B.D. Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTail by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. **J. Bacteriol.** v.73, p.2271-2277, 1991.

YUN, J.J.; HEISLER, L.E.; HWANG, I.I.L.; WILKINS, O.; LAU, S.K.; HYRCZA, M.; JAYABALASINGHAM, B.; JIN, J.; MCLAURIN, J.; TSAO, M.; DER, S.D. Genomic DNA functions as a universal external standart in quantitative real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, v.34, n.12, 2006.

ZHRAN, H. H. Effect of sodium chloride and polyethylene glycol on rhizobial root hair infection, root nodule structure and symbiotic nitrogen fixation in *Vicia faba* L. plantas. Ph.D. thesis. Dundee University, Dundee, Scotland. 1999.

ZILLI, J.D.; CAMPO, R.J.; RIBEIRO, K. G.; GIANLUPPI, V.; SMIDERLER, O.J.; HUNGRIA, M. Utilização de Inoculantes de *Bradyrhizobium* no Cultivo de Soja nos Cerrados de Roraima. **Circular Técnica**, n.2, p.1-9, 2005

APÊNDICE

1. Meios de cultura utilizados

YMB (“Yeast Mannitol Broth”) / pH 6,8	Concentração
K ₂ HPO ₄	500mg/L
MgSO ₄ x 7H ₂ O	200mg/L
NaCl	100mg/L
Manitol	10g/L
Extrato de levedura	500mg/mL
9g/L de agar ao meio – YMA (“Yeast Manitol Agar”)	

TY (“Tripte-Yeast Medium”) / pH 7,0	Concentração
Triptona	500mg/mL
Extrato de levedura	300mg/mL
CaCl ₂	870mg/mL

LB (Luria e Bertani) / pH 7,0	Concentração
Triptona	10g/L
Extrato de levedura	5g/L
NaCl	10g/L
9g/L de agar para meio sólido	

SOB / pH 7,0	Concentração
Triptona	20g/L
Extrato de levedura	5g/L
NaCl	0,5g/L
KCl 250mM	10mL/L
MgCl ₂ 1M	10mL/L

SOC / pH 7,0
meio SOB com 20mM de glicose