

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

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LINHAGENS  
MUTANTES DE *Bradyrhizobium elkanii* CARACTERIZADO  
POR PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL**

**Erica Mendes Lopes**

Bióloga

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro de 2012

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

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LINHAGENS  
MUTANTES DE *Bradyrhizobium elkanii* CARACTERIZADO  
POR PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL**

**Erica Mendes Lopes**

Orientador: Prof. Dr. Jackson Antônio Marcondes de Souza

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

Fevereiro de 2012

L864p Lopes, Erica Mendes  
Potencial biotecnológico de linhagens mutantes de *Bradyrhizobium elkanii* caracterizado por PCR quantitativo em tempo real / Erica Mendes Lopes. -- Jaboticabal, 2012  
xx, 65 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012  
Orientador: Jackson Antônio Marcondes de Souza  
Banca examinadora: Janete Aparecida Desidério, Rodrigo Matheus Pereira  
Bibliografia

1. Fixação simbiótica do nitrogênio 2. Polihidroxitirato 3. Expressão gênica. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.461.5

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.  
e-mail: emendeslopes@yahoo.com.br

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**ERICA MENDES LOPES-** nascida na cidade de Jaboticabal (SP), em 10 de agosto de 1988. Graduiu-se em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário Barão de Mauá, Ribeirão Preto (SP), no ano de 2009. Em março de 2010, iniciou o Mestrado, no curso de Pós-graduação em Microbiologia, área de concentração em Microbiologia Agropecuária, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus Jaboticabal (SP).

*O sábio nunca diz tudo o que pensa, mas pensa sempre tudo o que diz.*  
(Aristóteles)

*Aos meus pais, Manoel Luiz Lopes e Neuci Luiza Mendes Lopes, meus avós, Gervasio da Cruz Lopes e Antonia Pinheiro Lopes (in memorian), Lourdes Conceição dos Santos Mendes e Nivaldo Mendes, sempre foram sonhadores, pelo amor, compreensão e por me ajudarem a sonhar mais alto.*

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por ter me concedido a força e a sabedoria necessária para realizar esse trabalho, e por todos os ensinamentos que fazem parte de minha vida.

Aos meus pais, Manoel Luiz Lopes e Neuci Luiza Mendes Lopes, que são grandes responsáveis pela realização desse sonho. Por nunca ter me deixado desistir de meus objetivos e por sempre me apoiarem em tudo e por não pouparem esforços para que eu crescesse profissionalmente e moralmente. Obrigado por tudo; pelos ensinamentos, esforços, incentivos, paciência, amor e pelo eterno apoio. Amo vocês.

Aos meus avós, Lourdes Conceição dos Santos Mendes e Nivaldo Mendes, pelo amor carinho, compreensão, momentos especiais e cuidados que dedicam a mim desde primeiro dia em que me viram.

Ao meu primo irmão e minha “cunhada”, Murilo de Paula Baldan e Lenita Mendonça, pela compreensão, amor e carinho. Por terem me abençoado com sobrinhos lindos, Eduardo Mendonça Baldan e Felipe Mendonça Baldan, minha inspiração.

A Professora Eliana G. Macedo Lemos por ter me acolhido em seu laboratório, pela oportunidade, carinho apoio em todos os momentos desta pesquisa e por todos os conselhos.

A Professora Lucia Maria Carareto Alves por todos os conselhos, palavras amigas broncas e carinho ao longo deste trabalho.

Ao meu orientador Jackson Antonio Marcondes de Souza grande responsável pela realização deste trabalho. Palavras seriam pouco para descrever os ensinamentos amizade dispensados por ele ao longo deste trabalho, que Deus continue abençoando você e toda a sua família.

A banca examinadora, Janete Aparecida Desidério, Rodrigo Matheus Pereira, Lucia Maria Carareto Alves, Tereza Cristina Luque Castellane, por todas as sugestões, conselhos, e por contribuir para êxito deste trabalho final.

Ao Doutor João Carlos Campanharo pelos auxílios ao longo desta pesquisa e por todas as explicações e carinho e por sempre me ajudar.

Aos amigos do Laboratório de Microrganismos e Plantas, por todo o carinho amizade e pelos ótimos momentos que passamos juntos. Valeu galera !!!

As minhas amigas Thais Carvalho Maester e Mariana Rangel Pereira por sempre me acolherem em sua casa pelos conselhos, conversas e momentos de alegria dentro e fora do trabalho. Obrigado pela amizade verdadeiras e por terem tornado minha vida mais feliz. E que essa amizade dure por muito tempo.

As minhas amigas Rosmeriana, Michelli, Gisele, Elisângela, Silvana, Eliamar, Camila, Andressa e Karla pelos momentos felizes, conselhos e auxílios.

Aos meus amigos Wellington Oromi, Raphael Barbeta, pelas contribuições.

Ao meu amigo Wellington Moreira por todos os conselhos, auxílios, ensinamentos, por ter contribuído pelo meu sucesso profissional.

A todos os funcionários do Departamento de Tecnologia da Unesp de Jaboticabal.

A todos os funcionários da Pós – Graduação da Unesp de Jaboticabal.

Aos meus amigos Carol, Paolo, João, André e Paulinho por sempre me escutar e apoiar. Amo vocês.

As minhas amigas Sebastiana e Daiane, por sempre estarem ao meu lado e de minha família nos momentos em que mais precisamos sendo sempre ótimas vizinhas.

A Marcia, Francielle e Isabelle, por todo o apoio força carinho e amor que sempre dedicaram a mim e minha família. Por sempre fazerem parte da minha vida e nunca me abandonarem palavras me faltam para descrever a importância destas três pessoas neste contexto. Peço a Deus que continue nos proporcionando momentos felizes e nos de muita força para enfrentarmos junto tudo o que vier. E que nossa amizade dure por muitos e muitos anos.

Aos amigos do Hospital São Marcos por todo apoio e torcida.

Aos meus amigos Diego, Carol, Aline, Celina, Cyro, Raquel, por todos os momentos que vivemos ao longo de nossa graduação e por todo o apoio dedicado

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>XIII</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>XIV</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>XV</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>XIX</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>XX</b>
<b>I. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>II. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>4</b>
1. <i>Bradyrhizobium elkanii</i> .....	4
2. Relação Simbiótica e Fixação do Nitrogênio.....	5
2.1. Nodulação .....	5
2.2. Fixação Biológica do Nitrogênio .....	7
3. Polihidroxialcanoatos (PHA).....	9
3.1.O biopolímero: Poli(3-hidroxi-butirato).....	10
3.1.1. Vias de síntese e degradação do PHB.....	11
3.1.2. O uso da engenharia genética para produção de PHB. ....	13
4. Quantificação Relativa .....	14
<b>III. OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
1. Objetivo Geral .....	17

2. Objetivos específicos. ....	17
--------------------------------	----

#### **IV. MATERIAL E MÉTODOS .....18**

Fluxograma metodológico .....	18
-------------------------------	----

#### **PARTE I – Análises bioquímicas e fisiológicas das culturas *in vitro* das linhagens de *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587 selvagem e mutantes para a síntese de PHB.....19**

1. Amostras utilizadas. ....	19
------------------------------	----

2. Condições de cultivo. ....	19
-------------------------------	----

2.1. Meios de cultura. ....	19
-----------------------------	----

2.2. Antibióticos .....	20
-------------------------	----

3. Curva de crescimento das linhagens mutantes em meio definido RDM modificado.	21
---	----

3.1. Número de células viáveis dos cultivos: .....	21
--	----

4. Triagem dos mutantes de <i>B. elkanii</i> para produção de EPS (Exopolissacarídeos)..	22
--	----

4.1. Crescimento em Meio Sólido Contendo Calcofluor. ....	22
---	----

5. Ensaio respiratório pela redução do INT. ....	23
--	----

6. Ensaio de Nodulação .....	23
------------------------------	----

6.1. Inoculação de plantas de soja .....	23
--	----

6.2. Número mais provável de nódulos. ....	24
--	----

6.3. Isolamento de bacterióides.....	25
--------------------------------------	----

#### **PARTE II – Análises da expressão gênica das linhagens selvagem e mutante de *B. elkanii*.....25**

1. Extração de RNA total de bactérias e bacterióides. ....	25
--	----

1.1. Transcrição Reversa: .....	26
2. Descrição dos genes alvos e do controle endógeno utilizados na quantificação relativa de transcritos. ....	26
2.1. PCR qualitativo para validar os “primers” RT usado na qPCR. ....	28
3. Otimização da reação por PCR quantitativo em tempo real para os oligonucleotídeos iniciadores .....	28
3.1. Quantificação Relativa da expressão gênica.....	28
3.2. Análise dos Dados.....	29
<b>V. RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
1. Cultivo Bacteriano .....	30
1.1. Controle de contaminação dos cultivos e número de células viáveis .....	31
1.2. Ensaio Respiratório por Redução do INT das Diferentes Fases de Cultivo. ....	32
2. Ensaio de Nodulação .....	34
2.1. Número mais Provável de Nódulos .....	34
2.2. Ensaio respiratório por redução do INT de bacterióides.....	35
3. Análise da expressão gênica:.....	37
3.1. Síntese de cDNA.....	37
3.2. Validação das condições dos iniciadores por PCR. ....	38
3.3. Ensaio de validação de iniciadores por PCR quantitativa em tempo real absoluta, eficiência de cDNA e ensaio de Dissociação.....	40
4. Quantificação relativa em tempo real. ....	43
5. Triagem das linhagens mutantes para a produção de exopolissacarídeos (EPS) na presença de calcofluor .....	46

<b>VI. DISCUSSÃO .....</b>	<b>49</b>
<b>VII. CONCLUSÃO .....</b>	<b>56</b>
<b>VIII. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>57</b>

**LISTA DE ABREVIATURAS**

PHB.....	Polihidroxibutirato
qrPCR.....	Quantificação relativa
qPCR.....	PCR quantitativo
PHA.....	Polihidroxialcanoatos
Bac.....	Bacterióides
Ct.....	Cycle threshold
NMP.....	Número mais Provável de Nódulos
FBN.....	Fixação Biológica do Nitrogênio

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Composição do meio <b>TY “Tryptone-Yeast Medium”</b> (BERINGER, 1.974) por litro. O pH do meio foi ajustado para 6.8. ....	<b>19</b>
<b>Tabela 2.</b> Composição do meio <b>YMA* “Yeast Manitol Agar”</b> (VINCENT, 1970) por litro. ....	<b>20</b>
<b>Tabela 3.</b> Composição do meio <b>RDM “modificado”</b> (BISHOP, 1976) por litro. ....	<b>20</b>
<b>Tabela 4.</b> Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para experimentos de quantificação relativa PCR em tempo real. ....	<b>27</b>
<b>Tabela 5.</b> Número de células das linhagens na fase <i>lag. log</i> e estacionária do desenvolvimento. ....	<b>34</b>
<b>Tabela 6.</b> Valores das análises do número mais provável de nódulos considerando os valores das diluições e sucessos obtidos quanto a formação de nódulos. ....	<b>34</b>
<b>Tabela 7.</b> Número de células das linhagens que foram inoculadas nas plantas de soja para determinação do número mais provável. ....	<b>35</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estratégias de nodulação em rizóbio a partir do reconhecimento de sinais liberados pela planta (flavonóides) induzindo proteínas reguladoras que induzem a síntese de genes da nodulação, estabelecimento do cordão de infecção e formação do nódulo (adaptado de DOWNIE, 2007).....**6**
- Figura 2.** Infecção das plantas por rizobio á partir do cordão de infecção, infecção das células corticais da raiz. (adaptado de OLDROYD & DOWNIE, 2008). .....**7**
- Figura 3:** Rotas Metabólicas para Produção de PHB. (REHM 2006) .....**12**
- Figura 4.** Cultivo de *B. elkanii* SEMIA 587 (L1- Preta), 587::*TnphoA*-24 (L2- Vermelha), 587::*TnphoA*-33 (L3- Azul), 587::*TnphoA*-50 ( L4- Verde ) durante oito dias e doze horas. Células foram coletadas nos tempos 24 h, 96 h, 192 h, correspondentes a períodos dentro das fases lag, log e estacionária, respectivamente. ....**30**
- Figura 5.** Filtrado etanólico resultante da extração do INT formazan sendo: a) Amostras correspondentes as linhagens A: *B.elkanii* 587 log ; B: 587::*TnphoA*-24 log ; C: 587::*TnphoA*-33 log ; D: 587::*TnphoA*-50 log.; B) Amostras correspondentes as linhagens A: *B.elkanii* 587 est. ; B: 587::*TnphoA*-24 est. ; C: 587::*TnphoA*-33 est. ; D: 587::*TnphoA*-50 est.....**32**
- Figura 6.** Resultados das análises espectrofotométricas dos extratos etanólicos provenientes das culturas nas fases de desenvolvimento logarítmica e estacionária, para as linhagens selvagem e mutantes. ....**33**
- Figura 7.** Filtrado etanólico resultante da extração do INT Formazan das amostras de bacterióides correspondentes às linhagens A: Bac. *B.elkanii* 587; B: Bac. 587::*TnphoA*-24; C: Bac. 587::*TnphoA*-33; D: Bac. 587::*TnphoA*-50.....**36**

**Figura 8.** Resultados das análises espectrofotométrica do extrato etanólicos provenientes das culturas na fase de desenvolvimento de bacterióides, para as linhagens selvagem e mutantes. ....36

**Figura 10.** Perfis eletroforéticos dos cDNAS da linhagens selvagem e mutantes gel de agarose 2,0% (p/v), contendo brometo de etídio (0,5 µg/µL). a) Canaletas: 1. Padrão de tamanho molecular (1 Kb DNA Ladder – FERMENTAS); 2. *B. elkanii* 587 log.;3. 587::*TnphoA*-24 log; 4. 587::*TnphoA*-33 log; 5. 587::*TnphoA*-50 log. b) Canaletas: 1. Padrão de tamanho molecular (1 Kb DNA Ladder – FERMENTAS); 2. *B. elkanii* 587 est.;3. 587::*TnphoA*-24 est.; 4. 587::*TnphoA*-33 log; 5. 587::*TnphoA*-50 est. ....38

**Figura 11.** Perfis eletroforéticos do produtos de PCR , para validação dos “primers” em gel de agarose 1,5% (p/v), contendo brometo de etídio (0,5 mg/µL). a) Canaletas: 1 . Padrão de tamanho molecular (100 pb DNA Ladder – FERMENTAS); 2 . *B. elkanii* 587 ;3. 587::*TnphoA*-24 ; 4. 587::*TnphoA*-33 ; 5. 587::*TnphoA*-50., amplificados para o gene *δA*; 6 . *B. elkanii* 587 ;7. 587::*TnphoA*-24 ; 8. 587::*TnphoA*-33 ; 9. 587::*TnphoA*-50., amplificados para o gene *fixN*. b) Perfil eletroforético do marcador de tamanho molecular 1pb DNA “ladder” (Fermentas), com as respectivas massas contidas em cada banda.....42

**Figura 12.** Perfis eletroforéticos do produtos de PCR , para validação dos “primers” em gel de agarose 1,5% (p/v), contendo brometo de etídio (0,5 mg/µL). a) Canaletas: 1 . Padrão de tamanho molecular (100 pb DNA Ladder – FERMENTAS); 2 . *B. elkanii* 587 ;3. 587::*TnphoA*-24 ; 4. 587::*TnphoA*-33 ; 5. 587::*TnphoA*-50., amplificados para o gene *glnA*; 6 . *B. elkanii* 587 ;7. 587::*TnphoA*-24 ; 8. 587::*TnphoA*-33 ; 9. 587::*TnphoA*-50., amplificados para o gene *glnB*; 10 . *B. elkanii* 587 11. 587::*TnphoA*-24 ; 12. 587::*TnphoA*-33 ; 13. 587::*TnphoA*-50., amplificados para o gene *phbA*; 14 . *B. elkanii* 587 ;15. 587::*TnphoA*-24 ; 16. 587::*TnphoA*-33 ; 17. 587::*TnphoA*-50., amplificados para o gene *phbB*; 18 . *B. elkanii* 587 ;19. 587::*TnphoA*-24 ; 20. 587::*TnphoA*-33 ; 21. 587::*TnphoA*-50., amplificados para o gene *phbC* ; .....42

- Figura 13.** Curvas de dissociação geradas para validação da eficiência dos “primers”: A – *phbA*; B- *phbB*; C – *phbC*; D- *glnA*; E – *glnB*; F –  $\delta A$ ; G - *nifH*; H – *fixN*. .....42
- Figura 14.** Expressão dos genes *glnA*, *glnB*, *fixN* e *nifH*, para as amostras, em simbiose, Bac. 587::*TnphoA*-24, Bac. 587::*TnphoA*-33 e Bac. 587::*TnphoA*-50, utilizando a amostra Bac. *B. elkanii* 587 como calibrador . .....43
- Figura 15.** Expressão dos genes *phbA*, *phbB*, *phbC*, *fixN* e *nifH*, para as amostras, em simbiose, Bac. 587::*TnphoA*-24, Bac. 587::*TnphoA*-33 e Bac. 587::*TnphoA*-50, utilizando a amostra Bac. *B. elkanii* 587 como calibrador. ....44
- Figura 16.** Expressão dos genes *glnA*, *glnB*, *phbA*, *phbB* e *phbC*, para as amostras, fase log, 587::*TnphoA*-24 log. , 587::*TnphoA*-33 log. e 587::*TnphoA*-50 log., utilizando a amostra *B. elkanii* 587 log. como calibrador .....44
- Figura 17.** Expressão dos genes *glnA*, *glnB*, *phbA*, *phbB* e *phbC*, para as amostras, fase estacionária, 587::*TnphoA*-24 est. , 587::*TnphoA*-33 est. e 587::*TnphoA*-50 est., utilizando a amostra *B. elkanii* 587 est. como calibrador.....45
- Figura 18.** a) 1. *B. elkanii* SEMIA 587, 2. 4080 $\Omega$ Z03; 3. 587::*TnphoA*-33; 4. 587::*TnphoA*-24; 5. 587::*TnphoA*-50; 6. 4080 $\Omega$ Z03 cultivados em placas de Petri contendo meio RDM modificado sólido adicionado um corante epifluorescente calcofluor bright 28-SIGMA na concentração final de 200 $\mu$ g/ml, visualizados sob luz UV . Estas bactérias foram crescidas por 24 h a temperatura de 30°C. b) 1. *B. elkanii* SEMIA 587, 2. 4080 $\Omega$ Z03; 3. 587::*TnphoA*-33; 4. 587::*TnphoA*-24; 5. 587::*TnphoA*-50; 6. 4080 $\Omega$ Z03 cultivados em placas de Petri contendo meio RDM modificado sólido adicionado o corante epifluorescente calcofluor bright 28-SIGMA na concentração final de 200  $\mu$ g/ml, visualizados sob luz UV . Estas bactérias foram crescidas por 72 h a temperatura de 30°C.. .....44

**Figura 19.** a) 1. *B. elkanii* SEMIA 587, 2. 4080ΩZ03; 3. 587::*TnphoA*-33; 4. 587::*TnphoA*-24; 5. 587::*TnphoA*-33; 6. 4080ΩZ03 cultivados em placas de Petri contendo meio RDM modificado sólido adicionado um corante epifluorescente calcofluor bright 28-SIGMA na concentração final de 200µg/ml, visualizados sob luz branca. Estas bactérias foram crescidas por 24 h a temperatura de 30°C. b) 1. *B. elkanii* SEMIA 587, 2. 4080ΩZ03; 3. 587::*TnphoA*-33; 4. 587::*TnphoA*-24; 5. 587::*TnphoA*-33; 6. 4080ΩZ03cultivados em placas de petri contendo meio RDM modificado sólido adicionado um corante epifluorescente calcofluor bright 28-SIGMA na concentração final de 200 µg/ml, visualizados sob luz branca. Estas bactérias foram crescidas por 72 h a temperatura de 30°C. ....44

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LINHAGENS MUTANTES DE *Bradyrhizobium elkanii* CARACTERIZADO POR PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL.**

**RESUMO-** O Brasil é considerado mundialmente o segundo maior produtor de soja, com perspectiva para a safra de 2011 /2012 entre 72,18 e 73,29 milhões de hectares. Bactérias do tipo *B.elkanii*, fixadoras de nitrogênio, estabelecem uma relação simbiótica com a soja convertendo o nitrogênio atmosférico em amônia, que é o composto assimilável pela planta. Essas bactérias diazotróficas, do tipo *Bradyrhizobium elkanii*, têm a capacidade de sintetizar e acumular polihidroxibutirato (PHB), homopolímero de origem afilática com propriedades semelhantes aos dos polipropilenos utilizado para a produção de plástico biodegradável. Linhagens mutantes para o aumento na síntese e acúmulo de polímero foram desenvolvidas e testadas visando interesse biotecnológico da aplicação comercial das mesmas. O objetivo foi analisar a fixação biológica do nitrogênio (*nifH* e *fixN*), conversão de amônia em aminoácidos (*glnA* e *glnB*) e acúmulo de polímero (*phbA*, *phbB* e *phbC*) através da análise por PCR em tempo real. As linhagens mutantes apresentaram expressão positiva e significativa para os genes de acúmulo e síntese de PHB *in vitro*; já em simbiose, apresentaram expressão negativa para os mesmos considerando a competição das vias de acúmulo de polímero e fixação biológica do nitrogênio. Frente ao potencial biotecnológico da aplicação industrial de polímeros de origem bacteriana, a análise por meio desta abordagem foi de fundamental importância para utilização futura e aprimoramento das linhagens mutantes de *B. elkanii*, bem como a análise expressão permitiu o conhecimento de interações metabólicas no processo de simbiose.

**Palavras-chave:** *phbC*, qPCR, fixação simbiótica do nitrogênio, expressão gênica, polihidroxibutirato.

## BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF MUTANT STRAINS OF *Bradyrhizobium elkanii* FEATURED IN REAL-TIME QUANTITATIVE PCR.

**SUMMARY-** Brazil is considered the world's second largest soybean producer, with prospects for the harvest of 2011/2012 between 72.18 and 73.29 million hectares. *B.elkanii* type bacteria, nitrogen fixing, establishing a symbiotic relationship with soybean converting atmospheric nitrogen into ammonia, which is the compound assimilated by the plant. These diazotroph, *Bradyrhizobium elkanii* type, have the ability to synthesize and accumulate polyhydroxybutyrate (PHB), homopolymer artificial source with similar properties to the polypropylenes used for the production of biodegradable plastics. Mutant strains for the increase in polymer synthesis and accumulation have been developed and tested in order biotechnological interest of commercial application of the same. The aim was to analyze the biological nitrogen fixation (*nifH* and *fixN*), conversion of ammonia into amino acids (*glnA* and *glnB*) and accumulation of polymer (*phbA*, *phbB* and *phbC*) by PCR analysis in real time. . The mutant strains exhibited significant and positive expression of genes for the synthesis of PHB accumulation and in vitro, whereas in symbiosis showed negative expression for them considering the competition of the process of accumulation of polymer and biological nitrogen fixation. Front of the biotechnological potential of the industrial application of polymers of bacterial origin, the analysis by this approach was crucial for future use and improvement of mutant strains of *B. elkanii* and expression analysis allowed the understanding of metabolic interactions in the process of symbiosis.

**Keywords:** *phbC*, qPCR, nitrogen fixation, gene expression, polyhydroxybutyrate.

## I. INTRODUÇÃO

O nitrogênio é um dos elementos, mais abundantes na atmosfera e composição vegetal, considerado sua importância quanto à composição de clorofila, aminoácidos, ácidos nucleicos, entre outras. Bactérias fixadoras de nitrogênio estabelecem uma relação simbiótica com a soja convertendo o nitrogênio atmosférico em amônia, que é o composto assimilável pela planta. As bactérias são atraídas por exudados liberados pela planta. Após esta quimiotaxia, ocorre a infecção nos pêlos radiculares da planta através da formação de um cordão de infecção, atingindo as células do córtex da raiz, permitindo que as bactérias se instalem no nódulo radicular. Após este processo, ocorre modificação da bactéria em bacterióide. Todo este processo é regulado por genes específicos de ambos os simbioses.

A bactéria *Bradyrhizobium elkanii*, além de formar nódulos em plantas de soja e posterior assimilação do nitrogênio, tem como função também a síntese de PHB (polihidroxibutirato) que está relacionada com a fonte de carbono oferecida pelo meio RDM (PAGANELLI, 2007). Tanto as espécies de *B. japonicum* quanto as de *B. elkanii* têm acúmulo de PHB quando em simbiose, comprovado por mutantes de *B. japonicum* para os genes *nifD*, *nifK* e *nifH*, mostrando competição entre as duas vias, carbono e nitrogênio (MOREIRA, 2006). O PHB consiste em uma forma de acúmulo de carbono e controle da razão carbono nitrogênio nas células.

Em 2010, o Brasil produziu 195 mil toneladas de resíduos sólidos/dia; o montante chegou a 60,8 milhões de toneladas de lixo, 20% desse volume correspondente aos plásticos. Estima-se, ainda, que o consumo mundial de plástico chegue a 140 milhões de toneladas/ano, sendo necessários 150 milhões de toneladas de combustível fóssil para a sua produção (SURIYAMONGKOL et al., 2007). Desta forma, torna-se essencial o desenvolvimento de alternativas que possam compatibilizar a praticidade do uso dos materiais plásticos e o desenvolvimento sustentável, permitindo o consumo e a conveniência, sem comprometer os recursos do planeta.

Uma das possíveis alternativas é a substituição dos polímeros de origem petroquímica pelos polihidroxialcanoatos (PHAs). Os PHAs são poliésteres microbianos sintetizados e acumulados intracelularmente por diversas espécies bacterianas. Estes possuem importantes propriedades termoplásticas que permitem sua aplicação em diversas áreas, como fabricação de embalagens, garrafas, filmes, fibras, produtos de higiene, pinos e suturas cirúrgicas, sistemas de liberação controlada de drogas e medicamentos, de inseticidas, entre outras. São insolúveis em água, enantioméricos puros, não tóxicos, biocompatíveis, biodegradáveis (STEINBÜCHEL & EVERSLOH, 2003), sendo produzidos, assim, a partir de matéria prima renovável. No entanto, apesar das vantagens para o ambiente, a produção em larga escala dos plásticos biológicos é mais cara quando comparada à produção dos plásticos de origem petroquímica.

*B. elkanii* apresentam a expressão dos genes *phbC* e *glgA*, envolvidos na síntese de polihidroxibutirato (PHB) (MARCONDES et.al. 2008; MARCONDES & LEMOS, 2011), polímero sintetizado por uma via metabólica de três reações (MADISON & HUISMAN, 1999). O Polihidroxibutirato é um homopolímero de origem bacteriana da família dos PHAs, que pode ser produzido em todas as fases de seu desenvolvimento, no entanto, algumas bactérias apresentam síntese de polímero em uma única fase do desenvolvimento. Apesar da expressão positiva de genes codificadores de enzimas envolvidas na síntese e acúmulo de PHB, bacterióides de *B. elkanii*, apresentam competitividade quanto a via de fixação do nitrogênio.

Microrganismos do tipo *B. elkanii*, acumulam esse polímero em vida livre de acordo com a fonte de carbono oferecida pelo meio (PAGANELLI, 2011) considerando dados obtidos por PCR em tempo real; PAGANELLI (2009) elaborou construções mutantes para o aumento na síntese e acúmulo de polímero tendo em vista o interesse biotecnológico da utilização do mesmo. Frente ao potencial biotecnológico de *B. elkanii* como inoculante natural para a cultura da soja, e tendo em vista a triagem de mutantes para a produção de plástico biodegradável, este trabalho teve por objetivo a análise da expressão gênica por PCR em tempo real dos genes: *nifH* (nitrogenase), *fixN*

(citocromo oxidase), *glnA* e *glnB* (síntese de aminoácidos), *phbA*, *phbB* e *phbC* (síntese de polihidroxibutirato)

O estudo destas linhagens tem importância para a possível aplicação biotecnológica e agronômica das mesmas.

## II. REVISÃO DE LITERATURA

### 1. *Bradyrhizobium elkanii*

As bactérias conhecidas, anteriormente, como sendo da família Rhizobiaceae estão, atualmente, segundo o Manual de Bacteriologia Sistemática de Bergey (GARRITY et al., 2006) divididas em: Rhizobiaceae (*Rhizobium*, *Allorhizobium* e *Sinorhizobium*), Phyllobacteriaceae (*Mesorhizobium*), Bradyrhizobiaceae (*Bradyrhizobium*) e Hyphomicrobiaceae (*Azorhizobium*).

A espécie *B. elkanii* foi determinada por KUYKENDAL et al. (1992) e, assim como *B. japonicum*, normalmente induz a formação de nódulos em espécies de plantas de soja (*Glycine max*) e siratro (*Macroptilium atropurpureum*). As linhagens brasileiras SEMIA 5019 (29W) e SEMIA 587 foram classificadas como pertencentes à espécie *B. elkanii* considerando-se a similaridade de seqüências 16S rDNA e a reatividade a anticorpos contra sorogrupos das linhagens internacionais, USDA76 e USDA 31 (RUMJANEK et al., 1993). Dessa forma, a linhagem SEMIA 587, utilizada neste estudo, perante a classificação atual, está incluída na nova família Bradyrhizobiaceae (GARRITY et al., 2006).

Linhagens da família Bradyrhizobiaceae além de realizar associação simbiótica com soja e fixar nitrogênio atmosférico têm a capacidade de sintetizar e acumular polihidroxibutirato, característica comum para algumas linhagens bacterianas, conforme a fonte de carbono oferecida pelo meio (PAGANELLI, 2011). Algumas linhagens bacterianas apresentam capacidade de sintetizar e acumular polímero em todas as fases de seu desenvolvimento. Bacterióides de *B. elkanii* apresentam expressão para os genes *phbC* e *glnA* para síntese e acúmulo de polihidroxibutirato e metabolismo de aminoácidos, respectivamente (SOUZA & LEMOS, 2011). O metabolismo do PHB por bacterióides pode ter papel regulatório na captura de carbono a agentes redutores a partir do ciclo TCA (Ácido tricarbóxico), sob condições microaeróbicas, impedindo a inibição enzimática do complexo nitrogenase pelo acúmulo de redutores e balanceando a quantidade de carbono metabolizado (PAGANELLI, 2011). O metabolismo do

glicogênio pode ter papel semelhante ao do PHB, ocorrendo inclusive um fluxo de carbono entre os dois compostos. (LODWIG & POOLE, 2003).

## **2. Relação Simbiótica e Fixação do Nitrogênio.**

### **2.1. Nodulação**

A colonização de tecidos vegetais, estabelecimento de relações simbióticas ou parasíticas e a compatibilidade entre microrganismos e hospedeiros são eventos complexos que requerem informações genéticas específicas (MARCONDES et al., 2010). Genes envolvidos em cada processo permitem que tais microrganismos infectem e se desenvolvam no hospedeiro, obtendo nutrientes e evitando mecanismos de defesa vegetal (ELLINGBOE, 1981; KEEN, 1988; MOREIRA, 2009).

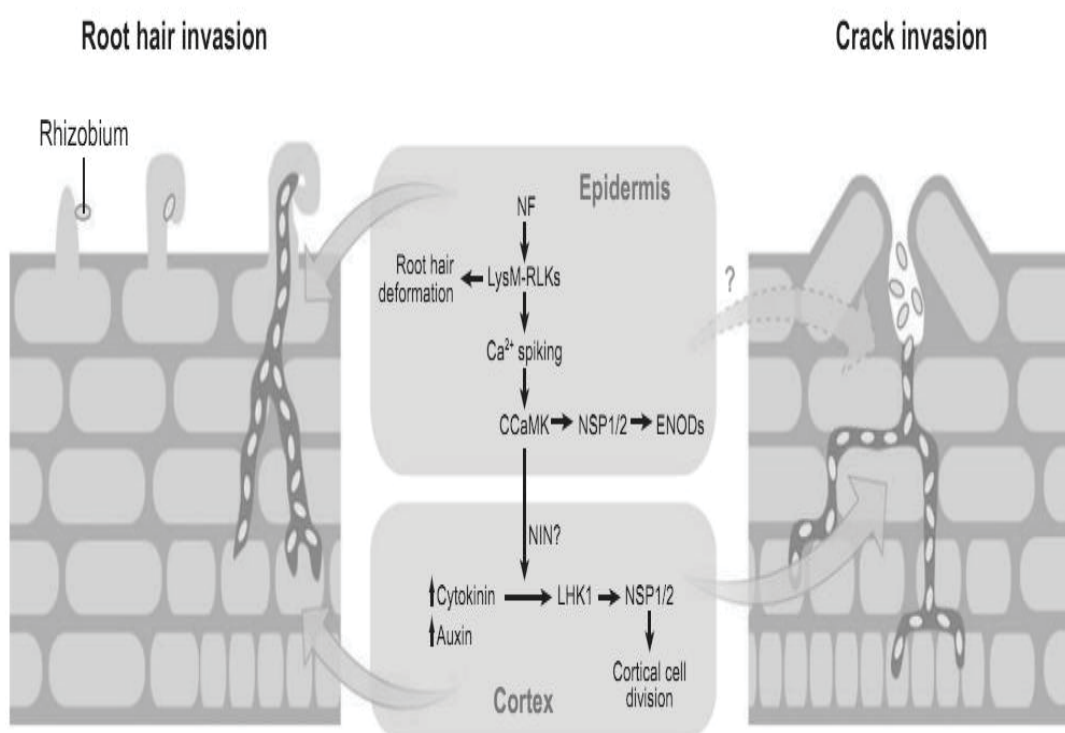
A infecção de raízes de certas plantas leguminosas por bactérias fixadoras de nitrogênio resulta na formação de estruturas especializadas denominadas nódulos. Bactérias do grupo dos rizóbios têm a capacidade de formar nódulos em raízes e caules de leguminosas e possuem papel importante na agricultura sustentável (FREITAS et al., 2007). Estas bactérias são habitantes no solo capazes de realizar associação com os pêlos radiculares das plantas hospedeiras. Essa associação é feita por sinais moleculares que iniciam o processo de nodulação, posteriormente dando origem aos nódulos (PERRET et al., 2000).

Os rizóbios no solo são atraídos em direção às raízes hospedeiras por um quimiotactismo positivo em função de exudados liberados pela planta. Em seguida à secreção de flavonóides pela planta ativam genes bacterianos chamados nod, produtores de quitooligossacarídeos, fatores Nod que atuam no reconhecimento do hospedeiro e na indução de genes envolvidos na formação do nódulo radicular (BOIVIN, 2009).

A percepção dos fatores nod pela planta, por sua vez desencadeia várias respostas simbiótica na raiz (Figura 1) da mesma, tais como: reconhecimento pelos receptores de membrana vegetal *LysM* que liberação de íons de cálcio promovendo ,



Após o início do estabelecimento do nódulo radicular, e infecção das células por rizóbios, uma vesícula simbiótica organela-símile é subsequente formada através de divisões e diferenciações tanto da membrana vegetal como da bactéria, formando o simbiossoma. No interior do simbiossoma, as bactérias por um processo de diferenciação geram a forma especializada na fixação de nitrogênio, o bacterióide (MARCONDES et al., 2008).



**Figura 2.** Infecção das plantas por rizobio á partir do cordão de infecção, infecção das células corticais da raiz. (adaptado de OLDROYD & DOWNIE, 2008).

## 2.2. Fixação Biológica do Nitrogênio

O nitrogênio é um elemento que constitui proteínas e ácidos nucléicos, duas classes mais importantes de macromoléculas. Apesar de o nitrogênio molecular compor cerca de 80% da atmosfera terrestre, não pode ser utilizado pela maioria das formas de

vida, pois é quimicamente inerte. Portanto este nitrogênio na sua forma molecular deve ser transformado, pois a maioria dos organismos vivos obtém este elemento em alguma forma combinada, como nitrato e amônia, ou outros compostos mais complexos.

Bactérias fixadoras de nitrogênio, ou diazotróficas, que apresentam características de associações simbióticas com leguminosas, podem fixar o nitrogênio ( $N_2$ ) diretamente da atmosfera reduzindo-o a amônia ( $NH_3$ ).

Bacterioides sintetizam o complexo da enzima nitrogenase, complexo de metalo enzimas com características funcionais e estruturais conservadas, para catalisar a redução do dinitrogênio (BURRIS, 1974; CRAWFORD, 2000). Este complexo consiste em duas proteínas essenciais para a redução do substrato: 1) A dinitrogenase ou Molibdo-ferro proteína (MoFe- proteína), tetrâmero que consiste de dois pares de subunidades não idênticas; e 2) A dinitrogenase redutase ou Ferro-proteína ( Fe-proteína) um dímero de subunidades idênticas. Esses complexos da nitrogenase são responsáveis pela fixação do nitrogênio no nódulo, em condições de baixa concentração de  $O_2$ . Os nódulos possuem uma heme proteína chamado de leghemoglobina que se liga ao oxigênio e que está presente em altas concentrações nos nódulos.

Na fixação biológica do nitrogênio a Fe-proteína e a MoFe-Proteína comandam as reações. A Fe-proteína freqüentemente é reduzida por um doador de elétrons, a ferredoxina reduzida (Fd). A Fe-proteína reduzida se liga com o magnésio-ATP (MgATP) e transfere elétrons para outra enzima a MoFe-proteína. Finalmente os elétrons são passados para o dinitrogênio, reduzindo-o em amônia ( $NH_3^+$ ), que é liberado por difusão do bacterióide para o citosol da célula infectada (BURRIS, 1999; TAIZ & ZIEGER, 2004). Depois de formado, o  $NH_3^+$  em contato com o substrato aquoso do citoplasma dos bacterióides é transformado em amônia ( $NH_4^+$ ) (TAIZ & ZIEGER, 2004). O acúmulo de  $NH_4^+$  inibe a fixação de nitrogênio dentro dos bacterióides, desta forma ele é transportado para interior da célula hospedeira, no centro do nódulo. Como o  $NH_4^+$  também é prejudicial a célula devido a diminuição na formação do ATP e do transporte de elétrons na cadeia respiratória, ele é incorporado em moléculas que não possuam efeito tóxico. As enzimas glutamina sintetase (GS) e a glutamato sintase

(GOGAT) convertem o  $\text{NH}_4^+$  em aminoácidos. A atividade destas enzimas aumenta durante desenvolvimento dos nódulos e com o aumento na disponibilidade de energia (ATP) no meio de reação (SILVA, 1998; BURRIS, 1999). O principal meio de transporte de nitrogênio da soja dos nódulos para a parte aérea é na forma de ureídeos, além da aspargina (KING & PURCELL, 2005).

### 3. Polihidroxicanoatos (PHA).

Os poli-hidroxicanoatos (PHAs) são uma família de homo ou heteropoliésteres biológicos, opticamente ativos, que contém unidades do monômero ácido (R) hidroxicanoico, variáveis, determinantes de sua estrutura e propriedades (SUDESH et al., 2000).

Os PHAs são biopolímeros que possuem propriedades semelhantes aos termoplásticos. As propriedades físicas e mecânicas desses materiais dependem da composição monomérica, do peso molecular e de sua distribuição, sendo estas influenciadas, diretamente, pela variação do grupamento R e pela posição do grupo carbonila (n) (FREITAS, 2007).

O peso molecular do polímero depende do organismo que o produz e das condições de cultivo, podendo variar de  $2 \times 10^5$  até  $6 \times 10^3$  KDa (CARMINATTI et al., 2006). A biossíntese de PHAs consiste em uma via de três reações, cujas enzimas são codificadas pelos genes *phaA*, *phaB* e *phaC*. Em algumas espécies de microrganismos, estes genes se encontram separados, enquanto em outras espécies estão no mesmo grupamento gênico ("clusters").

Os poli-hidroxicanoatos (PHAs) são biopolímeros produzidos por inúmeras bactérias sob condições apropriadas de cultivo (PIEMOLINI et al., 2004). Fisiologicamente, são macromoléculas de reserva energética, geralmente acumulados intracelularmente, na forma de grânulos no interior das células. (RODRIGUES, 2005). Estas inclusões são geralmente esféricas, com diâmetros médios de 0,2-0,5  $\mu\text{m}$ , visíveis em microscópio óptico por contraste de fase, devido à sua alta refratividade (KIM e LENZ, 2001).

### 3.1. O biopolímero: Poli(3-hidroxiacetato)

O poli(3-hidroxiacetato), ou PHB, é um homopolímero alifático, com repetidas unidades do ácido 3-hidroxiacético, sendo o poli hidroxiácido mais comumente produzido por microrganismos na natureza. Ele foi descoberto em 1925, por Maurice Lemoigne, no Instituto Pasteur, quando este estudava as inclusões citoplasmáticas da bactéria *Bacillus megaterium* (LEMOIGNE, 1926).

O PHB é um composto de uma classe dos polímeros termoplásticos chamados “polihidroxiácidos” que servem a muitas bactérias como uma maneira de armazenar dentro da célula, materiais que podem servir de reserva para obtenção de carbono e como fonte de energia para o caso de ausência de um dos dois (COUTINHO et al., 2004); este apresenta propriedades mecânicas similares às do polipropileno, tais como elevada cristalinidade, resistência à mistura, resistência à água, pureza óptica, boa estabilidade, (RODRIGUES, 2005). Devido a estas propriedades, apresenta potencial biotecnológico utilizado para produção de plástico biodegradável. O interesse sobre o PHB cresce cada vez mais pelas vantagens que apresenta sobre o plástico convencional, derivado do petróleo, e pelas exigências cada vez mais severas no controle de poluição, principalmente para os países desenvolvidos. Dentre as vantagens do uso do PHB destaca-se, principalmente, a biodegradação que o mesmo sofre na natureza. Na forma de plástico biodegradável este se decompõe em uma grande diversidade de ambientes, liberando apenas água e gás carbônico em ambientes aeróbios, sendo que em 60 semanas pode se alcançar 100% de degradação. Já em ambientes anaeróbios a degradação total se dá em seis semanas, porém produzindo além de água e gás carbônico, gás metano (CARMINATTI et al., 2006).

Além da biodegradabilidade, outras características importantes são a biocompatibilidade e a possibilidade de ser produzido a partir de fontes renováveis ou mesmo a partir de subprodutos e rejeitos industriais (BORMANN et al., 1998; FUKUI; DOI, 1998; YU, 2001; RODRIGUES, 2005). Segundo ORTEGA (2006), o PHB pode ser

utilizado na fabricação de embalagens para higiene, limpeza, cosméticos e produtos farmacêuticos, além de também ser empregado na produção de sacos e de vasilhames para fertilizantes e defensivos agrícolas. Pode ser usado na produção e artefatos mais flexíveis, como, por exemplo, frascos de xampu ou materiais que necessitam o processo de extrusão por sopro, como é o caso dos sacos plásticos. Outra aplicação promissora do PHB é na área médica humana e veterinária, em cápsulas gelatinosas para a ingestão de medicamentos ou na forma de pinos, fios, suturas e enxertos ósseos, materiais estes que poderiam ser assimilados naturalmente pelo organismo (MORENO, 2003).

Já foi desenvolvido um produto da mesma família do PHB, o PHB–HV (polihidroxibutirato–hidroxivalerato), que tem menor ponto de fusão e não é 100% degradável, como o PHB. A principal dificuldade no desenvolvimento do PHB está concentrada na escolha do tipo de bactéria (RAMALHO, 2009) e no custo da produção do PHB que ainda é muito elevado devido à complexidade do processo produtivo, que ocorre em várias etapas.

### **3.1.1. Vias de síntese e degradação do PHB**

A via metabólica pela qual o PHB é sintetizado consiste de três reações (MADISON e HUISMAN, 1999). A primeira reação consiste na condensação de duas moléculas de acetil–CoA em uma de acetoacetil–CoA, reação catalisada pela enzima beta–cetoacil–CoA transferase (EC 2.3.1.9), codificada pelo gene *phbA*. A segunda reação é a redução da molécula de acetoacetil–CoA para (R)–3 – hidroxibutiril–CoA, reação dependente de NADPH e catalisada pela enzima acetoacetil–CoA redutase (EC 1.1.1.36), codificada pelo gene *phbB*. Na terceira e última reação, os monômeros de (R)–3–hidroxibutiril–CoA são polimerizados em poli (3-.hidroxibutirato) pela enzima P(3HB) sintase (EC 2.3.1), codificada pelo gene *phbC*.(Figura3)

Apesar dos genes responsáveis pela síntese de PHB codificarem, basicamente, as mesmas enzimas para a maioria dos organismos, a organização no genoma varia de acordo com a espécie do microrganismo, pois em alguns deles não estão



(EC 6.2.1.1), sendo que esse será metabolizado pelo ciclo do ácido cítrico ou pelo ciclo do glicoxilato (SENIOR & DAVES, 1973).

### **3.1.2. O uso da engenharia genética para produção de PHB.**

O aumento das exigências ecológicas quanto a redução de resíduos sólidos, tem sido determinante para a utilização da engenharia genética tendo em vista a aplicação biotecnológica destes microrganismos no mercado visando o interesse econômico e ecológico.

Para a redução do custo de produção do PHB, vários pesquisadores fizeram o uso de técnicas de biologia molecular, traçando diversas estratégias, como por exemplo, modificações na via metabólica do ciclo do ácido tricarbóxico, ou mesmo na própria via de síntese do PHB. Uma alternativa foi o aumento na atividade das enzimas de biossíntese do PHB por amplificação do gene para obter maior número de cópias e isolar e elaborar linhagens geneticamente melhoradas. (PARK & LEE, 1996; KABIR & SHIMIZU, 2003; LEE et al., 2003; TAGUCHI et al., 2003).

Os genes envolvidos na síntese do PHB têm sido analisados extensivamente por técnicas bioquímicas e forneceram indícios sobre a regulação do processo (MADISON e HUISMAN, 1999). Mutações nos genes *glnB*, *glnZ* e *glnD* permitiram observar a participação destes genes na regulação da síntese e acúmulo de polímero, pelo aumento significativo da produção de PHB (SUN et al., 2002).

Outra estratégia utilizada pelos pesquisadores foi a clonagem dos genes responsáveis pela via de síntese do PHB em *Escherichia coli*, visto que esta é uma bactéria que não produz naturalmente PHB, mas é muito bem conhecida e utilizada como ferramenta genética, tornando-se fácil a sua manipulação genética e conseqüentemente a expressão de genes heterólogos (ALDOR & KEASLING, 2003). Entretanto, alguns estudos feitos com *E. coli* recombinante, mostraram baixa eficiência no acúmulo tanto em escala laboratorial como em industrial (HUANG et al., 2006). Isto pode ser devido a *E. coli* não possuir toda a maquinaria biossintética

necessária para a produção de PHB, sobrecarregando a maquinaria da célula para tal produção.

Análise da expressão gênica por PCR em tempo real para genes de acúmulo de PHB em linhagens de *Bradyrhizobium*, apresentam expressão positiva e significativa para o gene *phbC* em diferentes fontes de carbono, sendo sacarose a fonte determinada para o aumento de acúmulo de PHB, resultados os quais foram de fundamental importância para elaboração de linhagens geneticamente modificadas (PAGANELLI, 2011).

PAGANELLI, (2009) elaborou quatro linhagens mutantes de *B. elkanii* por inserção de genes para síntese e acúmulo de polímero. As linhagens mutantes PAGANELLI (2009), foram submetidas a análises bioquímicas, a partir da extração de PHAs. O 587::*TnphoA-33* se destacou quanto ao acúmulo intracelular de polímero, sendo equivalente a 72% de sua massa seca, um aumento de 20% em relação à linhagem selvagem.

O uso da engenharia genética foi de extrema importância para obtenção de linhagens que responderam de maneira positiva para às mutações.

#### **4. Quantificação Relativa**

Mudanças celulares relativas à sobrevivência, crescimento e diferenciação refletem em alterações nos padrões da expressão gênica e a capacidade de quantificar os níveis de transcrição de genes específicos sempre foi fundamental para qualquer investigação de funções gênicas (ZAMORANO et al., 1996; MOREIRA, 2009).

No início dos anos 80, Kary Mullis e colaboradores desenvolveram a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) que foi uma revolução nos estudos com ácidos nucleicos. Mas, como uma técnica analítica, o método original de PCR apresenta sérias limitações. Por amplificar primeiro a seqüência de DNA e só em seguida analisar o produto, a quantificação torna-se extremamente difícil, pois nesta análise, as bandas no gel de agarose são quantificadas por algum método densitométrico, não apresentando resultados totalmente confiáveis. HIGUCHI et al. (1992) adaptaram esta

técnica e desenvolveram a mais poderosa ferramenta de análise quantitativa de ácidos nucleicos, a técnica de PCR quantitativo em tempo real. Esta nova tecnologia beneficiou grandemente as áreas médica/diagnóstica, agropecuária e científica de modo geral.

Análise da reação em cadeia da polimerase em tempo real é uma técnica poderosa para estudos de expressão gênica, devido à sua alta sensibilidade, especificidade, ampla gama de quantificação, alto rendimento e perfil de expressão precisa de genes selecionados (DE JONGE, 2007).

Este sistema é baseado na detecção e quantificação de um repórter fluorescente, enquanto ocorre a amplificação. Para isso, utilizam-se oligonucleotídeos e sondas específicas ou ainda fluoróforos intercalantes de dupla fita, que emitem fluorescência a cada hibridização e a cada passo de amplificação (KUBISTA et al., 2006). 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 o acúmulo do produto em tempo real especificamente durante a fase log-linear da reação. Estas características fazem com que a PCR quantitativa em tempo real seja considerada a técnica mais precisa e reprodutível para a quantificação gênica que existe no momento (KUBISTA et. al., 2006).

A expressão gênica relativa é determinada a partir da comparação da expressão do gene-alvo com um ou mais genes denominados "housekeeping" ou genes endógenos-controle. Tais genes são utilizados como controles internos da expressão gênica, uma vez que apresentam expressão teoricamente constante, ou seja, sofrem pequena oscilação na expressão mediada por fatores reguladores externos, tais como hormônios, fatores de crescimento, entre outros. Devido a esta propriedade, tais genes são utilizados para correção da expressão gênica do gene-alvo. Como exemplos de genes "housekeeping" podem ser citados os codificadores: ciclofilina, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, proteína ribossomal,  $\beta$ -actina, RNA ribossomal, receptor de transferrina, entre outros. Por esse processo a qPCR permite ao investigador

determinar os níveis de expressão de um determinado conjunto de genes em uma variedade de amostras e é particularmente útil quando a quantidade de amostra é limitada.

### III. OBJETIVOS

#### 1. Objetivo Geral

Caracterizar a fixação do nitrogênio associado ao metabolismo respiratório e energético através das trocas de carbono e nitrogênio *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587 selvagem e mutante (gene *phbC*), para o aumento de polihidroxi butirato, por meio da análise da expressão gênica com PCR em tempo real (qrPCR).

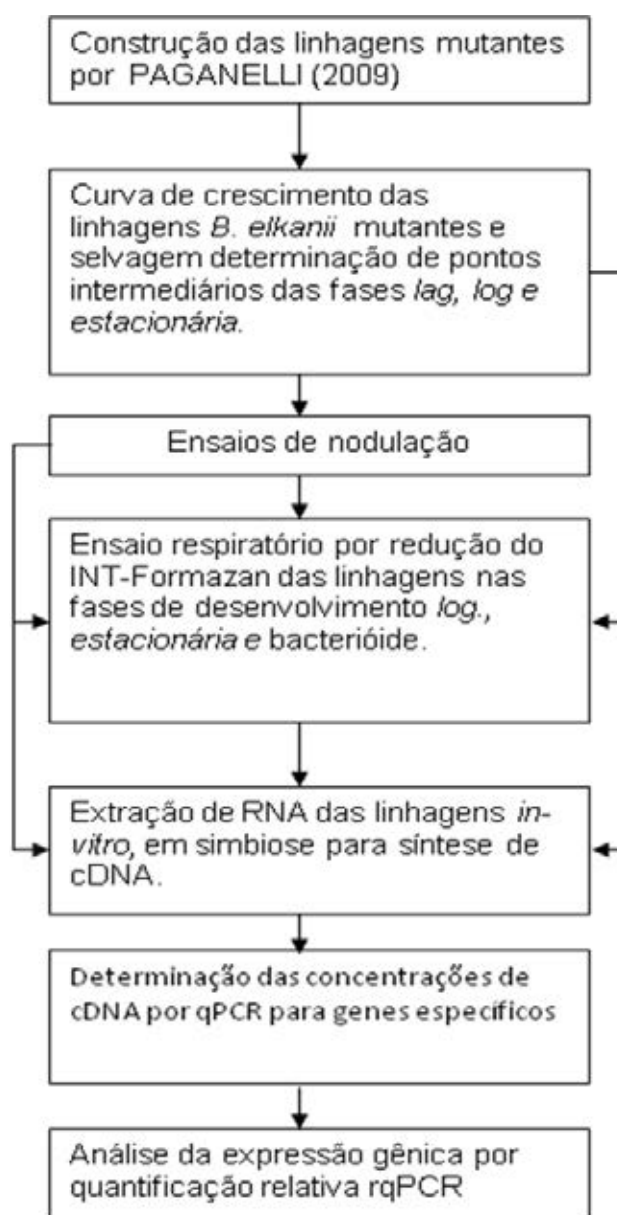
#### 2. Objetivos específicos.

- a. Avaliar o potencial de nodulação e fixação do N<sub>2</sub> das diferentes estirpes de *B. elkanii* selvagem e mutante.
- b. Avaliar o metabolismo respiratório das diferentes estirpes por ensaio bioquímico INT - Formazan.
- c. Avaliar a expressão dos genes: *nifH*, *fixN*, *phbA*, *phbB*, *phbC*, *glnA* e *glnB*, reguladores das taxas de carbono/ nitrogênio *in vitro* e em simbiose, por qPCR.
- d. Confirmar a triagem de mutantes com potencial biotecnológico para síntese e acúmulo de PHB

#### IV. MATERIAL E MÉTODOS

##### Fluxograma metodológico

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP). As etapas de desenvolvimento deste projeto podem ser visualizadas no fluxograma metodológico abaixo:



## Parte I – Análises bioquímicas e fisiológicas das culturas *in vitro* das linhagens de *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587 selvagem e mutantes para a síntese de PHB.

### 1. Amostras utilizadas.

Foram utilizadas as linhagens de *B. elkanii* SEMIA 587 e três mutantes, *587::TnphoA-24*, *587::TnphoA-33*, *587::TnphoA-50*, para síntese de polihidroxibutirato (PAGANELLI, 2009).

### 2. Condições de cultivo.

#### 2.1. Meios de cultura.

Para o cultivo da linhagem *B. elkanii* e seus mutantes, foram utilizados os meios de cultura TY, RDM (modificado) e YMA conforme descrito a seguir (Tabelas 1,2 e 3). Após o preparo os meios foram autoclavados por 20 minutos a 120°C a 1 atm.

O meio RDM modificado foi utilizado para o desenvolvimento e contagem de células em placa com o mesmo acrescido com 9 g/L Agar. Para a manutenção da pureza da cultura, o referido meio foi acrescido do corante vermelho congo, o qual indica possíveis contaminações, já que as linhagens de interesse não absorvem o corante, formando colônias brancas. A maioria das linhagens contaminantes absorve o corante formando colônias vermelhas.

**Tabela 1.** Composição do meio TY “**Tryptone-Yeast Medium**” (BERINGER, 1.974) por litro.

O pH do meio foi ajustado para 6.8.

Triptona	5g
Extrato de Levedura	3g
CaCl <sub>2</sub>	0.87g

**Tabela 2.** Composição do meio YMA\* “Yeast Manitol Agar”\*\* (VINCENT, 1970) por litro.

K <sub>2</sub> HPO <sub>5</sub>	0.50g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.20g
NaCl	0.1g
Manitol	10.0g
Extrato de Levedura	0.40g
Agar	0.40 g

\*Meio de cultura utilizado para a manutenção das linhagens mutantes e selvagem.

**Tabela 3.** Composição do meio RDM “modificado” (BISHOP, 1976) por litro.

K <sub>2</sub> HPO <sub>5</sub>	0.23g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.10g
Glutamato de sódio	1.1g
Elementos traços*	1,0mL/L

\*Os elementos traços são constituídos por: H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (145mg/L); FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (125mg/L); CuSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O(70mg/L); Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>(125mg/L) e nitrilotriacetato (7g/L).

## 2.2. Antibióticos

A solução do antibiótico utilizado foi preparada conforme descrito por SAMBROOK et al. (1989). A solução estoque de canamicina, foi preparada em água destilada na concentração de 100 mg/ml e esterilizado por filtração em filtro Millipore 0,22 µm. O antibiótico foi estocado a -20°C e adicionado aos meios de cultura imediatamente antes do uso na concentração final de 50 µg/ml de canamicina para cada uma das estirpes de *B. elkanii*.

### **3. Curva de crescimento das linhagens mutantes em meio definido RDM modificado.**

A curva de crescimento foi realizada em triplicata, a partir do preparo de um pré-inóculo inicial de cada linhagem mutante. Para a redução dos efeitos de possíveis células mortas, as bactérias cultivadas em meio sólido com respectiva fonte de carbono, foram recuperadas durante a fase exponencial de crescimento, 05 dias após plaqueamento inicial, através da raspagem de massa bacteriana com auxílio de alça de Drigalsky. A massa bacteriana de 03 placas foi diluída em 5mL de água milli-Ro estéril. A turbidez do pré-inóculo foi registrada através da leitura em um colorímetro fotoelétrico Klett-Summerson (Klett-Summerson (KLET MFG) com filtro vermelho, correspondente a um comprimento de onda correspondente com faixa 640-700 nm.

Dez unidades Kletts do pré inóculos, foram adicionados em frascos especiais *Side-arm* contendo 100 mL de meio de cultura RDM modificado acrescido de antibiótico para as linhagens mutantes. Após a inoculação, os frascos foram mantidos sob agitação constante, em um agitador orbital a 140 rpm por 192 h a 28°C. O crescimento celular foi avaliado através da leitura de turbides do meio de cultura nos momentos logo após a inoculação e a cada 12 h de cultivo de bactérias. A intensidade colorimétrica expressa o número de células nos permitiu determinar as fases lag, log e estacionária.

#### **3.1. Número de células viáveis dos cultivos:**

O controle do número de células viáveis nos pontos de 24h, 96h e 192h de curva de crescimento e a presença de contaminantes foram realizadas pela diluição e plaqueamento das suspensões bacterianas nestes pontos determinados, como controle da quantidade/qualidade de bactérias presentes no meio de cultura.

Para determinação da quantidade de bactérias existentes em cada frasco foram retirados 100 µl dos cultivos e adicionados a um microtubo contendo 900 µl de água estéril. Homogeneizou-se a suspensão através de 05 pipetagens sucessivas, originando

uma solução com concentração de diluição  $10^{-1}$ . Em seguida, foram retirados 100  $\mu$ l da solução  $10^{-1}$  e misturados com 900  $\mu$ l 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  $10^{-10}$ .

Alíquotas de 100  $\mu$ l das diluições  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$  para o ponto 24h,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  e  $10^{-7}$  para 96 h de cultivo e  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  e  $10^{-10}$  para 192 h de cultivo foram distribuídos em placas de petri contendo meio YMA. Este procedimento foi realizado em triplicata. Após a inoculação, as placas foram mantidas invertidas em uma B.O.D a 28°C durante 6 (seis) dias, quando se efetuou a contagem das UFC para o cálculo do número de célula/ml, pela fórmula  $n^{\circ}$  de células/ml =  $n^{\circ}$  UFC x Fator de Diluição x 10.

#### **4. Triagem dos mutantes de *B. elkanii* para produção de EPS (Exopolissacarídeos).**

##### **4.1. Crescimento em Meio Sólido Contendo Calcofluor.**

Devido à relação inversamente proporcional dos polímeros PHB e EPS, utilizou-se o teste com meio calcofluor para permitir a diferenciação das linhagens mutantes e selvagem de *B. elkanii* em relação à linhagem mutante EPS<sup>-</sup> de *R. tropici*. Para isso as estirpes de *B. elkanii*, selvagem e mutantes e linhagem mutante de *R. tropici* (4080ΩZ03), foram crescidas em placas de Petri utilizando meios de cultura RDM modificado acrescidos de Agar (9 g/L), acrescido de um corante epifluorescente com comprimento de emissão de 430nm (calcofluor bright-SIGMA) na concentração final de 200  $\mu$ g/ml. Este corante é específico para polissacarídeo que contem ligações do tipo  $\beta$ -1-4 ou  $\beta$ -1-3 (WOOD, 1980). A detecção da produção de EPS de cada estirpe foi determinada com a iluminação das placas por luz UV em um comprimento de onda de 365nm. As culturas também foram fotografadas em luz branca.

## 5. Ensaio respiratório pela redução do INT.

As culturas de linhagens de *B. elkanii* selvagem e mutades, nas fases de desenvolvimento logarítmica, estacionária e bacterioides, que foram isoladas como descrito no item 6.3 do Material e Métodos, foram crescidas em meio RDM modificado, e posteriormente foram submetidas a um ensaio bioquímico de redução de INT (2-(p-iodofenil)-3-(p-nitrofenil)-5-fenil tetrazolium) em INT-Formazan para verificação da taxa respiratória como descrito por ZIMMERMANN (1978), TREVORS (1984) E RODRIGUES (1992). Alíquotas de cinco mililitros provenientes das culturas acima foram incubadas por 2 h, a 28°C sob agitação de 200 rpm, protegidas da luz, com uma solução de INT 4mg/ml. Após este período, ocorreu a extração do INT-Formazan acumulado intracelularmente, das seguintes maneiras dois mililitros da mistura foram submetidos à extração do INT-Formazan com a adição de 5 ml de etanol absoluto. Esta mistura foi agitada vigorosamente durante 1 minuto em agitador de tubos tipo vórtex. Logo após, este extrato etanólico foi filtrado em membrana de 0,45µm e realizada a leitura espectrofotométrica do filtrado etanólico em uma densidade óptica de 480 nm. O restante do material contendo a suspensão celular foi fixado com 30 µl de formaldeído 37%.

## 6. Ensaio de Nodulação

### 6.1. Inoculação de plantas de soja

Sementes de soja, cultivar M-SOY 8000RR, foram desinfetadas pela ação de etanol 70%, durante 1 minuto, e hipoclorito de sódio 4% por 6 minutos. Após sucessivas lavagens em água destilada esterilizada, seis a sete vezes por 1 minuto cada (VINCENT, 1970) foram semeadas 3 sementes de soja em vasos plásticos (tubetes) de 300 ml, contendo vermiculita esterilizada como substrato de plantio.

O desbaste foi efetuado 5 dias após o plantio e estabelecidos quatro tratamentos de inoculação com uma suspensão de Bradirrizóbio: 1) *B. elkanii* selvagem

SEMIA 587, 2) *587::TnphoA-24*, 3) *587::TnphoA-33* e 4) *587::TnphoA-50*, contendo cerca de  $10^9$  unidades formadoras de colônias por mL (Absorbância 0.8-1.0 com comprimento de onda 545nm). Toda a água empregada no experimento era destilada e não continha traços de cálcio. Após a queda dos cotilédones, os vasos receberam solução nutritiva de GIBSON (1987) isenta de N, com pH ajustado para 6.0, sendo aplicado em cada tubete 10 ml de solução nutritiva a cada sete dias. Após 35 dias da semeadura foi efetuada a colheita.

## 6.2. Número mais provável de nódulos.

Sementes de soja, cultivar M-SOY 8000RR, foram desinfetadas pela ação de etanol 70%, durante 1 minuto, e hipoclorito de sódio 4% por 6 minutos. Após sucessivas lavagens em água destilada esterilizada, seis a sete vezes por 1 minuto cada (VINCENT, 1970) foram semeadas 3 sementes de soja em vasos plásticos (tubetes) de 300 ml, contendo vermiculita esterilizada como substrato de plantio.

A quantidade de bactérias a ser inoculadas foi feito por diluição seriada: 1ml dos cultivos bacterianos acrescidos em meio RDM ( *B. elkanii* , *587::TnphoA-24*, *587::TnphoA-33*, *587::TnphoA-50* ) e adicionados a tubo de ensaio contendo 9 ml de água estéril. Homogeneizou-se a suspensão através de 05 pipetagens sucessivas, originando uma solução com concentração de diluição  $10^{-1}$ . Em seguida, foram retirados 1 ml da solução  $10^{-1}$  e misturados com 9 ml 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  $10^{-8}$ .

Alíquotas de 1 ml das diluições  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  e  $10^{-8}$  foram inoculadas na plantas, em triplicata após o desbaste . Toda a água empregada no experimento era destilada e não continha traços de cálcio. Após a queda dos cotilédones, os vasos receberam solução nutritiva de GIBSON (1987) isenta de N, com pH ajustado para 6.0, sendo aplicado em cada tubete 10 ml de solução nutritiva a cada sete dias. Após 35 dias da semeadura foi efetuada a colheita. As análises foram realizadas de acordo como descrito por

KOACH,1981; ALEXANDER, 1982; BROCKWELL,1982; SOMASEGARAM & HABEN, 1985.

A quantidade de bactérias inculadas em tubetesconsistiu de alíquotas de 100 µl das diluições  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  e  $10^{-8}$  para cada condição de cultivo foram distribuídos em placas de Petri contendo meio YMA. Este procedimento foi realizado em triplicata. Após a inoculação, as placas foram mantidas invertidas em uma B.O.D. a 28°C durante 6 (seis) dias, quando se efetuou a contagem das UFC para o cálculo do número de célula/ml, pela fórmula  $n^{\circ}$  de células/ml =  $n^{\circ}$  UFC x Fator de Diluição x 10.

### **6.3. Isolamento de bacterióides**

O isolamento de bacterióides dos nódulos foi efetuado conforme metodologia descrita por CHOCHAN & COPELAND (1998), na presença de 250 mM de manitol como osmoprotetor, utilizando o tampão composto por 50 mM Tris-HCl pH 7,5 e 50 mM KCl. Os bacterióides foram obtidos de nódulos maduros, dos quatro tratamentos, *B. elkanii* SEMIA 587 e três mutantes, *587::TnphoA-24*, *587::TnphoA-33*, *587::TnphoA-50*, correspondendo à aproximadamente 35 dias após plantio/inoculação. A extração de RNA procedeu-se com 0,6 g de nódulo por amostra como o descrito no item 1 da parte dois do Material e Métodos.

## **Parte II – Análises da expressão gênica das linhagens selvagem e mutante de *B. elkanii*.**

### **1. Extração de RNA total de bactérias e bacterióides.**

As células provenientes dos diferentes cultivos contendo linhagens selvagem e mutante (1,5 ml por amostra) foram lisadas com 100 µl de solução contendo SDS 1,4%, EDTA 4 mM e lisozima 3 mg/ml, durante 10 min a 37°C. Após a lise das células, foi dado prosseguimento às extrações com Trizol (Invitrogen) adicionando 800 µl deste reagente e agitando-se por 1 minuto vigorosamente em agitador de tubos. O próximo

passo foi a adição de 200 µl de clorofórmio, seguido de uma centrifugação a 12.000xg durante 15 minutos a 4°C, conforme descrito pelo fornecedor. Após a recuperação da fase superior, a precipitação do RNA foi com 1 volume de isopropanol, procedendo-se à lavagem do pelete com 500 µl de etanol 75%. O RNA foi ressuscitado em água isenta de ribonucleases. A avaliação da qualidade do RNA isolado foi através de eletroforese em gel de agarose 1,2% desnaturante, contendo 18% (v:v) de formaldeído 37% em tampão MOPS/Acetato/EDTA 1x concentrado. As amostras foram tratadas com DNase I sendo 1 µl para cada 1µg de RNA, incubados por 15 min. a 37 °C e precipitadas novamente com etanol.

### **1.1. Transcrição Reversa:**

Para obtenção dos cDNAs, 2 µg de RNA total de cada amostra (da linhagens de *B. elkanii* e mutantes nas fases desenvolvimento *log* e estacionária, e bacterióides), foram misturados a 40 U de RNAsin (Promega), inibidor de RNase; 1,5 µg de “random hexamer primers” pd(N)6 (Amershan Bioscience) e água isenta de ribonucleases q.s.p. 10 µl. A mistura permaneceu incubada a 70°C por 5 min, sendo rapidamente resfriada a 4°C. A esta mistura foi adicionado 4 µl de tampão de reação [5x] (Promega), 2,4 µl de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 2 µl de dNTP mix 5 mM e 1 µl da transcriptase reversa ImProm II (Promega), completando reações de 20 µl. A síntese do cDNA foi efetuada a 40°C durante 15 h Após a síntese as amostras foram estocadas a -20°C para posterior utilização. As amostras foram avaliadas em gel de agarose 2%.

## **2. Descrição dos genes alvos e do controle endógeno utilizados na quantificação relativa de transcritos.**

Foram selecionados dois genes relacionados ao metabolismo de aminoácidos *glnA* e *glnB*, dois para fixação biológica do nitrogênio, *nifH* e *fixN*, e três envolvidos na síntese e acúmulo de PHB *phbA*, *phbB* e *phbC* para análise. As sequências FASTA foram obtidas do banco interno do LBMP (<http://lbmp.fcav.unesp.br>) ou do RhizoBase

(<http://genome.kazusa.or.jp/rhizobase>), contendo sequências genômicas de *B. elkanii* e *B. japonicum*. Após a escolha dos genes alvos, as sequências dos oligonucleotídeos iniciadores foram construídas utilizando-se o programa *Primer Express 3.0*. As sequências para cada primer estão ilustrados na Tabela 4

**Tabela 4.** Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para experimentos de quantificação relativa PCR em tempo real.

Gene	Oligonucleotídeos	Amplicon(pb)
<i>fixN</i>	Forward: 5' TGGTGGTACGGCCATAACG3' Reverse: 5'GCTTCGGGATGAAGTAGTACATGA3'	54
<i>nifH</i>	Forward: 5'TCGGAGAAATGATGGCAAT3' Reverse: 5'CGTATTTTCAGGATGCCTTTGGA3'	57
<i>δA</i>	Forward: 5'AGGCGAAGGACAAGGAAAAAG3' Reverse: 5'GGCGCGTCCTGGGAAT3	65
<i>phbA</i>	Forward: 5'AGGCGAAGGACAAGGAAAAAG3' Reverse: 5'GGCGCGTCCTGGGAAT3'	65
<i>phbB</i>	Forward: 5'CCAGATGGGCCAGGTCAA3' Reverse: 5'GCCTTCACGAAGCCGATATC3'	50
<i>phbC</i>	Forward: 5'CGAATTGACGCTCTTCATCAAC3' Reverse: 5'ACGCACCGGCCATCTG3'	56
<i>glnA</i>	Forward: 5'GTACGACCATCACCAT3' Reverse: 5'AAGCGCATGTCGATCTCGTT3'	57
<i>glnB</i>	Forward: 5'GGGACACGCCGAGCTTA3' Reverse: 5' CGATCACGATCTCGATCTTCAC3'	60

O fator  $\delta A$  (fator sigma primário da RNA polimerase) foi utilizado como controle endógeno, uma vez que a expressão deste gene constitutivo mostra-se praticamente invariável, servindo de padrão normalizado para análise comparativa das variações de expressão dos outros genes (MARCONDES & LEMOS, 2011). O sistema SYBR Green foi usado como repórter nas análises de qPCR.

### 2.1. PCR qualitativo para validar os “primers” RT usado na qPCR.

Foi realizada uma PCR para validar os pares de oligonucleotídeos iniciadores (*glnA*, *glnB*, *phbA*, *phbB*, *phbC*, *nifH* e *fixN*) antes de usar nas reações de PCR em tempo real. Foram utilizados as amostras de cDNA dos diferentes tratamentos de *B. elkanii* SEMIA 587, 587::*TnphoA-24*, 587::*TnphoA-33* e 587::*TnphoA-50* para a condição estacionária nas concentrações a saber: 1, 0,5 , 0,2 e 0,1ng; 200 µM de cada dNTP; 2,5 µl de tampão de reação [10x] (Fermentas); 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 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 amostras permaneceram em termociclador utilizando o programa: 1) 95°C por 2 min; 2) 40 ciclos de 95°C por 30 s, Ta 55°C por 30 s e 72°C por 1 min ; 3) 72°C por 5 min. Ao término de cada reação, as amostras foram analisadas em gel de agarose 2%.

### 3. Otimização da reação por PCR quantitativo em tempo real para os oligonucleotídeos iniciadores

A análise dos oligonucleotídeos iniciadores foi realizada por amplificação em PCR em tempo real nas seguintes concentrações: 200, 400 e 800 nM. A reação de PCR para validar os “primers” (*glnA*, *glnB*, *phbA*, *phbB*, *phbC*, *nifH* e *fixN*) foi também analisada em gel de agarose 2%. A concentração de cDNA original [1 µg], 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).

#### 3.1. Quantificação Relativa da expressão gênica

Para quantificação relativa foram utilizados 1µl de cDNA sintetizado nas condições descritas anteriormente (item 3.2), 800 nM de cada primer (Forward e Reverse) para cada gene a ser estudado, 12.5 µL de PCR Master Mix SYBR Green [2x]

(Applied Biosystems) e água isenta de nucleases q.s.p. 25µl. O experimento de quantificação relativa foi executado em placas ópticas e conduzido em um aparelho ABI 7500 (Applied Biosystems), seguindo as condições térmicas de ciclagem automaticamente determinadas pelo equipamento: 1) 2 minutos / 40°C (ativação da AmpErase UNG); 2) 10 minutos / 95°C (ativação da AmpliTaq Gold DNA polimerase); 40 ciclos de 15 segundos / 95°C (dissociação) e 1 minuto / 60 °C (anelamento / extensão e captação da fluorescência).

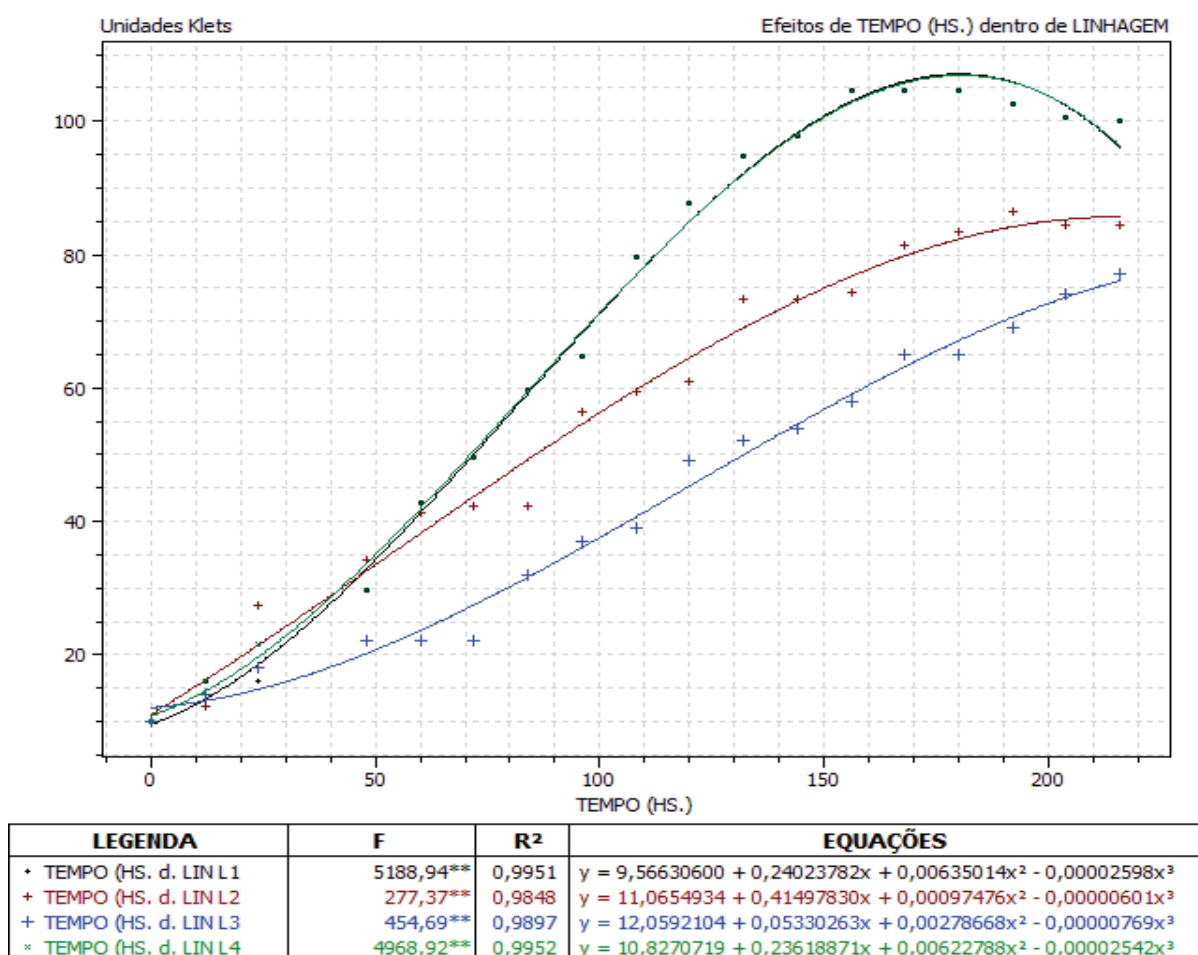
### 3.2. Análise dos Dados

A análise dos dados gerados e a quantificação relativa dos níveis de expressão dos genes foram executadas através do programa *RQ Study* (Applied Biosystems). O programa utiliza o método comparativo do Ct (“threshold cycle”) de quantificação relativa, calculando automaticamente o quanto houve de variação na expressão do gene alvo em relação ao controle endógeno. Este método baseia-se no algoritmo  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , que gera o valor da expressão do gene alvo, normalizada pelo controle endógeno (“ABI Prisma 7700 Sequence detection System User Bulletin #2”). O Ct consiste no valor do Ct do alvo, menos (-) o valor do Ct do controle endógeno. De posse dos valores de  $\Delta Ct$ , calcula-se o  $\Delta\Delta Ct$ , que é o  $\Delta Ct$  da amostra a ser analisada (situações experimentais) menos (-) o  $\Delta Ct$  do calibrador (amostra de referência), experimentos relacionados a linha (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). A linhagem selvagem SEMIA 587, “*in vitro*” e em simbiose, foram escolhidas como calibrador das taxas de expressão dos genes nas condições de cultivos observadas. O ajuste da linha de base e do “*threshold*” foram automaticamente determinados pelo programa.

## V. RESULTADOS

### 1. Cultivo Bacteriano

O desenvolvimento das linhagens *B.elkanii* SEMIA 587, 587::*TnphoA*-24, 587::*TnphoA*-33 e 587::*TnphoA*-50 foi analisado através da alteração da turbidez do meio de cultura RDM modificado. Observam-se na Figura 4 as curvas de crescimento obtidas através dos gráficos das unidades Klett após 216 h de cultivo.



**Figura 4.** Cultivo de *B. elkanii* SEMIA 587 (L1- Preta), 587::*TnphoA*-24 (L2- Vermelha), 587::*TnphoA*-33 (L3- Azul), 587::*TnphoA*-50 ( L4- Verde ) durante oito dias e doze horas. Células foram coletadas nos tempos 24 h, 96 h, 192 h, correspondentes a períodos dentro das fases *lag*, *log* e estacionária, respectivamente.

As linhagens apresentavam as fases de desenvolvimento desconhecidas, quanto à fonte de carbono, sacarose, padronizada por PAGANELLI, 2011. A partir dos resultados pode-se observar que as taxas de crescimento das linhagens *B.elkanii* 587 e 587::*TnphoA*-50 foram semelhantes quanto ao perfil de crescimento exponencial que pode ser observado pela curva gerada pelo “software *Agroest*” (Figura 4). No entanto as linhagens 587::*TnphoA*-33 e 587::*TnphoA*-24 evidenciaram um perfil de desenvolvimento bacteriano menos exponencial, menos acentuado, quando comparado às demais linhagens, o que evidencia taxas de crescimento menores.

### 1.1. Controle de contaminação dos cultivos e número de células viáveis

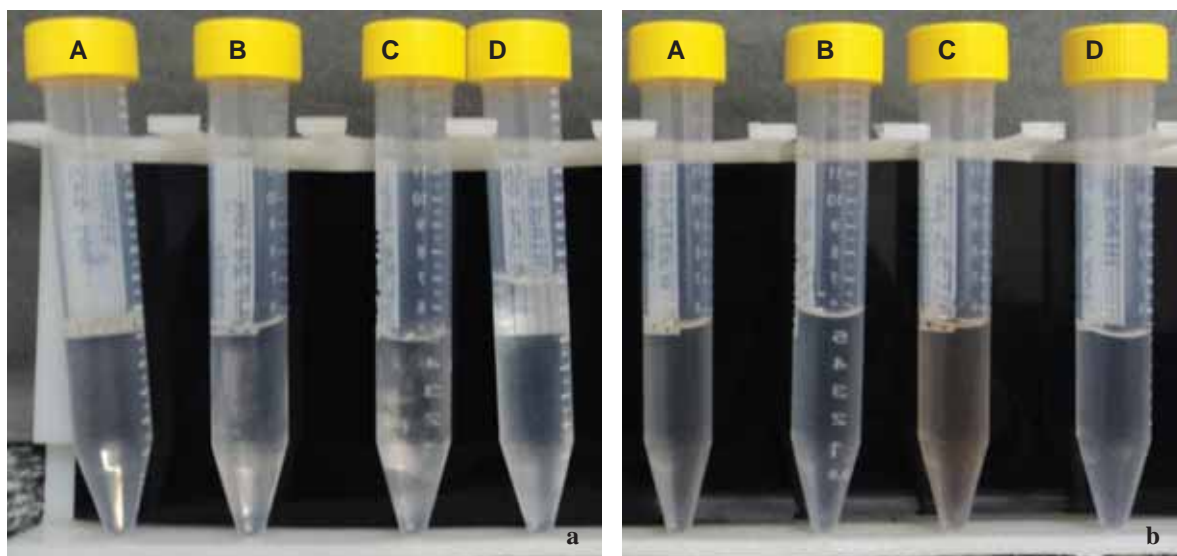
O controle do número de células viáveis na curvas de crescimento e a presença de contaminantes foram realizados pela diluição e plaqueamento das suspensões bacterianas obtidos a partir dos pontos determinados através da curva gerada pela leitura de unidades de turbidez, *lag.* (24h), *log.* (96h) e *estacionária* (192h). Em todas as condições de cultivo não foi observado a presença de contaminantes, o pré-inóculo para cada linhagem foi determinado em unidades Klets. O número de células esta estipulado na Tabela 5.

**Tabela 5.** Número de células das linhagens na fase *lag.* *log* e *estacionária* do desenvolvimento.

	<b>Lag. (24h)</b>	<b>Log. (96 h)</b>	<b>Estacionária(192 h)</b>
<b><i>B. elkanii</i> 587</b>	1,85x10 <sup>8</sup> cel./ml	5,72x10 <sup>9</sup> cel./ml	2,8x10 <sup>11</sup> cel./ml
<b>587::<i>TnphoA</i>-24</b>	1,39x10 <sup>8</sup> cel./ml	4,5x10 <sup>8</sup> cel./ml	2,7x10 <sup>11</sup> cel./ml
<b>587::<i>TnphoA</i>-33</b>	1,71x10 <sup>8</sup> cel./ml	1,82x10 <sup>9</sup> cel./ml	1,65x10 <sup>11</sup> cel./ml
<b>587::<i>TnphoA</i>-50</b>	4,50x10 <sup>8</sup> cel./ml	1,7x10 <sup>9</sup> cel./ml	2,4x10 <sup>10</sup> cel./ml

## 1.2. Ensaio Respiratório por Redução do INT das Diferentes Fases de Cultivo.

As linhagens selvagem e mutantes foram submetidas a ensaios respiratórios por redução do INT formazan, considerando que a molécula compete com o oxigênio como acceptor final de elétrons na cadeia respiratória. A partir da metodologia de ZIMMERMANN (1978), TREVORS (1984) E RODRIGUES (1992), foi possível evidenciar, diferenças quanto a coloração do filtrado etanólico ( Figura 5) para as diferentes condições e tempos de cultivo das linhagens. Os valores de densidade óptica (D.O) dos extratos foram exportados para análise a fim de gerar um gráfico que permitisse a comparação dos resultados visuais com os de D.O . (Figura 6).

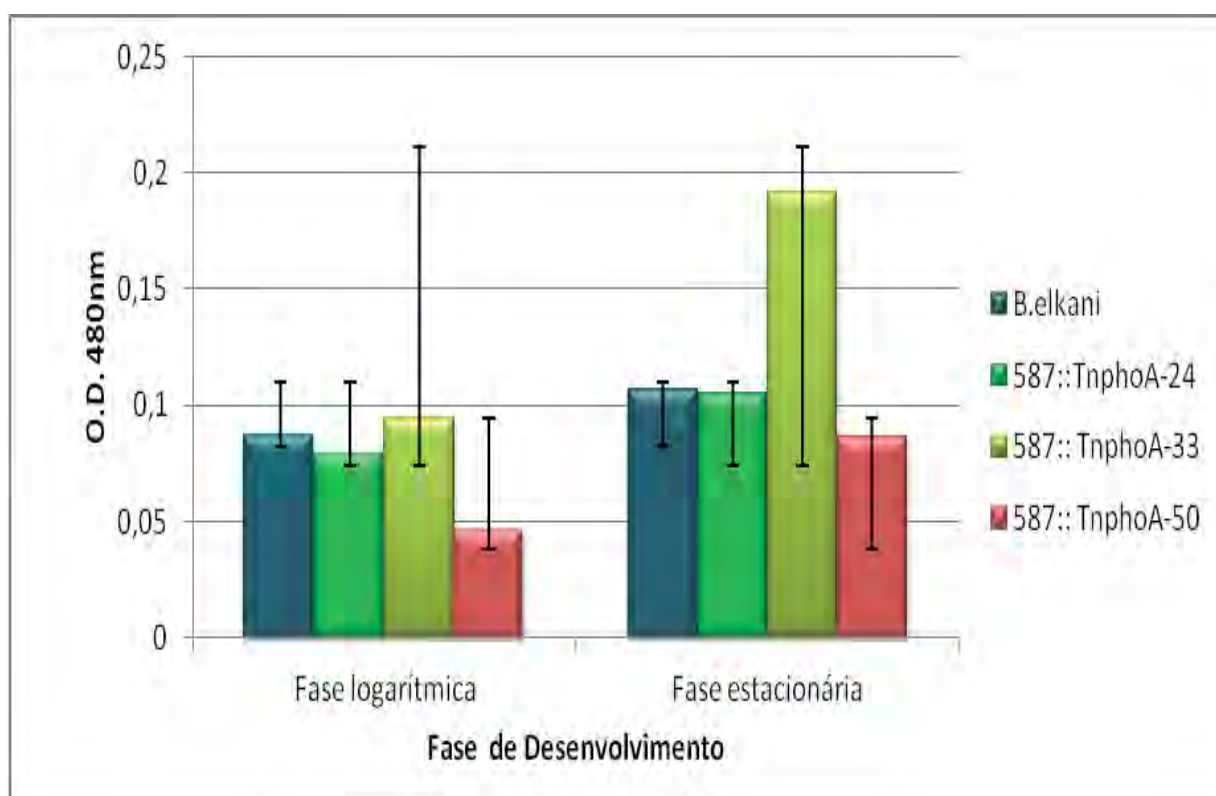


**Figura 5.** Filtrado etanólico resultante da extração do INT formazan sendo: **a)** Amostras correspondentes as linhagens A: *B.elkanii* 587 log ; B: 587::*TnphoA-24* log ; C: 587::*TnphoA-33* log ; D: 587::*TnphoA-50* log.; **b)** Amostras correspondentes as linhagens A: *B.elkanii* 587 est. ; B: 587::*TnphoA-24* est. ; C: 587::*TnphoA-33* est. ; D: 587::*TnphoA-50* est.

As linhagens em fase logarítmica e estacionária apresentaram diferenças visíveis quanto a coloração do filtrado etanólico, considerando que as amostras de fase

estacionária apresentaram maior número de células, além de que a amostra 587::*TnphoA-33* ( C, Figura 5b) apresentou coloração mais avermelhada em relação às demais amostras fato que pode ser evidenciado no gráfico (Figura 6).

Como pode ser visto na Figura 5, as linhagens que não apresentaram coloração avermelhada conseqüentemente apresentaram valores de D.O menores, oriundas do menor número de células e menor atividade metabólica. Já nas linhagens em fase de crescimento estacionária as análises visuais corroboram com os dados do gráfico. A linhagem 587::*TnphoA-33* apresentou coloração mais avermelhada e D.O maior em relação à linhagem controle *B.elkani*.



**Figura 6.** Resultados das análises espectrofotométricas dos extratos etanólicos provenientes das culturas nas fases de desenvolvimento logarítmica e estacionária, para as linhagens selvagem e mutantes.

## 2. Ensaio de Nodulação

### 2.1. Número mais Provável de Nódulos

O número mais provável de nódulos permitiu evidenciar a eficiência quanto a formação de estrutura simbiótica, através de presença (sucesso) e ausência (insucesso) de nódulos relacionados com as diluições da suspensão bacteriana inicial. A partir dos resultados positivos e negativos em cada uma das diluições das suspensões inoculadas, pode-se estimar na concepção matemática, o número de células viáveis de rizóbios na amostra. Estes valores que podem ser encontrados nas Tabelas 6 e 7 (KOACH,1981; ALEXANDER, 1982; BROCKWELL,1982; SOMASEGARAM & HABEN, 1985).

A partir dos resultados obtidos, determinou-se o número de células /ml a partir dos valores da tabela padrão, que considera o número de células viáveis por unidade de volume baseado no número de diluições que foram inoculadas.

As diluições foram plaqueadas para obter o número de células inoculado em cada tratamento permitindo a correlação entre o número de nódulos e células por mililitros como pode ser visto na Tabela 7.

**Tabela 6.** Valores das análises do número mais provável de nódulos considerando os valores das diluições e sucessos obtidos quanto a formação de nódulos.

Amostras	1	0,1	0,01	NMP	Prob.(%)	IC (min.)	IC (max.)
<i>B.elkani</i> 587	3	3	3	> 5,254	0.000	2.574	11,478
<i>587::TnphoA-24</i>	3	3	3	>5,254	0.000	2.574	11,478
<i>587::TnphoA-33</i>	3	3	3	>5,254	0.000	2.574	11,478
<i>587::TnphoA-50</i>	3	3	3	>5,254	0.000	2.574	11,478

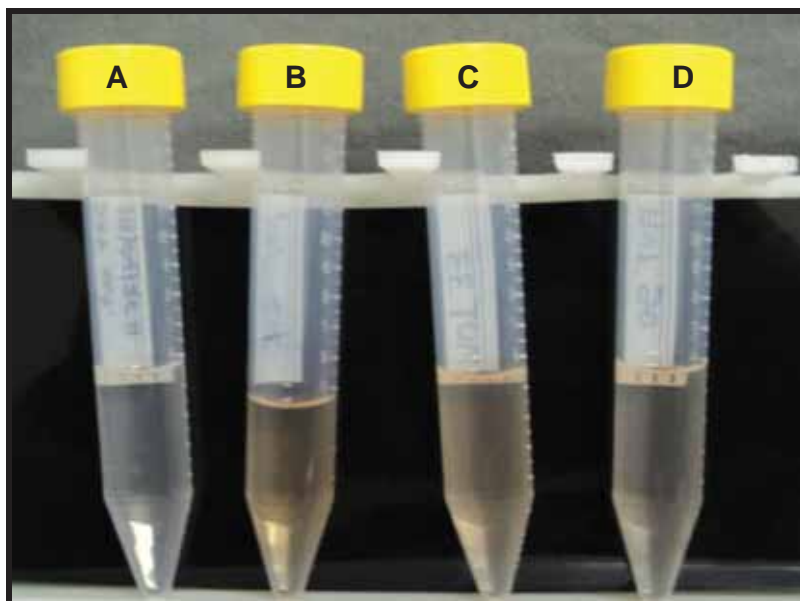
**Tabela 7.** Número de células das linhagens que foram inoculadas nas plantas de soja para determinação do número mais provável.

	<i>B. elkanii</i> 587	587:: <i>TnphoA-24</i>	587:: <i>TnphoA-33</i>	587:: <i>TnphoA-50</i>
10 <sup>-6</sup>	3,21x10 <sup>9</sup> cel./ml	3,12x10 <sup>9</sup> cel./ml	1,70x10 <sup>9</sup> cel./ml	5,6x10 <sup>9</sup> cel./ml
10 <sup>-7</sup>	2,23x10 <sup>10</sup> cel./ml	5,8x10 <sup>10</sup> cel./ml	1,92x10 <sup>10</sup> cel./ml	4,3x10 <sup>10</sup> cel./ml
10 <sup>-8</sup>	6,3x10 <sup>10</sup> cel./ml	7,8x10 <sup>10</sup> cel./ml	4,5x10 <sup>10</sup> cel./ml	3,3x10 <sup>10</sup> cel./ml

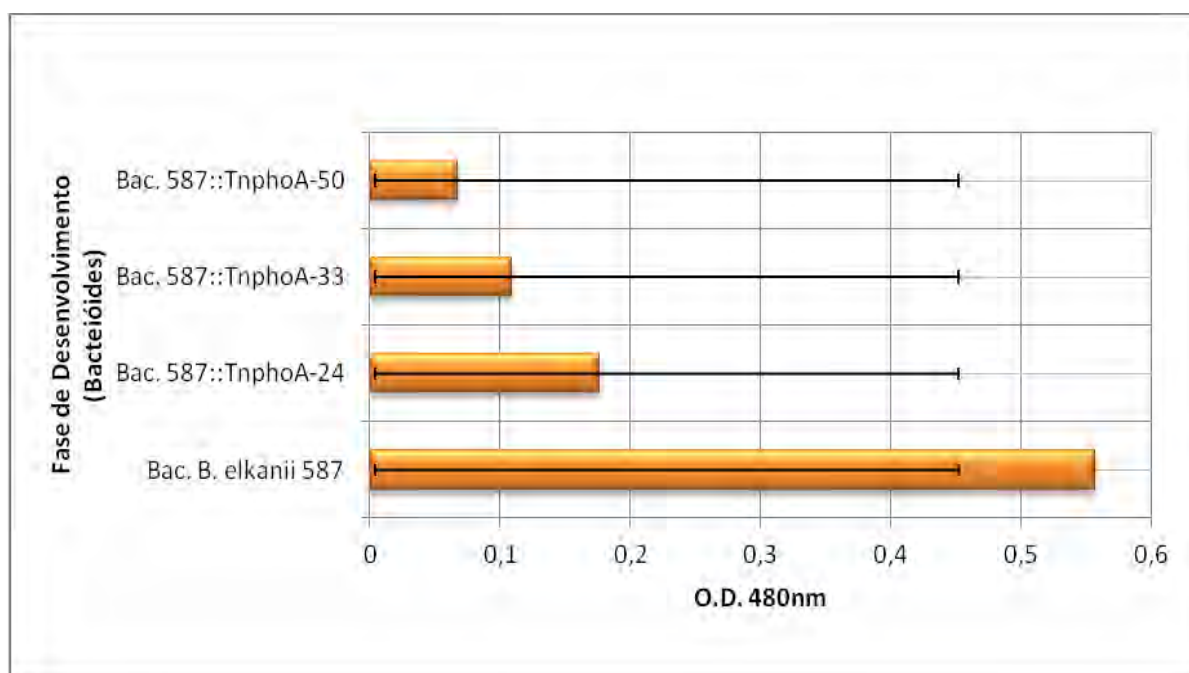
Além de se observar a eficiência no processo de nodulação, a partir de análises visuais do interior de nódulos de soja foi possível observar a baixa efetividade da capacidade de fixação simbiótica pelas linhagens mutantes, uma vez que os nódulos apresentavam coloração esverdeada.

## 2.2. Ensaio respiratório por redução do INT de bacterióides.

As análises por redução do INT permitiram observar o potencial respiratório em bacterióides em função da atmosfera de O<sub>2</sub>. As análises visuais permitiram observar coloração mais avermelhada nas amostras das linhagens mutantes em relação a linhagem de *B. elkanii*. Contudo a linhagem selvagem apresentou-se melhor quanto a nodulação e eficiência de fixação, conforme resultados de D.O do filtrado etanólico (Figura 7 e 8).



**Figura 7.** Filtrado etanólico resultante da extração do INT Formazan das amostras de bacterióides correspondentes às linhagens A: *Bac. B.elkanii* 587; B: *Bac. 587::TnphoA-24*; C: *Bac. 587::TnphoA-33*; D: *Bac. 587::TnphoA-50*.

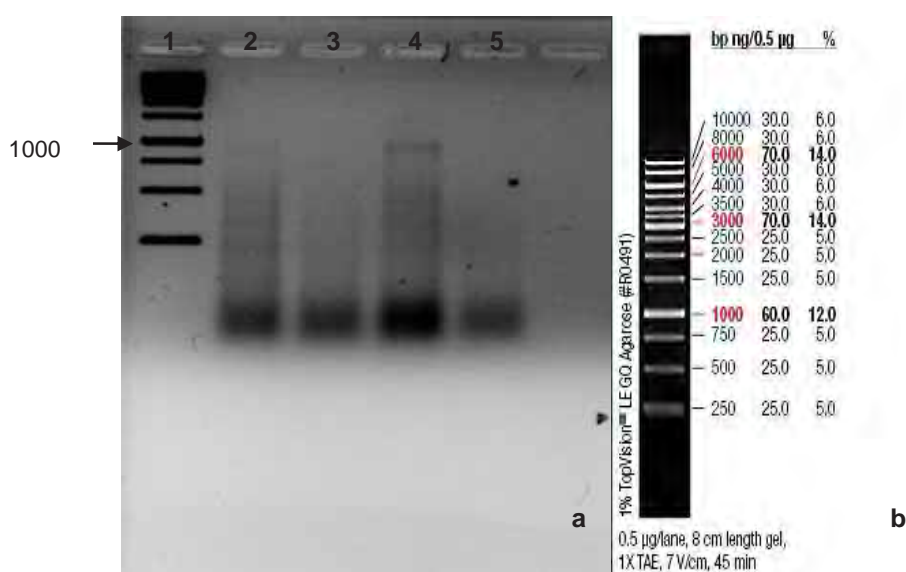


**Figura 8.** Resultados das análises espectrofotométrica do extrato etanólicos provenientes das culturas na fase de desenvolvimento de bacteroides, para as linhagens selvagem e mutantes.

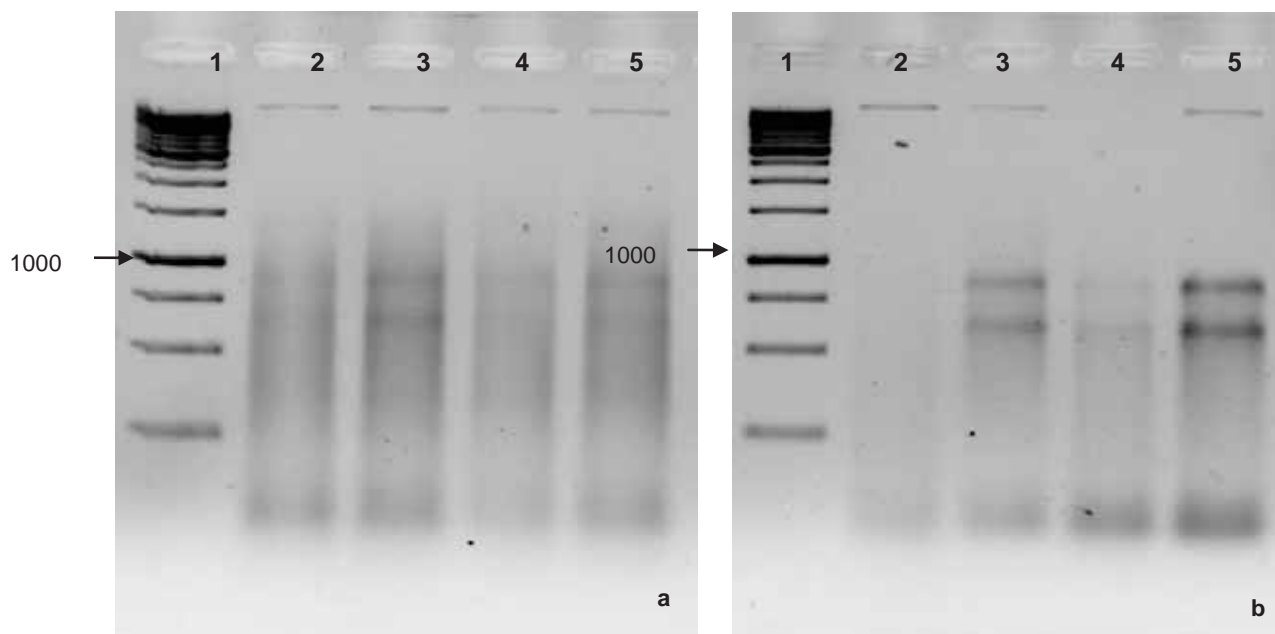
### 3. Análise da expressão gênica:

#### 3.1. Síntese de cDNA.

As linhagens bacterianas, na fase de bacterióides foram submetidas a extração de RNA para síntese de cDNA (Figuras 9 e 10), visando quantificação e posterior utilização para as reações de PCR e PCR em tempo real.



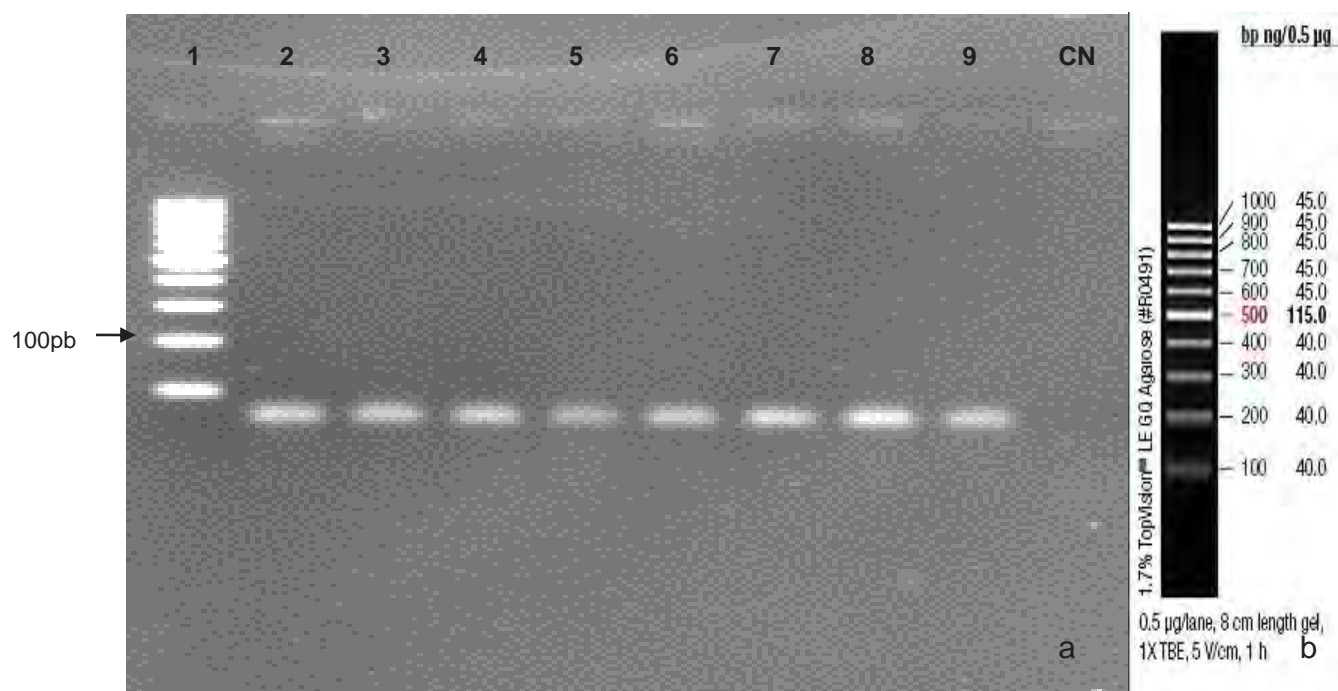
**Figura 9.** Perfis eletroforéticos dos cDNAs da linhagens selvagem e mutantes na fase de bacterióides. em gel de agarose 2.0 % (p/v), contendo brometo de etídio (0,5 mg/µL). a) Canaletas: 1. Padrão de tamanho molecular (1 Kb DNA Ladder – FERMENTAS); 2. *B. elkanii* 587 ;3. 587::*TnphoA*-24 ; 4. 587::*TnphoA*-33 ; 5. 587::*TnphoA*-50. b) Perfil eletroforético do marcador de tamanho molecular 1Kb DNA “ladder” (Fermentas), com os valores das respectivas massas contidas em cada banda.



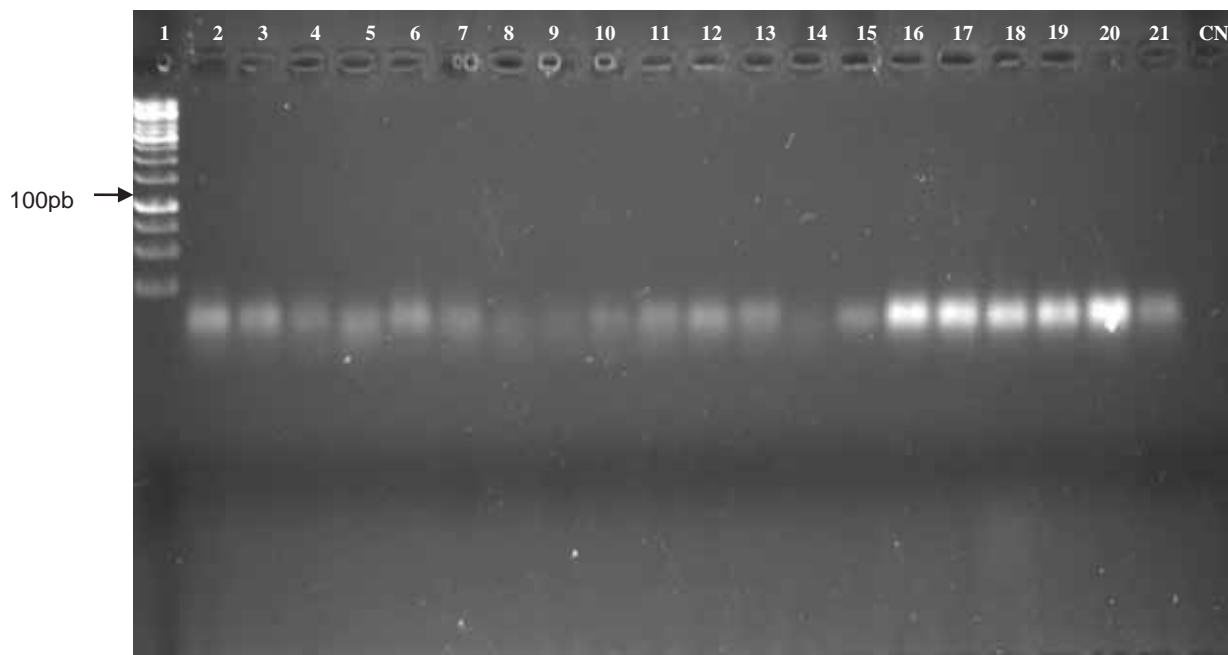
**Figura 10.** Perfis eletroforéticos dos cDNAs da linhagens selvagem e mutantes gel de agarose 2,0% (p/v), contendo brometo de etídio (0,5 mg/μL). a) Canaletas: 1. Padrão de tamanho molecular (1 Kb DNA Ladder – FERMENTAS); 2. *B. elkanii* 587 log.; 3. 587::*TnphoA*-24 log; 4. 587::*TnphoA*-33 log; 5. 587::*TnphoA*-50 log. b) Canaletas: 1. Padrão de tamanho molecular (1 Kb DNA Ladder – FERMENTAS); 2. *B. elkanii* 587 est.; 3. 587::*TnphoA*-24 est.; 4. 587:: *TnphoA*-33 log; 5. 587::*TnphoA*-50 est.

### 3.2. Validação das condições dos iniciadores por PCR.

Os oligonucleotídeos foram submetidos à padronização para observar o perfil eletroforético das amostras em função da concentração de cDNA. Foi padronizada as condições para os iniciadores dos genes *glnA*, *glnB*, *nifH*, *fixN*, *sigmaA*, *phbA*, *phbB* e *phbC*, sendo essas: [1x] de tampão reação; 0,75 mM de MgCl<sub>2</sub>; 200 mM de dNTPs; 10 pMol de cada iniciador; 100 ng de cDNA, em fase bacteroides, e 1U de TaqDNA polimerase, completando com água para um volume final de 25μL. Nestas condições, obteve-se uma banda única, próximo a 100 pb, a qual corresponde ao “amplicon”, que era esperado para tal produto de PCR (Figura 11 e 12).



**Figura 11.** Perfis eletroforéticos dos produtos de PCR, para validação dos “primers” em gel de agarose 1,5% (p/v), contendo brometo de etídio (0,5 mg/µL). **a)** Canaletas: 1. Padrão de tamanho molecular (100 pb DNA Ladder – FERMENTAS); 2. *B. elkanii* 587 ;3. 587::*TnpA*-24 ; 4. 587::*TnpA*-33 ; 5. 587::*TnpA*-50., amplificados para o gene  $\delta A$ ; 6. *B. elkanii* 587 ;7. 587::*TnpA*-24 ; 8. 587::*TnpA*-33 ; 9. 587::*TnpA*-50., amplificados para o gene *fixN*. **b)** Perfil eletroforético do marcador de tamanho molecular 1pb DNA “ladder” (Fermentas), com as respectivas massas contidas em cada banda.



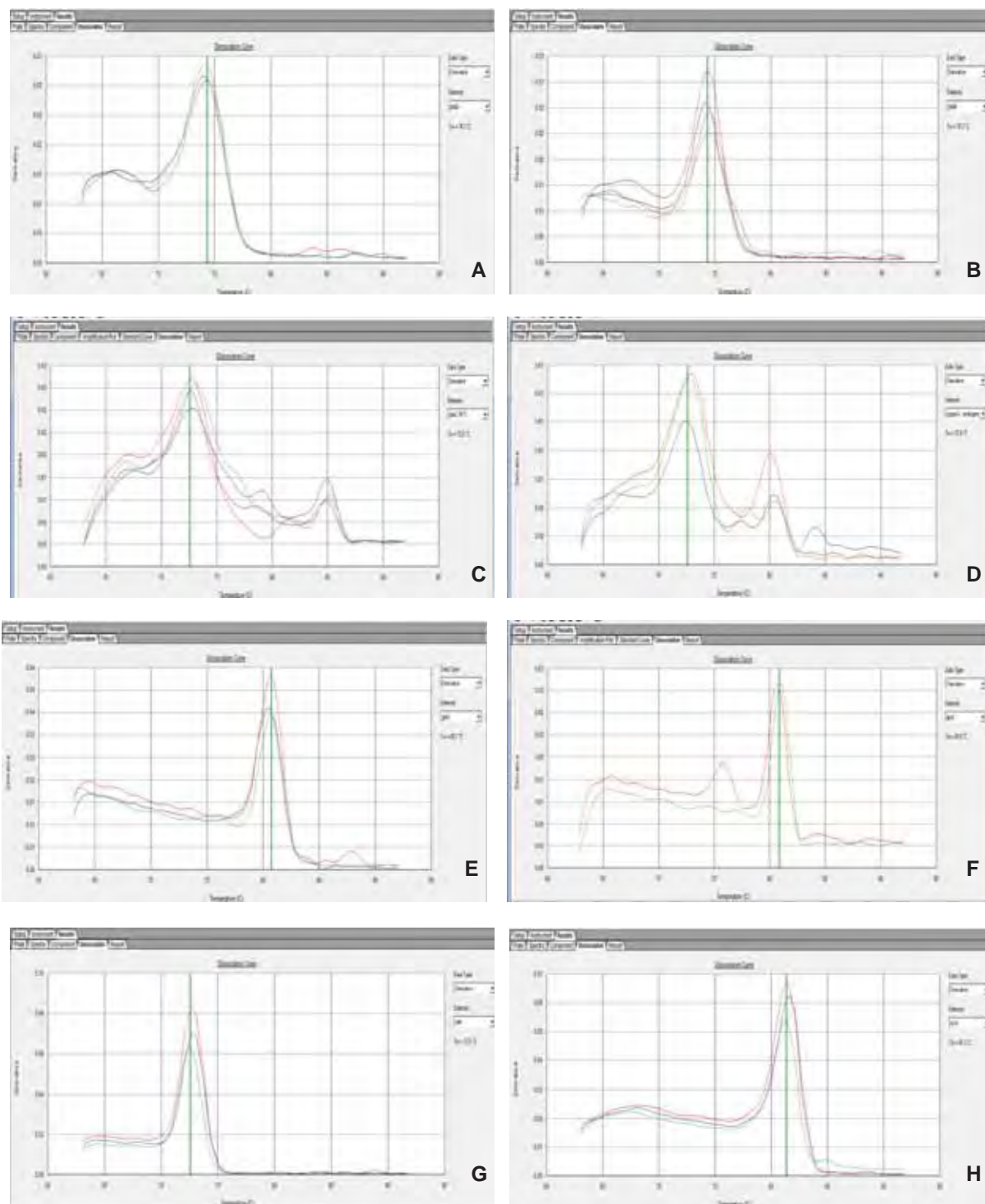
**Figura 12.** Perfis eletroforéticos do produtos de PCR , para validação dos “primers” em gel de agarose 1,5% (p/v), contendo brometo de etídio (0,5 mg/μL). a) Canaletas: 1 . Padrão de tamanho molecular (100 pb DNA Ladder – FERMENTAS); 2 . *B. elkanii* 587 ;3. 587::*TnphoA*-24 ; 4. 587::*TnphoA*-33 ; 5. 587::*TnphoA*-50., amplificados para o gene *glnA*; 6 . *B. elkanii* 587 ;7. 587::*TnphoA*-24 ; 8. 587::*TnphoA*-33 ; 9. 587::*TnphoA*-50., amplificados para o gene *glnB*; 10 . *B. elkanii* 587 11. 587::*TnphoA*-24 ; 12. 587::*TnphoA*-33 ; 13. 587::*TnphoA*-50., amplificados para o gene *phbA*; 14 . *B. elkanii* 587 ;15. 587::*TnphoA*-24 ; 16. 587::*TnphoA*-33 ; 17. 587::*TnphoA*-50., amplificados para o gene *phbB*; 18 . *B. elkanii* 587 ;19. 587::*TnphoA*-24 ; 20. 587::*TnphoA*-33 ; 21. 587::*TnphoA*-50., amplificados para o gene *phbC* ;

### 3.3. Ensaio de validação de iniciadores por PCR quantitativa em tempo real absoluta, eficiência de cDNA e ensaio de Dissociação.

Para ensaio de validação de “primers” e de cDNA, uma PCR quantitativa em tempo real absoluta foi realizada. Nesta, uma grande variedade de concentrações de “primers” e quantidades de cDNA em diversas diluições foram utilizadas a fim de se verificar as melhores condições para aumentar assim a eficiência e, conseqüentemente, a especificidade da reação. Ao final deste processo as concentrações que apresentaram uma amplificação / emissão de fluorescência dentro dos mesmos padrões para as amostras analisadas foram escolhidos para a realização da qPCR. A

análise dos “*primers*” se deu pela realização de reações contendo 200, 400 e 800 nM dos mesmos. À medida que a concentração de “*primers*” aumentou, uma diminuição no Ct foi observada. Após análise, a concentração de 800 nM foi a que apresentou a melhor amplificação tendo em vista o Ct em que ocorrem as detecções. A análise para determinação da concentração de “*primers*” esteve diretamente relacionada com a quantidade de cDNA na reação.

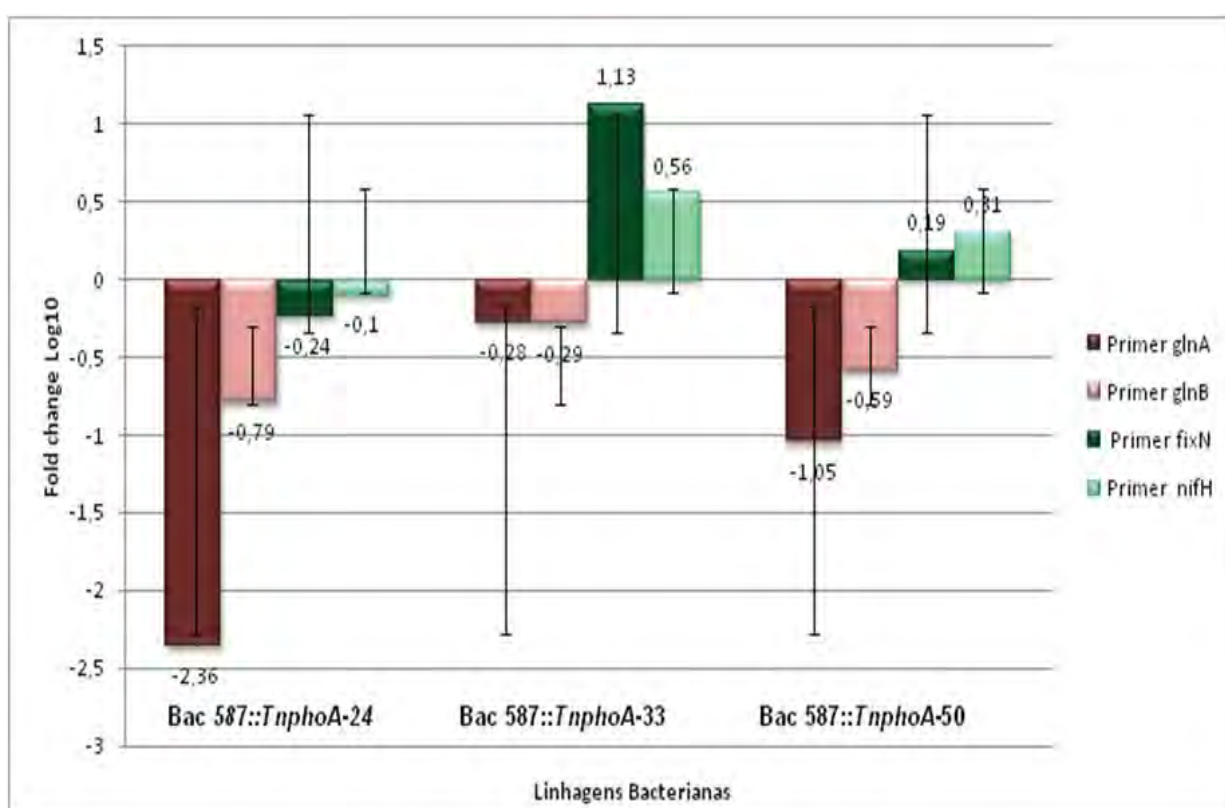
Curvas de dissociação (Figura 13) foram geradas no fim da PCR quantitativa absoluta, por aumento progressivo na temperatura da reação, calculando uma proporção na diminuição da emissão de fluorescência. Quando um único pico é observado na dissociação, indica que apenas um único produto está presente. Embora estes alguns oligonucleotídeos tenham apresentados picos inespecíficos não eram significativos para temperatura esperada para este amplicon.



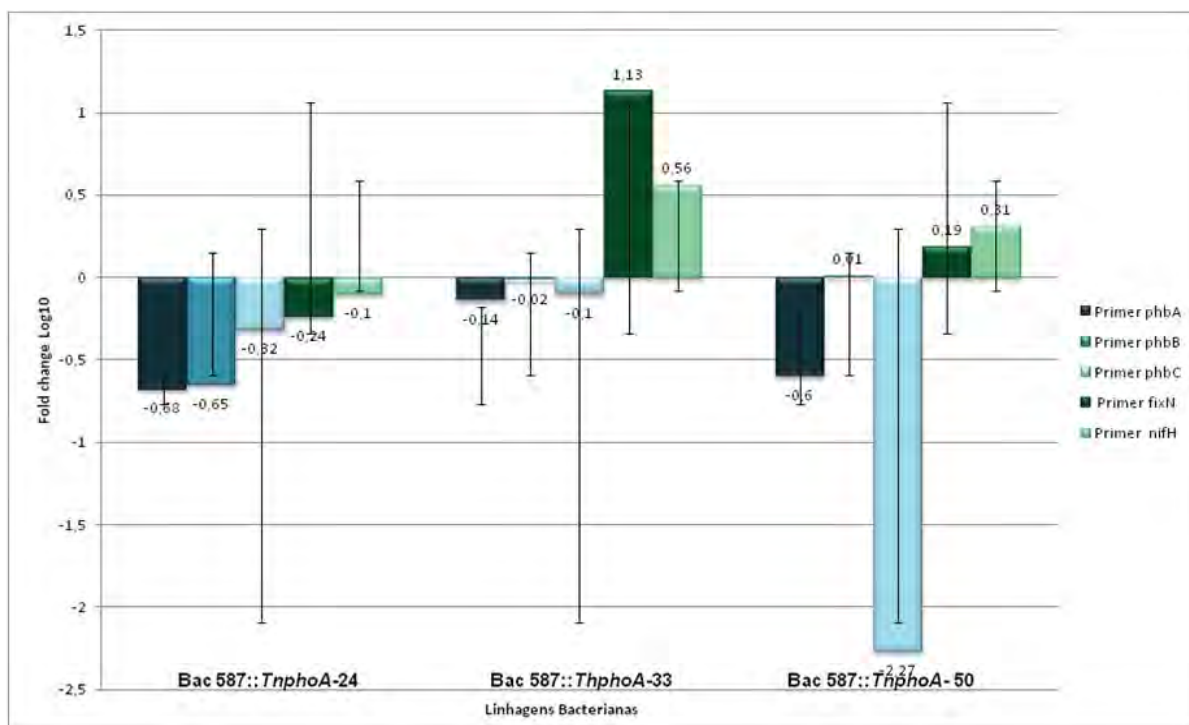
**Figura 13.** Curvas de dissociação geradas para validação da eficiência dos “primers”: A – *phbA*; B- *phbB*; C – *phbC*; D- *glnA*; E – *glnB*; F –  $\delta A$ ; G - *nifH*; H – *fixN*.

#### 4. Quantificação relativa em tempo real.

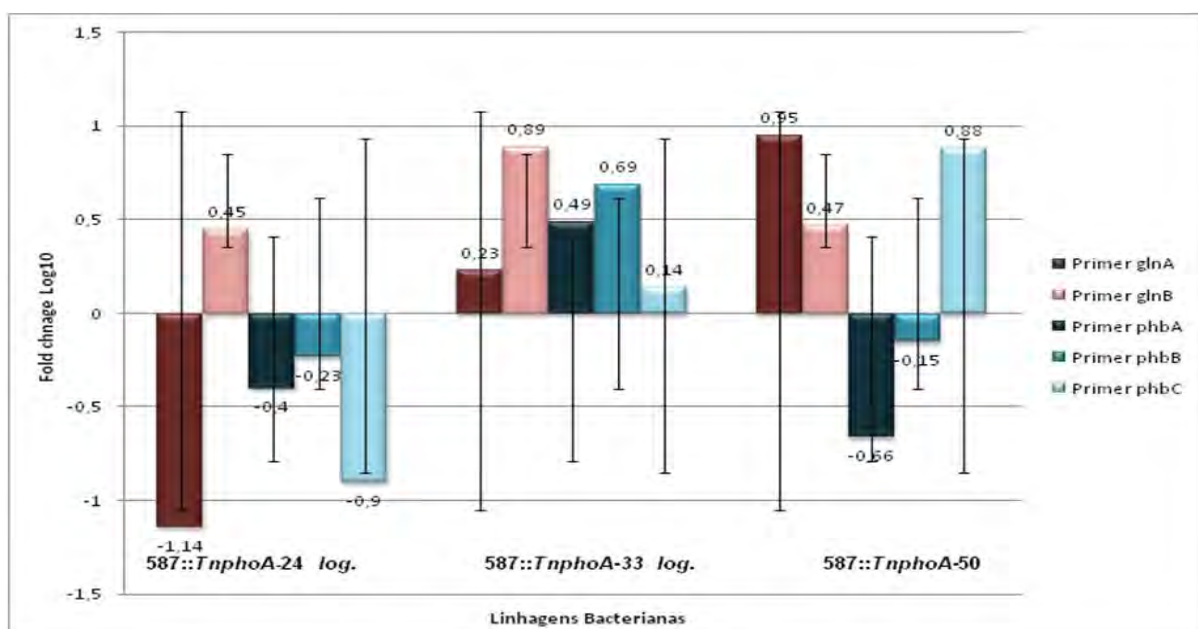
A análise da expressão gênica foi realizada através da técnica de quantificação relativa por PCR em tempo real. Pode-se observar a amplificação do genes sigma A (controle endógeno) e *glnA*, *glnB*, *phbA*, *phbB*, *phbC*, *fixN* e *nifH*, com seus respectivos valores de “*fold change*” e a relação da expressão nas diferentes fases de desenvolvimento (Figura 14 a 17).



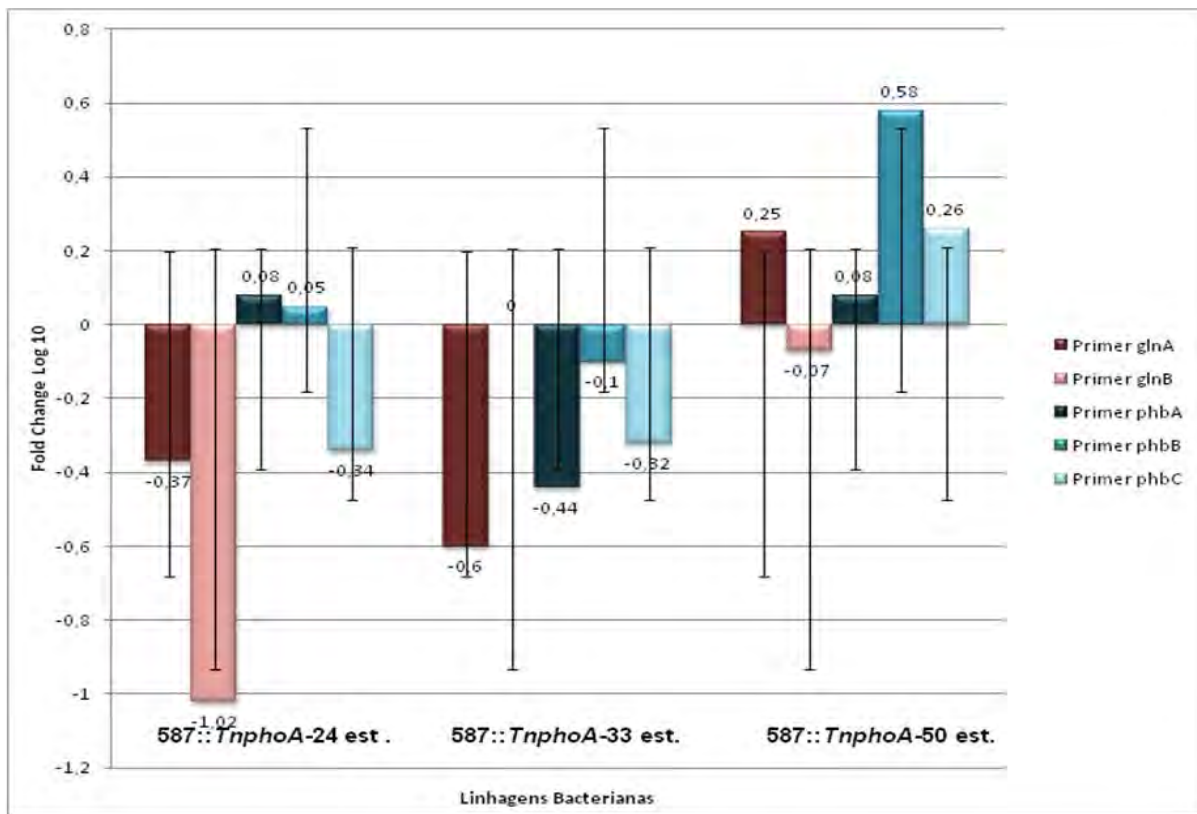
**Figura 14.** Expressão dos genes *glnA*, *glnB*, *fixN* e *nifH*, para as amostras, em simbiose, Bac. 587::TnphoA-24, Bac. 587::TnphoA-33 e Bac. 587::TnphoA-50, utilizando a amostra Bac. *B. elkanii* 587 como calibrador .



**Figura 15.** Expressão dos genes *phbA*, *phbB*, *phbC*, *fixN* e *nifH*, para as amostras, em simbiose, Bac. 587::TnphoA-24, Bac. 587::TnphoA-33 e Bac. 587::TnphoA-50, utilizando a amostra Bac. *B. elkanii* 587 como calibrador.



**Figura 16.** Expressão dos genes *glnA*, *glnB*, *phbA*, *phbB* e *phbC*, para as amostras, fase log, 587::TnphoA-24 log., 587::TnphoA-33 log. e 587::TnphoA-50 log., utilizando a amostra *B. elkanii* 587 log. como calibrador.



**Figura 17.** Expressão dos genes *glnA*, *glnB*, *phbA*, *phbB* e *phbC*, para as amostras, fase estacionária, *587::TnphoA-24 est.*, *587::TnphoA-33 est.* e *587::TnphoA-50 est.*, utilizando a amostra *B. elkanii 587 est.* como calibrador.

Os genes *glnA* e *glnB* envolvidos no metabolismo de aminoácido apresentaram expressão negativa (Figura 15) na condição de simbiose, dados inesperados quanto a essa condição de desenvolvimento pois esta via, metabolismo de aminoácidos, está ativa nesta condição devido à fixação biológica do nitrogênio (FBN) cujo os genes envolvidos apresentam expressão positiva nas mesmas condições.

Quanto as análises da expressão dos genes *phbA*, *phbB* e *phbC*, em simbiose (Figura 15) observa-se dados que condizem com a os resultados obtidos por linhagens mutantes de genes da nitrogenase, a partir da expressão negativa dos genes para síntese e acúmulo de PHB enquanto pode se observar expressão positiva para os genes de fixação biológica do nitrogênio permitindo comparação com os resultados de INT Formazan.

Estudos gerados para as condições de cultivo logarítmica, apresentaram expressão significativa (Figura 16) para os genes de acúmulo de polímero, dados esperados devido às análises feitas por PAGANELLI, (2009), quanto ao acúmulo do mesmo, sendo esta determinante para síntese e acúmulo de polímero da linhagem *587::TnphoA-33* nesta fase de desenvolvimento.

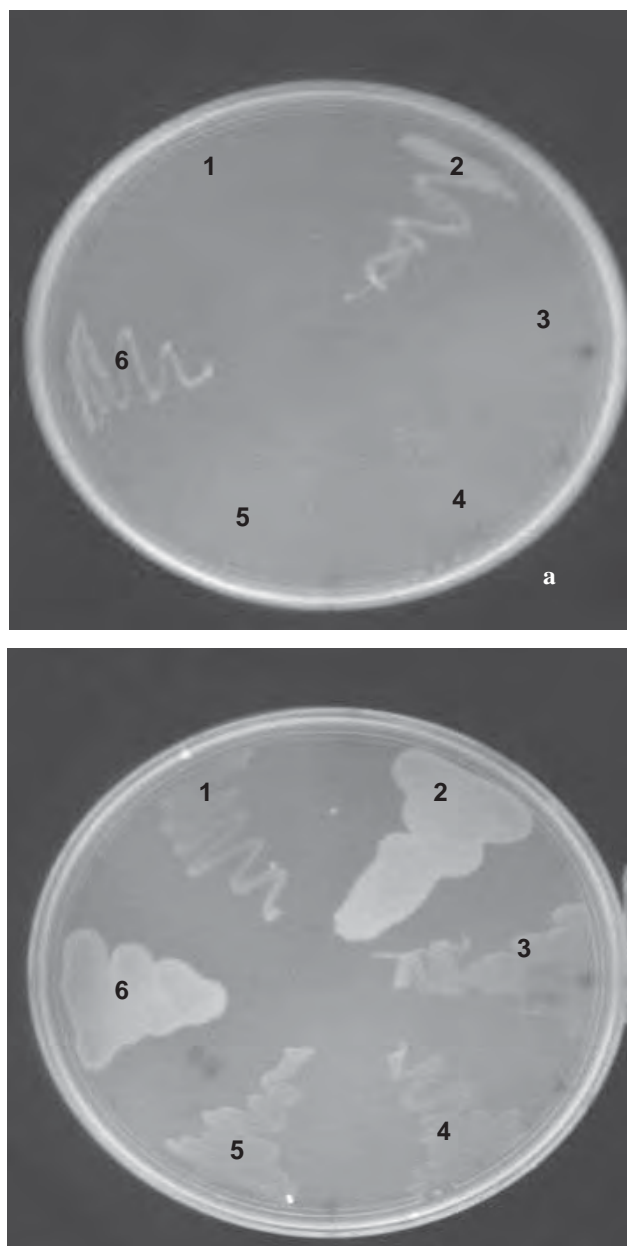
As condições de cultivo em fase estacionária, mostraram-se determinante para o acúmulo e síntese de polímero da linhagem *587::TnphoA-50* (Figura 18). Já para os genes *glnA* e *glnB* a fase logarítmica (Figura 16) foi a condição que de melhor desempenho quanto ao metabolismo de aminoácidos.

No entanto a linhagem *587::TnphoA-24* (Figura 14 a 17) apresentou expressão negativa para todos os genes em todas as condições de crescimento. Considerando que para todas as análises a linhagem *B. elkanii 587*, nas respectivas condições, foi utilizada como calibrador.

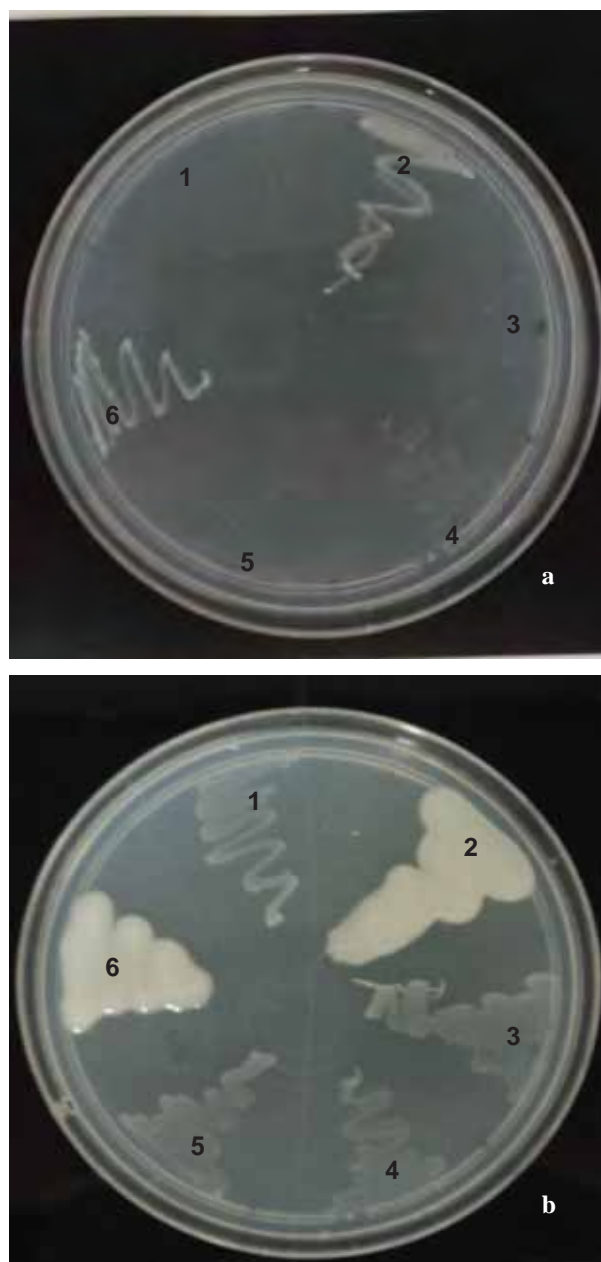
## **5. Triagem das linhagens mutantes para a produção de exopolissacarídeos (EPS) na presença de calcofluor**

O corante fluorescente calcofluor é específico para polissacarídeos que contenham ligações do tipo  $\beta$  1- 4 ou  $\beta$  1- 3, permitindo a observação da produção de exopolissacarídeos (EPS) (*Calcofluor – binding*). A partir desta metodologia, foi possível a comparação da produção de EPS (exopolissacarídeo) das amostras. Nas figuras 18 e 19 é possível observar que a linhagem 4080 $\Omega$ Z03 utilizada como maior quantidade de *Calcofluor – binding* e em relação as linhagens *B. elkanii 587*, *587::TnphoA-24*, *587::TnphoA-33* e *587::TnphoA-50*.

As linhagens de *B. elkanii* mutantes foram as menos representativas em termos de produção de exopolissacarídeos (EPS).



**Figura 18. a)** 1. *B. elkanii* SEMIA 587, 2. 4080ΩZ03; 3. *587::TnphoA-33*; 4. *587::TnphoA-24*; 5. *587::TnphoA-50*; 6. 4080ΩZ03 cultivados em placas de Petri contendo meio RDM modificado sólido adicionado um corante epifluorescente calcofluor bright 28-SIGMA na concentração final de 200µg/ml, visualizados sob luz UV . Estas bactérias foram crescidas por 24 h a temperatura de 30°C. **b)** 1. *B. elkanii* SEMIA 587, 2. 4080ΩZ03; 3. *587::TnphoA-33*; 4. *587::TnphoA-24*; 5. *587::TnphoA-50*; 6. 4080ΩZ03 cultivados em placas de Petri contendo meio RDM modificado sólido adicionado o corante epifluorescente calcofluor bright 28-SIGMA na concentração final de 200 µg/ml, visualizados sob luz UV . Estas bactérias foram crescidas por 72 h a temperatura de 30°C.



**Figura 19.** a) 1. *B. elkanii* SEMIA 587, 2. 4080ΩZ03; 3. *587::TnphoA-33*; 4. *587::TnphoA-24*; 5. *587::TnphoA-33*; 6. 4080ΩZ03 cultivados em placas de Petri contendo meio RDM modificado sólido adicionado um corante epifluorescente calcofluor bright 28-SIGMA na concentração final de 200µg/ml, visualizados sob luz branca. Estas bactérias foram crescidas por 24 h a temperatura de 30°C. b) 1. *B. elkanii* SEMIA 587, 2. 4080ΩZ03; 3. *587::TnphoA-33*; 4. *587::TnphoA-24*; 5. *587::TnphoA-33*; 6. 4080ΩZ03 cultivados em placas de petri contendo meio RDM modificado sólido adicionado um corante epifluorescente calcofluor bright 28-SIGMA na concentração final de 200 µg/ml, visualizados sob luz branca. Estas bactérias foram crescidas por 72 h a temperatura de 30°C

## VI. DISCUSSÃO

Os tempos de desenvolvimento de culturas bacterianas são fortemente influenciados pela composição nutricional do meio, além das condições físicas de incubação. As estirpes do gênero *Bradyrhizobium* são de crescimento lento e produzem metabolitos alcalinos no meio de cultura (URENHA et al.1994; MATOS-CUZCANO et al. 1998; MARCONDES & LEMOS, 2011). As linhagens selvagem e mutantes apresentaram diferenças quanto aos tempos de desenvolvimento pelas taxas de turbidez, no entanto, as linhagens selvagem e 587::*TnphoA-50* apresentaram crescimento semelhante. Já as linhagens mutantes 587::*TnphoA-33* e 587::*TnphoA-24* apresentaram fase exponencial menos acentuada e taxas de crescimento menores, em relação às linhagens selvagem e a mutante 587::*TnphoA-50*. Apesar das diferenças quanto às taxas de crescimento foram determinados os pontos nas fases *lag*. 24 h, *log*.96 h, estacionário 192 h, para análise do comportamento quanto à expressão dos genes em estudos diferentes tempos de desenvolvimento.

O sistema de transporte de elétrons (ETS) é um componente comum em bactérias, permitindo, através do processo respiratório, a produção de energia na forma de ATP. O sistema ETS reduz 2-(p-iodofenil)-3-(p-nitrofenil)-5-fenil tetrazolium (INT) à INT-Formazan, uma vez que INT compete diretamente com o oxigênio molecular como acceptor final de elétrons. Métodos bioquímicos, como a determinação da atividade do sistema de transporte de elétrons (ETS) têm sido empregados para a dosagem do consumo de oxigênio. Baseado neste processo de redução, as bactérias que estão respirando acumulam intracelularmente INT-Formazan, tornando-se um método eficiente para analisar a viabilidade de células em diferentes condições (ZIMMERMANN, 1978; MAURICE et al., 2001). À medida que houve um aumento no tempo de crescimento as taxas respiratórias das linhagens também aumentaram. Isso ocorreu devido ao aumento no número de células e também de atividade metabólica, permitindo a manutenção destas linhagens nestas condições. Além das linhagens apresentarem taxas de crescimento diferentes as amostras apresentaram taxas respiratórias diferentes também em relação a selvagem.

*B. elkanii* 587 apresentou taxas de turbidez maiores em relação aos mutantes, no entanto a análise respiratória por meio da leitura da D.O do filtrado etanólico permitiu observar resultados semelhantes ao visual. Porém, quanto à atividade de cadeia respiratória a linhagem que se destacou foi a 587::*TnphoA*- 33, até mesmo em relação a linhagem selvagem. Por outro lado, a linhagem 587::*TnphoA*-50 que apresentou taxas de desenvolvimento mais elevadas respondeu de maneira reduzida quanto ao acúmulo de INT- formazan. Isto demonstra que o potencial respiratório não é o principal fator estimulante ou limitante das taxas de crescimento das linhagens bacterianas *in-vitro*. O metabolismo dos esqueletos carbonados, que envolve o ciclo do TCA ( ácido tricarbóxico ) , somados à capacidade respiratória, que reside na cadeia transportadora de elétrons, deve estar afetando de forma diferente o balanço de agentes redutores e o potencial redox nas diferentes linhagens.

Testes de nodulação foram realizados para observar os níveis de desenvolvimento e eficiência quanto ao estabelecimento da relação simbiótica, fator que é controlado por uma série de parâmetros, genéticos, metabólicos e protéicos (BOIVIN, 2009). As linhagens mutantes do presente estudo apresentavam seu potencial simbiótico desconhecido. O estudo da capacidade de estabelecer simbiose com leguminosas e formar estruturas radiculares para fixação do nitrogênio atmosférico foi uma forma de se especular o metabolismo que envolve a taxa de carbono e nitrogênio, além de auxiliar o potencial agrônomo destas linhagens. A técnica de diluição denominada número mais provável (NMP) foi idealizada por MACRADY (1915) tendo como objetivo observar a densidade de população microbiana em tubos de fermentação. Esta técnica permite estimar o número de microrganismos, sem necessidade de contagem direta (ALEXANDER, 1982), O número mais provável permite estimar as densidades de população de bactéria em tecidos de plantas onde as bactérias simbióticas têm sido quantificadas (DOBEREINER et.al. 1995). O número mais provável de nódulos é uma técnica utilizada para estimar rizóbios a partir de bioensaios com plantas, baseado na presença ou ausência de nódulos que indica sucesso e insucesso, conseguindo quantificar a população presente no solo.

Independente do potencial de fixação do nitrogênio, todas as linhagens selvagem e mutante foram efetivas quanto à nodulação.

As plantas inoculadas com as linhagens apresentaram presença de nódulos como o descrito acima, no entanto as análises visuais de alguns nódulos, em todas as inoculações, não apresentaram coloração interna avermelhada; considerando que essa coloração é de caráter regulatório e determinante para a resposta quanto à Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN). Nódulos visualmente efetivos se devem a estruturas específicas contendo leghemoglobina, transportador simbiótico de  $O_2$ , que supre as bactérias com baixas concentrações de  $O_2$  para a geração de ATP, necessário ao processo de fixação de  $N_2$  e impede que o mesmo seja inibitório ao complexo nitrogenase.

Essa heme-proteína juntamente com a barreira radicular de permeabilidade seletiva são reguladores importantes na tensão de oxigênio protegendo a nitrogenase. O INT atua como competidor do  $O_2$  na acepção final de elétrons. A capacidade de a leghemoglobina transportar esse oxigênio e da acepção final de elétrons dos ensaios respiratórios por redução do INT –Formazan em linhagens mutantes de bacterióides permitiram observar a atmosfera gasosa de disponibilidade de  $O_2$  para o processo de gerar energia na forma de ATP. A linhagem de *B.elkanii* se sobressaiu nas análises por redução do INT bem como em eficiência de nódulos, no entanto as linhagens mutantes apresentaram resposta reduzida. Conclui-se que, apesar de manterem a capacidade de nodular raízes de soja, as linhagens mutantes perdem o potencial em fixar o  $N_2$  atmosférico. Isto, provavelmente, decorre do desbalanço na taxa de carbono e nitrogênio, quando o ciclo TCA desvia o fluxo de carbono para gerar reservas por meio de acúmulo de PHB e afeta o potencial redutor na forma de elétrons canalizados para o complexo nitrogenase, reduzindo a eficiência da FBN.

As cotas de produção de polímeros seqüestraram esqueletos carbonados para comporem PHB ou EPS. Estas rotas muitas vezes são vias anapleróticas ou de “by pass” a partir do ciclo do TCA.

As linhagens de *B.elkanii* mutantes com produção superior e acúmulo de PHB foram ineficientes em produzir EPS, conforme demonstrado pelo ensaio com calcofluor.

Isto condiz com o baixo potencial simbiótico destas linhagens e pode se explicar a maior síntese de PHB pelo desvio da rota de produção de EPS.

Neste trabalho, foi utilizada a abordagem da qPCR para observar o comportamento das linhagens selvagem e mutante, quanto a influência da mutação na expressão dos genes, *glnA*, *glnB*, *phbA*, *phbB*, *phbC*, *nifH* e *fixN*, nas diferentes fases de desenvolvimento.

A PCR em tempo real tornou-se um método padrão, após sua descoberta, para a quantificação da expressão gênica. Sua alta sensibilidade grande faixa dinâmica e precisão levaram ao desenvolvimento de inúmeras aplicações, com um crescente número de amostras a serem analisadas (PABINGER, 2009). A análise consiste em uma relação entre a comparação de um gene de referencia de expressão constante, comparada a do gene alvo. A partir desta abordagem foi possível conhecer a expressão dos genes envolvidos no processo de FBN e comportamento quanto a expressão, considerando as linhagens mutantes.

A enzima mais importante associada ao mecanismo de fixação de nitrogênio é a nitrogenase (SUR et al, 2010). É uma molécula biologicamente complexa e reduz dinitrogênio gasoso à amônia sob temperatura e pressão adequadas (PETTERS & SZILAGYI, 2006). A nitrogenase convencional é uma mistura equilibrada das proteínas Ferro e Molibdênio-Ferro na proporção de 2:1 (SUR, 2010), este complexo enzimático é codificado pela expressão dos genes *nifHDK*, sendo o gene *nifH* codificar as subunidades gama da Fe- proteína e os genes *nifD* e *nifK* codificam as subunidades alfa e beta da proteína MoFe, respectivamente (KLASSEN, 2000; SUR, 2010). Apesar de as linhagens apresentarem mutação para acúmulo de polihidroxibutirato, a expressão e respostas dos genes da fixação biológica do nitrogênio não foram afetadas, considerando os resultados positivos para todas as linhagens, como o descrito por (KOACH,1981; ALEXANDER, 1982; BROCKWELL,1982; SOMASEGARAM & HABEN, 1985).

As linhagens de bacterióides mutantes apresentaram expressão significativa para o gene da nitrogenase exceto o 587::*TnphoA-24* que apresentou repressão para

todos os genes do presente estudo. No entanto, as linhagens 587::*TnphoA*-33 e 587::*TnphoA*-50 apresentaram expressão positiva e significativa para o gene *nifH* e gene *fixN*, ambos envolvidos no processo de FBN.

Estirpes de rizóbio de vida livre e em bacterióides dentro da planta apresentam metabolismo diferente para cada espécie. *R. meliloti* é uma das espécies que não se acumula durante a simbiose PHB (CEVALLOS et al. 1996). Por outro lado, *R. etli*, *B. japonicum* e *B. elkanii* podem produzir e acumular PHB durante todas as diferentes fases de seu desenvolvimento. (LODWIG & POOLE, 2003).

Bacterióides de *B. elkanii* apresentam a expressão dos genes *phbC* e *glnA*, envolvidos na síntese de polihidroxibutirato (PHB) (MARCONDES et al. 2008). Com relação ao descrito acima podemos observar que as respostas gênicas das linhagens estão diretamente reguladas pela condição ideal de sobrevivência atmosférica de oxigênio e concentração de carbono e acúmulo de PHB tendo influência direta na expressão positiva embora reduzida, para algumas linhagens, dos genes da fixação considerando a atmosfera ideal e não competitiva (ANEJO et al. 2004).

Em mutantes de *B. japonicum*, nos genes *nifD*, *nifK*, e *nifH*, há um aumento expressivo do acúmulo de PHB, o que mostra a competição entre essas duas vias de acúmulo e síntese de PHB apresenta relação inversa a fixação biológica do nitrogênio (FBN) (CEVALLOS et al. 1996). Assim, nossos dados estão de acordo com CEVALLOS (1996) que estudou linhagens mutantes de *B. japonicum*. Nas linhagens em simbiose apresentaram expressão reduzida para os genes de acúmulo de carbono e expressão positiva dos genes envolvidos na fixação biológica do nitrogênio.

As linhagens em simbiose apresentaram expressão reduzida para os genes de acúmulo de carbono e expressão positiva dos genes envolvidos na fixação biológica do nitrogênio.

Os aminoácidos são de grande importância para o processo de fixação biológica do nitrogênio. Os aminoácidos sofrem ciclagem entre a planta e os bacterióides, capacitando a assimilação de amônia e o retorno para a síntese de asparagina (LOWDING et al. 2003). Genes relacionados a biossíntese de aminoácidos, *glnA* e *glnB*, foram detectados em bacterióides de *B. elkanii*, confirmando os dados de

MARCONDES et al., (2008) que chegou a propor um mecanismo de ciclagem de aminoácidos durante o processo de fixação em nódulos de soja.

Apesar da detecção destes genes quando em bacterióides para linhagem selvagem e as amostras 587:: *TnphoA*-24, 587:: *TnphoA*-33 e 587:: *TnphoA*-50, apresentaram uma repressão para os genes *glnA* e *glnB*, com relação a *B. elkanii*, fato que pode ser elucidado pelas linhagens apresentarem uma mutação que, possivelmente, resultou na repressão destes genes para ciclagem de aminoácidos, tendo em vista a adaptação metabólica regulado pelo balanço de carbono e nitrogênio.

Para linhagens cultivadas *in vitro*, PAGANELLI (2011) demonstrou que a fonte de carbono fornecida no meio de cultivo está diretamente relacionada à produção de polihidroxibutirato. Quando sacarose é utilizada como fonte de carbono, o acúmulo de PHB em *R. hualtense*, *Bradyrhizobium sp.* e *R. leguminosarium* é muito maior do que com a utilização de glicerol, o que foi confirmado após a análise da expressão do gene *phbC*.

PAGANELLI, (2009). obteve os mutantes de *B. elkanii* utilizados neste trabalho, através da inserção do transposon *TnphoA* visando aumentar a produção. Esta abordagem pode, portanto, ser útil para a obtenção de diferentes tipos de mutantes, inclusive regulatórios, dependendo do objetivo do trabalho, fazendo-se necessário adequar a metodologia para seleção dos mutantes com as características desejadas (MULLER et al., 1995). As linhagens apresentaram expressão positiva para os genes de síntese e acúmulo de PHB em todas as fases de desenvolvimento. A resposta positiva permitiu a comparação com ensaios bioquímicos realizados por PAGANELLI, (2009), onde as linhagens que responderam melhores em relação à expressão foram às mesmas que acumularam mais polímero nos ensaios, com destaque para o 587:: *TnphoA*-33.

Em diferentes fases do desenvolvimento das linhagens mutantes, foram detectados tanto expressão quanto repressão dos genes *glnA* e *glnB*. No entanto, para essas linhagens a fase logarítmica foi determinante quanto ao metabolismo de aminoácidos, pela expressividade dos resultados obtidos. Assim, os dados obtidos

concordam com a literatura (DIXON & KAHN, 2004) evidenciando este ciclo de reciclagem de aminoácidos em *B. elkanii*, sendo ainda corroborado pela presença dos transportadores ABC encontrado em todas as fases, que podem estar envolvidos no transporte de aminoácidos através da membrana.

## VII. CONCLUSÃO

As análises dos resultados permitiram as seguintes conclusões:

1. A resposta gênica das linhagens de bacterióides está diretamente regulada pela condição ideal de sobrevivência, atmosfera de oxigênio e concentração de carbono e acúmulo de PHB, a qual tem influencia direta na expressão positiva dos genes da fixação considerando a atmosfera ideal não competitiva.
2. Os bacterióides mutantes não perderam a capacidade de estabelecer simbiose por meio da indução da formação de nódulos radiculares em planta de soja, contudo, apresentam efetividade reduzida quanto à capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico.
3. Os mutantes de *B.elkanii*, 24, 33 e 50, não apresentam potencial agrônômico.
4. A fase *log* de desenvolvimento foi determinante para a expressão dos genes *glnA* e *glnB* em todas as linhagens cultivadas *in vitro*.
5. As fases de desenvolvimento das linhagens mostraram diferenças quanto a expressão de genes de síntese e acúmulo de PHB, sendo a fase estacionária determinante para a linhagem 587::*TnphoA*-50 e logarítmica para a linhagem 587::*TnphoA*-33.
6. O 587::*TnphoA*-33 é o que apresentou maior potencial biotecnológico visando o aumento na síntese de PHB.

## VIII. REFERÊNCIAS

ALDOR, I. S.; KEASLING, J. D. Process design for microbial plastic factories: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoates. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, p.475–483, 2003.

BARBOSA, J. C.; MALDONADO JR, W.; AgroEstat - Sistema para Análises Estatísticas de Ensaio Agrônômicos, Versão 1.1.0.626, 2011.

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.

BISHOP, P. E.; GUEVARRA, J. G.; ENGELKE, J. A.; EVANS, H. J. Relation between glutamine synthetase and nitrogenase activities in the symbiotic association between *Rhizobium japonicum* and *Glycine max*. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.57, p.542-546, 1976.

BOIVIN, M. C.; GIRAUD, E.; PERRET, X.; BATUT, J.. Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes?. **Trends in Microbiology**, v.17, p. 459-466, 2009.

BURRIS, R.H.. Advances in biological nitrogen fixation. **Journal of Industrial of Microbiology & Biotechnology**, v. 22, p.381-393, 1999.

CARMINATTI, C.; MESSANE, F. E.; BRANDÃO, M. C. Z; PINHEIRO, V. R.. Produção de polihidroxicanoatos (PHAs). **Universidade Federal de Santa Catarina**, Centro Tecnológico, 2006.

CHOHAN, S. N.; COPELAND, L.. Acetoacetyl coenzyme A reductase and polyhydroxybutyrate synthesis in *Rhizobium (Cicer) sp.* Strain CC 1192. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, p. 2859-2863, 1998.

CONAB (Companhia Nacional do Abastecimento). Disponível em <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em 03 dez. 2011.

COUTINHO, B. C.; MIRANDA, G. B.; SAMPAIO, G. R.; DE SOUZA, L. B. S.; SANTANA, W. J.; COUTINHO, H D. M. A importância e as vantagens do polihidroxibutirato (plástico biodegradável). **Holos**, v. 20, p. 77–81, 2004.

\*CRAWFORD, N.M.; KAHN, M.L.; LEUSTEK, T.; LONG, S.R. **Nitrogen and Sulfur**. In:BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. , **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.; SADOWSKY, M. J.. Transcriptional and physiological responses of *Bradyrhizobium japonicum* to desiccation-induced stress. **Journal of Bacteriology**. v.189, p.6751-6762, 2007.

DE JONGE, H J.; FEHRMANN, R. S.; DE BONT, E. S.; HOFSTRA, R. M.; GERBENS, F.; KAMPS, W. A.; DE VRIES, E. G.; ZEE, A. G.; VAN DER, T.E.; MEERMAN, G. J.; TER ELST, A..Evidence based selection of housekeeping genes. **PLOS ONE**, v. 2, p.898, 2007.

DERKS, N. M.; MULLER, M.; GASZNER B, TILBURG-OUWENS, D. T.; ROUBOS, E. W.; KOZICZ, L. T.. Housekeeping genes revisited: Different expressions depending on gender, brain area and stressor. **Neuroscience**, v.30, p.156-305, 2007.

DIXON, R. and KAHN, D.. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature Review Microbiology**, v. 2, p. 621–631, 2004.

DIXON, R. & KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nat. Rev.**  
KENNE, L.; LINDBERG, B. Bacterial Polysaccharides In: **The Polysaccharides**,  
**Academic Press** Ed. G.O. ASPINALL, v. 2, p. 287-363, Academic Press. 1983.

DOWNIE, J. A.. Plant science – infectious heresy. **Science**, v. 316, p.1296–1297, 2007.

ELLINGBOE, A. H.. Changing concepts in host-pathogen genetics. **Annual Review of Phytopathology**, California, v.19, p.125-143, 1981.

FREITAS, T. P. S.. **Isolamento de um novo *Bacillus cereus* produtor de polihidroxicanoato (PHA) e caracterização da PHA sintase e da PHA despolimerase**. 2007. 80 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Estadual Paulista – Instituto Butantã, São Paulo.

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.

GIBSON, K.E. et al. Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. **Annu. Rev. Genet.** v.42, p.413–441, 2008.

GIRAUD, E; MOULIN, L; VALLENET, D; BARBE, V.; CYTRYN, E.; AVARRE, J.,C.; JAUBERT, M.; SIMON, D.; CARTIEAUX, F.; PRIN, Y.; BENA, G.; HANNIBAL, L.; FARDOUX, J.; KOJADINOVIC, M.;VUILLET, L.; LAJUS, A.; CRUVEILLER, S.; ROUY, Z.; MANGENOT, S.; SEGURENS, B.; DOSSAT, C.; WILLIAM L. FRANCK, L. W.; CHANG, W.; SAUNDERS, E.; BRUCE, D.; RICHARDSON, P.; NORMAND, P.; DREYFUS, B.; PIGNOL, D.; STACEY, P.; EMERICH, D.; VERMÉGLIO, A.; MÉDIGUE,

C.; SADOWSKY, M. Legumes symbioses: absence of Nod genes in photosynthetic bradyrhizobia. **Science**, v.316, p.1307–1312, 2007.

HIGUCHI, R.; DOLLINGER, G.; WALSH, P.S.; GRIFFITH, R.; HUANG, T. Y.; DUAN, K. J.; HUANG, S. Y.; CHEN, C. W. Production of polyhydroxyalkanoates from inexpensive extruded rice bran and starch by *Haloferax mediterranei*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 33, p.701–706, 2006.

KABIR, M.M.; SHIMIZU, K.. Fermentation characteristics and protein expression patterns in a recombinant *Escherichia coli* mutant lacking phosphoglucose isomerase for poly(3-hydroxybutyrate) production. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 62, p. 244–255, 2003.

KENNE, L.; LINDBERG, B. Bacterial Polysaccharides In: **The Polysaccharides**, Academic Press Ed. G.O. ASPINALL, v. 2, p. 287-363, Academic Press. 1983.

KING, C. A.; PURCEL, A.. Inhibition of N<sub>2</sub> fixation in soybean is associated with elevated ureides and amino acids. **Plant Physiology**, v.137, p.1389-1396, 2005.

KUBISTA, M.; ANDRADE, J. M.; BENGTSSON, M.; FOROOTAN, A.; JONAK, 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**, v. 30 p.150-155, 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.. **Canadian Journal of Microbiology**, v.38, p.501-505, 1992.

LEE, J. N.; SHIN, H. D. ; LEE, Y. H. Metabolic engineering of pentose phosphate pathway in *Ralstonia eutropha* for enhanced biosynthesis of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate. **Biotechnology Program**, v. 19, p. 1444–1449, 2003.

LEIMOIGNE, M. Produits de deshydratation et de polymerization de l'acide boxybutyrique. **Bulletin de la Société de Chimie Biologique**, v.8, p. 770-7782, 1926.

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.

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

LODWIG, E. M.; LEONARD, M.; MARROQUI, S.; WHEELER, T. R.; FINDLAY, K, DOWNIE, J. A.; POOLE P.S.. Role of polyhydroxybutyrate and glycogen as carbon storage compounds in pea and bean bacteroids. **Molecular Plante Microbe Interact**, v.18, p.67–74, 2005.

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

MADISON L. L.; HUISMAN, G. W. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. **Microbiology Molecular Biology**, v.63, p.21–53, 1999.

MARCONDES, J.; CANTÃO, M. E.; ALVES, L. M. C.; LEMOS, E. G. M.. Transcriptional profile of *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587 in symbiosis with soybean (*Glycine max* L. Merrill) analyzed by DNA microarray. In: Felix D. Dakota; Samson B. M. Chimphango; Alex J. Valentine; Claudine Elmerich; William E. Newton. (Org.). **Current Plant Science Biotechnology Agro Springer**, v. 42, p.299-300, 2008.

MOREIRA, W. M. Q.. **Metabolismo respiratório de Bradirrizóbios durante processos in vitro e simbiótico analisado por pcr quantitativo em tempo real.** 2009. 70 f. Dissertação (Mestrado Microbiologia Agropecuária) – Faculdades de Ciências Agrárias e Veterinárias. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

MORENO, A.. Usina produz plástico da cana 100% biodegradável. **Jornal Cana**, p. 72-73, 2003.

NCBI (GenBank do National Center for Biotechnology Information). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>>. Acesso em: 8 mar. 2010.

OLDROYD, G. E. D. AND DOWNIE, J. M.. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. **Annu. Rev. Plant Biol.** v.59, p.519–546, 2008.

SILVA, L.F.. Evaluation of soil gram-negative bacteria yielding polyhydroxyalkanoic acids from carbohydrates and propionic acid. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 45, p. 785-791, 1996.

PAGANELLI, F. L. **Avaliação da produção de polihidroxicanoatos em rizóbios.** 2007. 90 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Ciências Biológicas) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo.

PAGANELLI, F. L.. **Clonagem e expressão heteróloga dos genes responsáveis pela síntese de polihidroxibutirato em *Bradyrhizobium elkanii*.** 2009. 90 f. Dissertação ( Mestrado em Genética e Biologia Molecular ) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

PARK, J. S.; LEE, Y. H.. Metabolic characteristics of isocitrate dehydrogenase leaky mutant of *Alcaligenes eutrophus* and its utilization for poly-b-hydroxybutyrate production. **Journal Fermentation Bioengineer**, v. 81, p.197–205, 1996.

PEDROSA, F. O. ; BENELLI, E. M.; YATES, M. G.; WASSEM, R., MONTEIRO, R. A.; KLASSEN, G.; STEFFENS, M. B. R.; SOUZA E. M.; CHUBATSU, L. S.; RIGO, L. U. Recent developments in the structural organization and regulation of nitrogen fixation genes in *Herbaspirillum seropedicae*. **Journal Biotechnol.** v. 91, p.189–195, 2001.

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

POPE, G.; KIM, G.; BRAGG, J.. Fundamental Reservoir Engineering Principles Explain Lenses of Shoreline Residual Oil Twenty Years after the Exxon Valdez Oil Spill. **Society of Petroleum Engineers**, p.22, 2011.

REHM, B.H. A.. Polyester synthases: natural catalysts for plastics. **The Biochemical Journal**, v.276, p. 15-33, 2003.

RENIER, A.; JOURAND, P.; RAPIOR, S.; POINSOT, V.; SY, A.; DREYFUS, B.; MOULIN, L.. Symbiotic properties of *Methylobacterium nodulans* ORS 2060(T): a classic process for an atypical symbiont. **Soil Biology Biochem**, v.40, p.1404–1412, 2008.

RHIZOBASE (The Genome Database for Rhizobia). Disponível em: <<http://www.kazusa.or.jp/rhizobase>>. Acesso em: 8 mar. 2010.

RODRIGUES, A.D. **Estudo da produção de polihidroxitirato por *Cupriavidus necator*. em fermentação no estado sólido.** 2009. Dissertação ( Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

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.

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

SENIOR, P. J.; DAVES, E. A. The regulation of poly-β-hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. **Journal of Biochemistry**, v. 134, p. 225-238, 1973.

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

STENBÜCHEL, A.; EVERSLOH, T. L. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. **Biochemical Engineering Journal**, v. 16, p. 81-96, 2003.

SUDESH, K.; ABE, H; DO, Y.. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates:biological polyesters. **Progress in Polymer Science**, v.25, p. 1.503-1555, 2000.

SUN, J.; DOMMELEN, A. V.; IMPE, J. V.; VANDERLEYDEN, J. Involvement of *glnB*, *glnZ*, and *glnD* Genes in the Regulation of Poly-3-Hydroxybutyrate Biosynthesis by Ammonia in *Azospirillum brasilense* Sp7. **Applied Environmental Microbiology**, v. 68, p. 2985-988, 2002.

SURIYAMONGKOL, P.; WESELAKE, R.; NARINE, S.; MOLONEY, M.; SHAH, S. Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants - A review. **Biotechnology Advances**, v. 25, 148-175, 2007.

TAGUCHI, S.; NAKAMURA, H; KICHISE, T.; TSUGE, T.; YAMATO, I.; DOI Y.. Production of polyhydroxyalkanoate (PHA) from renewable carbon sources in recombinant *Ralstonia eutropha* using mutants of original PHA synthase. **Journal Biochemist Engineer**, v. 16, p. 107–113, 2003.

TAÍZ, L.; ZIEGER, E.. **Fisiologia vegetal**. Trad. SANTARÉM, E.R. et al., 3° ed., Porto Alegre: Artemed, p.719, 2007.

WEI, X. X.; YUSHI, Z.; YUAN, M. Q.; CHEN, G. Q. Effect of anaerobic promoters on the microaerobic production of polyhydroxybutyrate (PHB) in recombinant *Escherichia coli*. **Applied genetics and molecular biotechnology**, v. 82, 703–712, 2009.

ZAHRAN, H. H.. Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. **Microbiology Molecular Biology Review**, v. 63, p.968-989, 1999.