

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

**OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DE MUTANTES *exoZ* E
phbAB ENVOLVIDOS NO METABOLISMO DE
POLÍMEROS DE CARBONO EM *Rhizobium tropici*
SEMIA 4080 COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO.**

Tereza Cristina Luque Castellane
Engenheiro Agrônoma

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Julho de 2011

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

**OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DE MUTANTES *exoZ*⁻ E
phbAB⁻ ENVOLVIDOS NO METABOLISMO DE
POLÍMEROS DE CARBONO EM *Rhizobium tropici*
SEMIA 4080 COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO.**

Tereza Cristina Luque Castellane

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

Co-Orientador: Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Julho de 2011.

Castellane, Tereza Cristina Luque
C348o Obtenção e avaliação de mutantes *exoZ* e *phbAB* envolvidos no metabolismo de polímeros de carbono em *Rhizobium tropici* SEMIA 4080 com potencial biotecnológico / Tereza Cristina Luque Castellane. -- Jaboticabal, 2011
xii, 115 f. : il.; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2011

Orientadora: Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

Banca examinadora: Regiane de Fátima Travensolo Sacomano, Simone Cristina Picchi, Jackson Antônio Marcondes de Souza, Eliamar Aparecida Nascimbem Pedrinho

Bibliografia

1. Exopolissacarídeo. 2. Rizóbio. 3. Biopolímeros. 4. Reologia, pseudoplástico. 5. Mutagênese insercional. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.52:632.52

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

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

TEREZA CRISTINA LUQUE CASTELLANE - nascida na cidade de Ribeirão Preto (SP), em 10 de dezembro de 1981. Graduiu-se em Engenharia Agrônômica pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP/FCAV), Campus de Jaboticabal (SP), no ano de 2005. Durante o período de graduação foi agraciada com Menção Honrosa conferindo um dos melhores trabalhos de iniciação científica apresentados durante evento de iniciação científica internacional realizada pela Universidade de São Paulo (USP). Em 2007, concluiu o curso de Mestrado em Agronomia, Área de concentração em Produção Vegetal, pela UNESP / FCAV. Ingressou no curso de Doutorado em Agronomia, Área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas no mesmo ano, desenvolvendo sua tese junto ao Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas do Departamento de Tecnologia da UNESP / FCAV. Durante o curso de pós-graduação exerceu atividades de pesquisa no estágio de doutorando no exterior do programa da CAPES/DGU (Proc nº 131/07) na Universidad de Barcelona, Espanha.

“O que sabemos é uma gota, o que ignoramos é um oceano.”

Isaac Newton

*“Um nascimento representa o princípio de todo,
é o milagre do presente e a esperança do futuro.”*

Ao meu filho, Pietro, que com a Benção de Deus, logo nascerá.

DEDICO

Ao Ivan Brandimarte, por todos os nossos momentos e pelo mais belo presente que
me deste.

A minha amada mamãe Sônia Regina P. Luque Castellane, pelos incentivos em
todos os momentos e ensinamentos ofertados ao longo da vida, sempre me
orientando a seguir o caminho certo.

A minha pequena e amada família pelas lembranças de um passado iluminado e
cheio de vida no presente.

Sem o apoio da família não somos nada!

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

- À Deus que sempre estavas presentes, na alegria ou na tristeza, fazendo da derrota uma vitória, da fraqueza uma força;
- À minha orientadora Profa Dra Eliana Gertrudes de Macedo Lemos pela confiança, dedicação e por ter me ensinado como se faz pesquisa. E, também, pelos exemplos de profissionalismo e companheirismo;
- Ao Prof Dr Manoel Victor Franco Lemos pela Co-orientação deste trabalho;
- Aos professores do curso da pós e especialmente aos do Departamento de Tecnologia, pelos ensinamentos;
- Aos amigos do laboratório de Bioquímica de microrganismos e de Plantas (LBMP), sempre prestativos e sem medir esforços na ajuda para com os outros, enfim, vocês são muito especiais;
- À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo N° 2007/57586-6) pelo apoio financeiro.
- Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para mais esta conquista.

SUMÁRIO

	Página
Lista de Tabelas	viii
Lista de Figuras	ix
Resumo	xi
Summary	xii
I. INTRODUÇÃO	01
II. REVISÃO DE LITERATURA	05
1. O rizóbio.....	05
2. Exopolissacarídeo.....	07
3. Por que os microrganismos produzem exopolissacarídeos?.....	10
4. Síntese e Caracterização química de EPS produzidos pelo rizóbio.....	13
5. Avaliação da Produção de EPS Bacterianos.....	19
6. Relação do EPS / PHB produzido por rizóbio.....	22
7. O envolvimento dos EPS na Interação Planta-Bactéria	27
8. Algumas características reológicas de polissacarídeos extracelulares.....	30
III. OBJETIVOS	33
IV. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
1. Bactérias e plasmídeos	34
2. Meios de Cultura, condições de cultivo e estocagem das bactérias.....	34
2.1. Antibióticos.....	37
3. Desenho de oligonucleotídeos iniciadores para isolamento dos genes <i>exoZ</i> e <i>phbAB</i>	38
4. Técnicas de extração de DNA.....	39
4.1. Extração de DNA genômico.....	39
4.2. Extração de DNA plasmidial de <i>E. coli</i>	40
5. Técnicas de manipulação do DNA.....	40
5.1. Quantificação em NanoDrop e eletroforese de DNA.....	40
5.2. Amplificação dos genes de interesse.....	41
5.3. Purificação e clonagem dos insertos em vetor.....	42
5.4. Restrição dos clones de produto de PCR para confirmar a clonagem.....	43
5.5. Seqüenciamento e análise de DNA.....	43
6. Transformação bacteriana.....	44
6.1. Transformação de células competentes de <i>E. coli</i>	44
6.1.1. Seleção dos clones	45
6.2. Teste de sensibilidade a canamicina.....	46
6.3. Preparação de células competentes de <i>R. tropici</i> SEMIA 4080.....	46
6.3.1. A eletroporação de <i>R. tropici</i> SEMIA 4080.....	47
7. Mutagênese.....	48
7.1. Construção do plasmídeo <i>pexoZKan</i>	49
7.2. Construção dos plasmídeos <i>pphbABKan</i>	50
8. Triagem dos mutantes de <i>R. tropici</i>	50
8.1. Crescimento em Meio Sólido Contendo Calcofluor e corante Vermelho Congo.....	50
9. PCR e SEQÜENCIAMENTO DOS GENES MUTADOS <i>exoZ</i> e <i>phbAB</i>	51

10. Método para obtenção do exopolissacarídeos rizobiano.....	51
10.1. Inóculo e Condições de Cultivo.....	51
10.2. Quantificação da biomassa celular.....	52
10.3. Isolamento, Purificação e Produção de Exopolissacarídeo.....	52
10.4. Análise do Exopolissacarídeo: Determinação da composição em monossacarídeo do EPS das estirpes por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	53
10.5. Propriedades Reológicas do EPS.....	54
11. Ensaio com plantas: Avaliação da nodulação e Eficiência de fixação de N dos microrganismos.....	55
11.1. Número e massa seca dos nódulos por planta.....	57
11.2. Teor de nitrogênio nas folhas.....	57
11.3. Análise Estatística.....	58
V. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	59
1. Extração de DNA genômico.....	59
2. Desenho de iniciadores para o isolamento dos genes de interesse.....	60
3. Padronização das reações de PCR.....	61
4. Inserção em <i>E. coli</i> e confirmação da ligação dos produtos de PCR ao vetor pGem T-Easy (PROMEGA).....	62
5. Seqüenciamento	64
6. Obtenção da estirpe mutante	64
7. Seleção dos mutantes obtidos através da mutagênese insercional por transposição <i>in vitro</i>	67
8. Comparação entre os fenótipos	68
9. Avaliação da produção de EPS.....	70
10. Análises da composição dos exopolissacarídeos.....	73
11. Comportamento reológico das soluções formadas pelos exopolissacarídeos produzidos pelos microrganismos.....	75
12. Efeito da mutação no gene <i>exoZ</i> e <i>phbAB</i> sobre o processo de formação dos nódulos e a fixação biológica de nitrogênio em <i>Phaseolus vulgaris</i> L. inoculados com a estirpe selvagem e mutantes de <i>R. tropici</i> SEMIA 4080.....	80
VI. CONCLUSÕES.....	85
VII. REFERÊNCIAS.....	85

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Organismos produtores de polissacarídeos bacterianos e suas aplicações.....	09
Tabela 2. Linhagens bacterianas e plasmídeos.....	35
Tabela 3. Composição dos meios de culturas.....	36
Tabela 4. Composição do meio PGYA (Campanharo, 2006) por litro. O pH do meio fo ajustado para 6,8.....	37
Tabela 5. Composição do meio PSYL (Campanharo, 2006) por litro. O pH do meio foi ajustado para 6,8.....	37
Tabela 6. Antibióticos.....	38
Tabela 7. Disposição dos tratamentos dos ensaios de nodulação e eficiência de fixação simbiótica de nitrogênio.....	56
Tabela 8. Pureza (valor da relação 260/280) e concentração do DNA obtidos a partir da técnica de extração conforme Marmur (1961)	60
Tabela 9. Genes de interesse e iniciadores correspondentes.....	61
Tabela 10. Produção de exopolissacarídeos e de biomassa celular no meio de cultura por rizóbios selvagem e mutante, e eficiência relativa de produção de EPS.....	72
Tabela 11. Composição dos exopolissacarídeos em monossacarídeos (¹) produzidos pela estirpe selvagem de <i>Rhizobium tropici</i> e seus mutantes.....	74
Tabela 12. Valores de consistência e do índice de lei das potências medidos para cada uma das amostras.....	80
Tabela 13. Número de nódulos (NN), massa seca dos nódulos (MSN), Teor de nitrogênio na biomassa seca da parte aérea (N) e índice de efetividade simbiótica (EFRA) de feijão cultivar IAC-Carioca inoculado com estirpe selvagem e mutadas de rizóbio, na ausência de inoculação (testemunha) e com aplicação de N mineral, cultivada em vasos plásticos contendo substrato estéril	81

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Organização física das ORFs de pNGR234 (STREIT et al., 2004)...	18
Figura 2. Esquema das Rotas Metabólicas para a Produção de PHB. (adaptado de REHM, 2006).....	23
Figura 3. Organização dos genes da biossíntese de PHA em <i>S. meliloti</i> (TOMBOLINI et al. 1995).....	25
Figura 4. Classificação dos Fluidos segundo seu comportamento reológico. (Fonte: http://www.setor1.com.br/analises/reologia/cla_ssi.htm).....	30
Figura 5. Esquema ilustrativo apresentando características do vetor comercial pGem T-Easy (Promega).....	42
Figura 6. Transposon EZ-Tn5 < KAN-2> utilizado para mutagênese. O transposon EZ-Tn5 <KAN-2> forma um complexo estável com a enzima transposase EZ-Tn5, e gene de resistência a canamicina que são funcionais em <i>E. coli</i> , flanqueados por sequências de reconhecimento (ME) da EZ-Tn-5 Transposase (EPICENTRE Biotechnologies, Madison, Wisconsin, USA).....	48
Figura 7. Perfil eletroforético de DNA genômico em gel de agarose 0,8% (p/v), contendo brometo de etídio (0,5 mg/μL). (A) Canaletas: 1. Padrão de tamanho molecular (1 Kb DNA Ladder – FERMENTAS); 2. DNA genômico total <i>R. tropici</i> ; 3-4. DNA genômico total do mutante 4080ΩZ03; 4-5. DNA genômico total do mutante 4080ΩPhb7. (B) Perfil eletroforético do marcador de tamanho molecular 1kb DNA “ladder” (Fermentas), com as respectivas massas contidas em cada banda.....	59
Figura 8. Perfis eletroforéticos dos produtos de PCRs para o gene <i>exoZ</i> (A) ; <i>phbAB</i> (B) em gel de agarose 1% (p/v), contendo brometo de etídio (0,5 mg/μL). A) Canaletas: 1. Padrão de tamanho molecular (1 Kb DNA Ladder – FERMENTAS); 2. Controle negativo <i>exoZ</i> ; 3. Controle positivo (DNA genômico <i>R. tropici</i>) <i>exoZ</i> . B) Canaletas: 1. Padrão de tamanho molecular (1 Kb DNA Ladder – FERMENTAS); 2. Controle negativo <i>phbAB</i> ; 3. Controle positivo (DNA genômico <i>R. tropici</i>) <i>phbAB</i>	62
Figura 9. Perfis eletroforéticos dos plasmídeos digeridos referentes à construção em pGem-T easy em gel de agarose 1% (p/v), contendo brometo de etídio (0,5 mg/μL). A) Canaletas: 1. Padrão de tamanho molecular (1 Kb DNA Ladder – FERMENTAS); 2-6. Construção pGem-T EXOZ digerida com enzima de restrição EcoRI. B) Canaletas: 1. Padrão de tamanho molecular (1 Kb DNA Ladder – FERMENTAS); 2-6: Construção <i>pphbAB</i> digerida com enzima de restrição NotI.....	63
Figura 10. Perfis eletroforéticos dos plasmídeos selecionados pGem-T EXOZ e <i>pexoZKan</i> em gel de agarose 1% (p/v), contendo brometo de etídio (0,5 mg/μL). Canaletas: 1. Padrão de tamanho molecular (1 Kb DNA Ladder – FERMENTAS); 2. controle positivo (DNA genômico <i>R. tropici</i>) de amplificação do produto de PCR	

	correspondente ao gene <i>exoZ</i> ; 3 e 5. DNA plasmidial referente ao plasmídeo pGem-T EXOZ; 4 e 6. padrão esperado de restrição com enzima <i>EcoRI</i> dos clones positivos, contendo região do genoma de <i>R. tropici</i> com o gene <i>exoZ</i> ; 7. DNA plasmidial referente ao plasmídeo pexoZKan; 8. padrão esperado de restrição com enzima <i>EcoRI</i> do plasmídeo pexoZKan com inserção do elemento <i>EZ::Tn5</i> dentro do gene <i>exoZ</i>	65
Figura 11.	Perfis eletroforéticos dos plasmídeos selecionados <i>pphbAB</i> e <i>pphbABKan</i> em gel de agarose 1% (p/v), contendo brometo de etídio (0,5 mg/μL). Canaletas: 1. Padrão de tamanho molecular (1 Kb DNA Ladder – FERMENTAS); 2. controle positivo (DNA genômico <i>R. tropici</i>) de amplificação do produto de PCR correspondente ao <i>phbAB</i> ; 3. DNA plasmidial referente ao plasmídeo <i>pphbAB</i> ; 4. padrão esperado de restrição com enzima <i>NotI</i> para os clones positivos, contendo região do genoma de <i>R. tropici</i> com o <i>phbAB</i> ; 5. DNA plasmidial referente ao plasmídeo <i>pphbABKan</i> ; 6. padrão esperado do padrão de restrição com enzima <i>NotI</i> do plasmídeo <i>pphbABKan</i> com inserção do elemento <i>EZ::Tn5</i> dentro dos genes <i>phbAB</i>	66
Figura 12.	Perfil eletroforético dos produtos de PCRs para o gene <i>exoZ</i> e <i>phbAB</i> após a recombinação homóloga, em gel de agarose 1% (p/v), contendo brometo de etídio (0,5 mg/μL). linha 1: Padrão de tamanho molecular (1 Kb DNA Ladder – FERMENTAS); linha 2: <i>exoZ</i> com transposon (2009 pb = 788 + 1221); linha 3: <i>phbAB</i> com transposon (3521 pb = 2300 + 1221).....	67
Figura 13.	Estirpe selvagem de <i>R. tropici</i> SEMIA4080 e mutantes 4080ΩZ03 e 4080ΩPhb7 cultivados em placas de Petri contendo meio PSAY sólido suplementado com corante Vermelho Congo visualizados sob luz branca. Estas bactérias foram cultivadas por 24 h a 30 °C...	69
Figura 14.	Estirpe selvagem de <i>R. tropici</i> SEMIA4080 e mutantes 4080ΩZ03 e 4080ΩPhb7 cultivados em placas de Petri contendo meio PSAY sólido adicionado um corante epifluorescente (calcofluor bright 28 – SIGMA) na concentração final de 200 μg/ml, visualizados sob luz branca (A) e luz UV (B). Estas bactérias foram cultivadas por 24 h a 30 °C.....	69
Figura 15.	Representação da recuperação do EPS com adição de etanol anidro (1:3; v/v) ao sobrenadante das amostras.....	71
Figura 16.	EPS seco e moído.....	71
Figura 17.	Viscosidade em função da taxa de cisalhamento para as amostras analisadas, a 25 °C.....	77

OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DE MUTANTES *exoZ* E *phbAB* ENVOLVIDOS NO METABOLISMO DE POLÍMEROS DE CARBONO EM *Rhizobium tropici* SEMIA 4080 COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO.

Resumo - *Rhizobium tropici* e outras bactérias pertencentes à ordem Rhizobiales são produtores de polissacarídeos extracelulares (EPS), que possuem a função de molécula receptora do micro simbiote, fazendo uma interação célula/célula e desencadeando o processo de nodulação. A diversidade de estruturas e composição química apresentadas pelas moléculas de EPS é refletida pela diversidade de enzimas responsáveis pela sua síntese. Neste trabalho, buscou-se a inativação através da mutagênese insercional por transposição *in vitro* dos genes *exoZ* da estirpe selvagem *Rhizobium tropici* SEMIA 4080 envolvidas na síntese das subunidades repetitivas do EPS e no *tanden phbAB*, responsáveis pela síntese do PHB, com o intuito de obter microrganismos com aspecto altamente mucoso, produtor superior de EPS em relação a estirpe selvagem. Os mutantes obtidos apresentaram colônias mucosas quando cultivados nos meios de culturas PSYA, demonstrando que estirpes de rizóbio mutantes nos genes *exoZ* e *phbAB* são capazes de formar biofilme “*in vitro*” e, ao avaliar a eficiência relativa na produção de EPS, o mutante 4080ΩZ03 apresentou o melhor resultado. Para as três amostras de EPS foi possível observar um comportamento de fluxo de líquidos pseudoplástico e, também, a influência da concentração de EPS sobre a viscosidade aparente das soluções aquosas. A estirpe selvagem e todos os mutantes induziram a formação de nódulos em feijoeiro (fenótipo Fix⁺), sugerindo que os genes *exoZ* e *phbAB* não estão envolvidos nos processos de infecção e formação nodular mas, sendo necessários para a fixação biológica de nitrogênio.

Palavras-chaves – Exopolissacarídeo, rizóbio, Biopolímeros, Reologia, pseudoplástico, Mutagênese insercional.

OBTAINING AND EVALUATION OF MUTANTS *exoZ* AND *phbAB* INVOLVED IN CARBON POLYMER METABOLISM IN *Rhizobium tropici* SEMIA 4080 WITH BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL.

Summary - *Rhizobium tropici* and other bacteria belonging to the order Rhizobiales are extracellular polysaccharides (EPS) producers, which possess the function of the receptor molecule to function as micro-symbiont, making an interaction cell / cell and triggering the nodulation process. The diversity of structures and chemical composition of EPS presented by molecules is reflected by the diversity of enzymes responsible for its synthesis. In this study, we sought to inactivation by insertional mutagenesis by “in vitro” transposition of genes from wild type *exoZ* *Rhizobium tropici* SEMIA 4080 involved in the synthesis of the EPS repeating subunits and *phbAB* tandem, responsible for synthesis of PHB, in order to obtain microorganisms with high mucosal aspect producer of EPS compared to wild type. The mutants showed mucous colonies when grown in culture media PsyA, demonstrating that mutant strains in genes *exoZ* and *phbAB* from rhizobia are able to form biofilm “in vitro”, and to evaluate the relative efficiency in the production of EPS, the mutant 4080ΩZ03 showed the best result. For the three samples of EPS was possible to observe a flow behavior of pseudoplastic fluids, and also the influence of EPS concentration on the apparent viscosity of aqueous solutions. The wild type and mutants induced the formation of nodules in common bean (Fix^+ phenotype), suggesting that genes *exoZ* and *phbAB* are not involved in the processes of infection and nodule formation, but are necessary for nitrogen fixation.

Keywords – Exopolysaccharide, rhizobia, Biopolymers, Rheology, Pseudoplastic, Insertional Mutagenesis.

I. INTRODUÇÃO

Recentemente, os polissacarídeos microbianos, têm recebido considerável atenção devido ao seu potencial de uso em uma ampla variedade de áreas industriais, podendo ser aplicados como emulsificantes, estabilizantes, geleificantes, lubrificantes ou biofilmes (SUTHERLAND, 1998; SHAH et al., 2008; GORRET et al., 2003). Dentre eles, destacam-se os exopolissacarídeos (EPS).

Os EPSs são metabólitos secundários produzidos durante a fase estacionária do crescimento microbiano, podendo ser homopolímeros ou heteropolímeros que geralmente são característicos de grupos de microrganismos (SUTHERLAND, 1998).

Alguns tipos de exopolissacarídeos já são aceitos e produzidos por biotecnologia, enquanto outros ainda estão em fase de estudo. O uso de cada polímero varia bastante, mas existe um grande interesse nesses compostos como potenciais substitutos das gomas derivadas de plantas (SUTHERLAND, 1998), principalmente pela produção dos EPS microbianos ocorrer independente de variações climáticas, por serem recuperados e purificados mais facilmente e também pela possibilidade de utilização de processos fermentativos que levem à obtenção de altas concentrações do produto puro (SELBMANN et al., 2002). Além disso, podem ser produzidos durante o ano todo e não necessitam de ambientes geográficos específicos, como ocorre com as plantas (KHAN et al., 2007).

A composição química de um número considerável de EPS rizobianos já foi determinada (REINHOLD et al. 1994; BECKER & PÜHLER 1998; CASTELLANE 2004; CASTELLANE, 2007; CASTELLANE & LEMOS, 2007). Entretanto, a heterogeneidade da composição de EPSs produzidos por rizóbios ficou demonstrada em estudos com 26 estirpes padrões de rizóbio pertencentes a diferentes espécies (CASTELLANE 2004). Como o EPS varia muito em sua composição, conseqüentemente, varia em suas propriedades físicas, químicas e estruturais (SUTHERLAND, 2001).

A diversidade de estruturas apresentadas pelas moléculas de EPSs é refletida pela variedade de enzimas responsáveis pela sua síntese (SKORUPSKA et al., 2006).

O surgimento das técnicas de biologia molecular, e o avanço no seqüenciamento de genomas permitiram uma nova abordagem na elucidação de funções gênicas. A técnica de mutagênese por inserção de transposon se tornou em uma metodologia capaz de levar à interrupção gênica em larga escala, possibilitando a geração de bibliotecas de mutantes, que, posteriormente, poderiam ser analisadas por meio de mapeamento e localização dos genes mutados. A mutação de um gene e a subsequente análise da alteração do seu fenótipo original é uma prática comum em rizóbios, com base na recombinação homóloga, um mecanismo que ocorre naturalmente *in vivo* (MOREIRA et al., 2000; SHORUPSKA et al., 2006).

Dentre as espécies de rizóbio conhecidas, a espécie que apresenta EPS mais bem estudados tanto estruturalmente como ecologicamente é *Sinorhizobium meliloti* (SKORUPSKA et al., 2006). Os extensivos estudos genéticos com este microrganismo resultaram na identificação de diversos reguladores da síntese dos dois tipos de biopolímeros (EPS I e EPS II) por ele produzido, conhecendo-se bem a biossíntese dos nucleotídeos de açúcar e montagem das unidades repetitivas (BECKER et al., 1993; BECKER & PÜHLER, 1998; MOREIRA et al., 2000). Contudo, os passos finais da sua biossíntese ainda estão mal caracterizados. Produtos homólogos de genes envolvidos na regulação da síntese de EPS de outras espécies já seqüenciadas, também têm sido identificados (GRAY et al., 1990; ZHAN & LEIGH, 1990; MIMMACK et al., 1994; MAZUR et al., 2005; SHORUPSKA et al., 2006; RHIZOBASE, 2007).

O controle da produção destas moléculas por estirpes de rizóbio envolve a expressão de uma série de genes específicos e a integração com vias bioquímicas importantes como, o ciclo do ácido tricarboxílico. Dessa forma a produção de EPS por rizóbios representa um gasto metabólico muito grande. Essas bactérias utilizam estes polímeros como sinalizadores moleculares na associação com leguminosas e também como moléculas que atuam na proteção dessas células em condições desfavoráveis.

É interessante salientar, ainda, que a síntese de EPS é inversamente proporcional à síntese de outro importante polímero, o poli-3-hidroxitirato [P(3HB) ou PHB]. O PHB possui propriedades muito semelhantes aos polipropilenos (CEVALLOS et al., 1996). No trabalho realizado por TAVENIER et al. (1997), envolvendo estudo em

relação à produção de EPS e PHB em duas estirpes de *R. meliloti* cultivadas com diferentes fontes de C e N, observaram que a síntese desses produtos é inversamente proporcional, sendo que a natureza da fonte de C e N, e a estirpe em estudo interferiram na produção desses dois polímeros, sendo o pH do meio um fator altamente importante para a produção desses elementos, favorecendo a produção de um deles. Através de mutações no gene *phbC* de *R. etli*, verificaram que esse organismo não produz mais PHB (CEVALLOS et al., 1996).

A produção de biopolímeros de interesse industrial, nas mesmas condições em que são cultivados os rizóbios na indústria de inoculantes no Brasil, pode representar uma atividade alternativa para este setor, uma vez que a produção de inoculantes no Brasil é muito dependente do plantio da soja, vendendo inoculantes entre o período de agosto a setembro, na época da semeadura desta cultura em todo o país.

Com todas as informações citadas acima, podemos constatar que os biopolissacarídeos microbianos possuem uma grande e crescente importância no mercado. Desde a sua larga aplicabilidade na indústria de alimentos até setores como indústria petrolífera, farmacêutica, têxtil, tintas, etc. Por isso, é tão importante o incentivo a estudos nesta área, para que se descubra tanto novos biopolissacarídeos como técnicas ótimas para sua produção. Desde as primeiras etapas até a recuperação do produto devem-se estudar cada passo. Assim como a sua produção, a determinação das propriedades físico-químicas dos produtos também é um fator importante. Determinando-se suas propriedades podemos saber quais as suas possibilidades de uso e então, utilizar o produto obtido da forma mais adequada possível.

Considerando que geneticamente a bactéria de *R. tropici* foi, até o momento, pouco explorada, encontra-se grandes dificuldades para promover o estudo de função gênica neste microrganismo, uma vez que boas ferramentas para a sua manipulação ainda não estão bem desenvolvidas. O objetivo principal deste trabalho foi obter mutantes desta bactéria para a produção de EPS e PHB. Primeiramente, foram construídos mutantes nos genes *exoZ* da estirpe selvagem *Rhizobium tropici* SEMIA 4080 envolvido na síntese das subunidades repetitivas. Como a produção de EPS é inversamente proporcional à síntese de PHB, também serão obtidos mutantes nos

genes *phbAB* desta bactéria, uma vez que esse gene é responsável pela primeira e segunda reação da via metabólica pela qual o PHB é sintetizado. Para obtenção de mutantes nesta bactéria foram utilizados kits comerciais contendo o transposon Tn5, que contém um marcador para resistência a canamicina, e subseqüentemente foi realizada análise da alteração do seu fenótipo original. Posteriormente, análises comparativas da estirpe selvagem e mutadas quanto à produção, composição, características físico-químicas e propriedades reológicas dos EPSs obtidos com vista a novas potenciais aplicações biotecnológicas foram realizadas. Acreditamos que esses dados fornecerão resultados consistentes que permitirão futuras aplicações tecnológicas e industriais destas moléculas. Além disso, todas essas descobertas recentes, que estabelecem uma troca de sinais entre plantas e bactérias, abrem um novo campo para o conhecimento das interações planta-solo-microrganismos.

II. REVISÃO DE LITERATURA

1. O rizóbio.

De acordo com KUYKENDALL (2005), dentro da ordem Rhizobiales encontram-se as bactérias denominadas rizóbios. Essas bactérias se caracterizam por serem estritamente aeróbias, com formato de bastonetes, não formadores de esporos e Gram-negativas. A primeira espécie de *Rhizobium*, *R. leguminosarum*, foi identificada em 1889. A palavra *Rhizobium* deriva do Grego "rhíza" que significa raiz e "bio" que significa vida.

Atualmente, a ordem Rhizobiales é classificada em onze famílias: Aurantimonadaceae, Bartonellaceae, Beijerinckiaceae, Bradyrhizobiaceae, Brucellaceae, Cohaesibacteraceae, Hyphomicrobiaceae, Methylobacteriaceae, Methylocystaceae, Phyllobacteriaceae, Rhizobiaceae, Rhodobiaceae e Xanthobacteraceae. O rizóbio pertence a diversas diferentes famílias denominadas de Bradyrhizobiaceae (GARRITY et al., 2005), Hyphomicrobiaceae, Phyllobacteriaceae, e Rhizobiaceae (KUYKENDALL et al., 2005). Nesta última, encontram-se os seguintes gêneros: *Agrobacterium*, *Carbophilus*, *Chelatobacter*, *Kaistia*, *Rhizobium*, *Ensifer/Sinorhizobium* (sinônimos) e *Candidatus*.

O rizóbio do feijoeiro é uma alfa-Proteobactéria gram-negativa (-), bastonetiforme, aeróbica obrigatória sem endosporos e, naturalmente, encontrada nos solos dos diversos domínios morfoclimáticos brasileiros, sendo, nessa condição, denominada rizóbio nativo. Na condição de vida livre, não consegue fixar nitrogênio e, quando a fixação pode ser detectada, geralmente está associada à condição microaerófila específica e os produtos dessa fixação não são disponíveis para as plantas. Quando a bactéria está presente na rizosfera de plantas leguminosas, observa-se a interação com o sistema radicular dessas plantas, promovendo a geração de

estruturas radiculares altamente diferenciadas, denominadas nódulos radiculares (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Até 1991, reconhecia-se oficialmente a existência de apenas uma espécie de rizóbio com capacidade de nodular o feijoeiro, denominada inicialmente de *Rhizobium phaseoli*. A sistemática e a taxonomia do gênero *Rhizobium* realizadas até então eram baseada somente na planta hospedeira de onde o rizóbio era isolado. Depois, constatou-se que os rizóbios isolados do feijoeiro, do trevo e da ervilha apresentavam características genéticas e fisiológicas semelhantes, o que determinou a inclusão desses rizóbios em uma única espécie, denominada *Rhizobium leguminosarum*. Esta espécie é constituída de três biovars (*phaseoli*, *viciae* e *trifolii*) para os isolados provenientes de feijão, ervilha e trevo, respectivamente (RAPOSEIRAS et al., 1998, MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Em *Phaseolus vulgaris* (feijão), a nodulação ocorre com pelo menos 12 espécies de rizóbio (*R. leguminosarum* bvs *phaseoli*, *trifolii* e *viceae*, *R. tropici*, *R. etlii*, *R. giardinii*, *R. mongolense*, *R. yanglingense*, *Sinorhizobium fredii*, *S. americanum*, *A. doebereineriae*, *Mesorhizobium loti* e *M. huakuii*) (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). A escolha da espécie de rizóbio, porém, é um fator importante para a fixação simbiótica de nitrogênio, pois existe grande variabilidade entre espécies e raças de *Rhizobium* com respeito à resposta a variações de temperatura (RAPOSEIRAS et al., 1998).

Os trabalhos com *R. tropici* dentro dos programas de seleção de estirpes conduzidos no Brasil são baseados no fato de que essa espécie apresenta maior tolerância à acidez e a temperaturas elevadas, assim como maior estabilidade genética em comparação com outras espécies que nodulam o feijoeiro (MARTÍNEZ-ROMERO et al., 1991; HUNGRIA et al. 1993, 2000, 2003; MICHIELS et al., 1994). Atualmente, três estirpes são autorizadas para a fabricação de inoculante comercial no Brasil, a Ciat 899 (=Semia 4077), isolada pelo Ciat, na Colômbia; a PRF 81 (=Semia 4080), isolada no Paraná pelo Iapar e pela Embrapa Soja, e que permitiu ganhos de até 906 kg.ha⁻¹ em relação ao controle não-inoculado (HUNGRIA et al, 2000); e a CPAC H-12 (=Semia 4088), isolada no Distrito Federal (MOSTASSO et al., 2002; HUNGRIA et al., 2003).

2. Exopolissacarídeo.

Entre os polissacarídeos bacterianos, dois são os principais tipos encontrados para unir à superfície exterior da membrana bacteriana: os exopolissacarídeos (EPSs) liberados no meio e as β -glucanas cíclicas. As β -glucanas cíclicas geralmente são referidas como uma categoria separada. Enquanto que, os extracelulares livres são os de maior interesse, devido sua facilidade de obtenção (FRAYSSE et al., 2003).

Os EPSs são macromoléculas de polissacarídeos, sendo constituintes normais de todas as células microbianas, incluindo as bactérias, leveduras e fungos. Estes biopolímeros são uma goma hidrossolúvel que possuem propriedades físicas, estruturais e químicas diferentes (SUTHERLAND, 2001). De maneira geral, os termos gomas hidrossolúveis, hidrocolóide ou colóide hidrofílico têm sido usados como sinônimos. Também é observado o termo muco, embora este seja mais empregado para materiais que formam com a água massas viscosas, como é o caso das pectinas (CUNHA et al., 2004).

Segundo ZOHURIAAM & SHOKROLAHI (2004), o termo goma mais especificamente denota um grupo de polissacarídeos de uso industrial ou seus derivados que hidratados em água quente ou fria, em baixas concentrações, formam dispersões ou soluções viscosas. Os polissacarídeos extracelulares são metabólitos produzidos quando uma fonte de carboidratos está presente em excesso (PACE & RIGHELATO, 1980).

Diversas aplicações são descritas na literatura para os exopolissacarídeos. A capacidade de aumentar a viscosidade de soluções aquosas mesmo em baixas concentrações possibilita a sua utilização como agentes espessantes sendo aplicado principalmente na indústria alimentícia (RINAUDI, 2008). Uma aplicação dos EPS no ramo da indústria farmacêutica diz respeito à sua utilização (por exemplo, a goma xantana e gelana) como veículos para diversas drogas, pois este permite a liberação mais lenta e controlada do princípio ativo nestes medicamentos (BILLA et al., 2000; RINAUDI, 2008).

Os microrganismos produzem vários insumos alimentares. Estes podem ser cultivados em vários tipos de meio de cultura de baixo custo para a obtenção do metabólito desejado. Muitos microrganismos já foram isolados da natureza e utilizados industrialmente mais a maioria deles, potencialmente importantes, podem não ter sido ainda explorados e estima-se que apenas 5% dos fungos e 2% das bactérias tenham sido devidamente identificados. Mesmo que muitas linhagens tenham sido melhoradas geneticamente em laboratório, há sempre a possibilidade de que a natureza abrigue uma linhagem com maior potencial, seja na forma selvagem, seja por melhoramento genético.

Um grande número de bactérias conhecidas produz quantidades abundantes de EPSs, particularmente às patogênicas de plantas como *Xanthomonas*, *Erwinia* e bactérias fixadoras de nitrogênio *Rhizobium*, *Beijerinckia* e *Azotobacter*. (VERMANI et al., 1995). Destas, os exopolissacarídeos de *Xanthomonas campestris* (xantana), *Sphingomonas paucimobilis* e *Pseudomonas elodea* (gelana) e *Acetobacter xylinum* (celulose) estão sendo comercializados (SUTHERLAND, 2001; RINAUDI, 2008). Dos polímeros de origem bacteriana, a goma xantana tem sido a mais estudada, uma vez que seu uso em alimentos foi permitido pela FDA (“Food and Drug Administration”), desde julho de 1969 (FDA, 1969). Alguns desses exopolissacarídeos microbianos, com suas respectivas aplicações, são mostrados na Tabela 1.

Entre os biopolímeros mais estudados estão os alginatos bacterianos produzidos por *Pseudomonas sp.*, dextrana de *Leuconostoc mesenteroides*, xantana por *Xanthomonas campestris*, pequenas quantidades de celulose de *Acetobacter xylinum*, ácido hialurônico de *Streptococcus equii*, succinoglucana de *Rhizobium* e gelana de *Sphingomonas paucimobilis* e *Pseudomonas elodea* (DIAZ et al., 2004).

Algumas bactérias ácidas lácticas como *Lactococcus lactis* produzem polissacarídeos extracelulares que são economicamente interessantes porque pode conferir efeitos funcionais nos alimentos e benefícios a saúde. A maioria dos estudos de produção de exopolissacarídeos por bactérias ácidas lácticas focaliza a influência das condições de desenvolvimento fisiológico na biossíntese de exopolissacarídeos, na

Tabela 1. Organismos produtores de polissacarídeos bacterianos e suas aplicações.

Organismo	Polissacarídeo	Aplicações
<i>Xanthomonas</i>	Xantana	Agente estabilizante e espessante em alimentos, tintas, pesticidas, detergentes, cosméticos e fármacos.
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Gelana	Agente gelificante em alimentos, principalmente em produtos à base de frutas.
<i>Alcaligenes faecalis</i> var. <i>Myxogenes</i>	Curdlana	Modificação de textura, agente gelificante, aumento da viscosidade e na produção de alimentos com reduzido valor calóricos.
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Dextrana	Indústria de alimentos como estabilizante e agente de viscosidade. Medicina humana e veterinária como hipocolesterolêmico.
<i>Zymomonas mobilis</i>	Levana	Indústrias de alimentos por suas propriedades estabilizantes e espessantes e indústria farmacêutica como imunomodulador, anticarcinogênico e hipocolesterolêmico.
<i>Rhizobium meliloti</i> e <i>Agrobacterium radiobacter</i>	Succinoglucana	Nas indústrias de alimentos e farmacêutica como agente gelificante e matriz imobilizadora de drogas, respectivamente.
<i>Acetobacter</i>	Celulose	Fibras naturais não-digeríveis e na medicina humana como pele artificial temporária.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Azobacter vinelandii</i>	Alginatos	Matriz imobilizadora para células viáveis e enzimas. Matriz encapsulante para fertilizantes, pesticidas e nutrientes em plantas.
<i>Streptococcus equii</i> e <i>Streptococcus Zooepidermicus</i>	Ácido hialurônico	Indústrias de cosméticos como loções e cremes hidratantes.

Adaptado de KUMAR, A.S.; MODY, K.; JHA, B., 2007.

genética da biossíntese e na elucidação da composição da estrutura primária destes exopolissacarídeos.

Bactérias do gênero *Sphingomonas* produzem biopolímeros como gelana, welana, ramsana e diutana que têm características geleificantes, alta viscosidade e melhor estabilidade térmica do que outras gomas, despertando interesse das indústrias de alimentos, farmacêutica e petroquímica.

Muitas bactérias Gram-negativas podem produzir mais de um exopolissacarídeo: *Xanthomonas campestris* produz somente um único exopolissacarídeo, a xantana (DIAZ et al., 2004). *Rhizobium* e outras espécies de bactérias podem sintetizar dois ou

mesmo três polímeros extracelulares, juntamente com oligossacarídeos intracelulares, contudo a síntese dessas moléculas pode não ser expressa simultaneamente.

Dentre espécies de bactérias fixadoras de nitrogênio, as espécies pertencentes às famílias Rhizobiaceae e Phyllobacteriaceae sintetizam grandes quantidades de polissacarídeos extracelulares (BECKER & PÜHLER, 1998; CASTELLANE, 2004; CASTELLANE, 2007; CASTELLANE & LEMOS, 2007) e gastam mais de 70% de sua energia nesta produção. Mesmo tendo alto gasto energético nesta produção é muito raro uma espécie de bactéria utilizar seu EPS como uma fonte de carbono ou de energia (GONZÁLEZ et al., 1996). Como a maioria das pesquisas com esses microrganismos restringe-se a estudos de genética e a interação simbiótica, não há um produto comercial dos polímeros de origem rizobiana, apenas há relatos de produção de exopolissacarídeos com o nome de succinoglicana (também denominado como EPSI) e galactoglicana (denominado como EPSII) produzidos pela espécie *Sinorhizobium meliloti* (SUTHERLAND, 2001).

3. Por que os microrganismos produzem exopolissacarídeos?

Entre os microrganismos, a habilidade para a produção de polissacarídeos é encontrada em diferentes espécies, tanto procariotos (bactérias e cianobactérias), quanto eucariotos, tais como fungos e leveduras (SUTHERLAND, 2001).

Na natureza, algumas espécies microbianas são capazes de secretar polissacarídeos para o meio ambiente, que podem, por exemplo, auxiliar na aderência de um microrganismo patogênico durante a infecção em uma planta ou animal (SUTHERLAND, 1998).

Exopolissacarídeos microbianos podem ser a base para a formação de biofilmes onde diferentes comunidades microbianas, tanto procarióticas quanto eucarióticas se alojam para se fixar sob superfícies sólidas (SUTHERLAND, 1998; MATA et al., 2008). As bactérias vivem predominantemente associadas dessa maneira, o que pode ser

visto como uma estratégia ecológica contra o estresse químico e físico gerado pelas mudanças ambientais causadas pelo homem.

Biofilmes bacterianos marinhos também podem servir para a sustentação de outros organismos, como pequenos invertebrados marinhos (ORTEGA-MORALES et al., 2007).

Para que a associação ecológica micorrízica entre uma planta e um fungo possa ocorrer, é preciso uma interação específica entre o micobionte (fungo) e as células hospedeiras. Observações citológicas têm mostrado a presença de material fibrilar contendo polissacarídeos e glicoproteínas ligando o fungo às células. O estudo de produção de polissacarídeos solúveis em água de micélio micorrízico foi realizado com 22 espécies, sendo que seis mostraram-se capazes de produzir polissacarídeos extracelulares (OSAKU et al., 2002).

EPS de microrganismos nativos de regiões geladas podem servir como uma estratégia evolutiva para manutenção desses organismos no ambiente, pois parecem conferir proteção contra baixas temperaturas (SELBMAN et al., 2002). De acordo com NEVOT e colaboradores (2006), bactérias do gênero *Pseudoalteromonas*, encontradas na Antártida, mostraram capacidade de produção de grandes quantidades de EPS no ambiente.

Em ambientes salinos, é possível encontrar microrganismos que produzem grandes quantidade de EPS, como bactérias do gênero *Halomonas* (MATA et al., 2006) e cianobactérias isoladas de atol marinho na região da Polinésia Francesa (RICHERT et al., 2005), que provavelmente devem tornar possível o desenvolvimento dos microrganismos nessas condições. Nos dois casos os pesquisadores observaram também a presença de proteínas ligadas aos EPS.

A formação do biofilme para as bactérias formadoras de nódulos é um importante passo para a infecção das hospedeiras, uma vez que é a primeira manifestação das respostas de “quorum sensing” após a produção das AHL (N-acyl- homoserinas), e é importante para o desempenho de seu papel ecológico (RUMJANEK et al., 2004). Esta importância do biofilme para a infecção e formação de nódulos já era conhecida e teve a sua integração com o processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) mais bem

entendido após a recente demonstração de que estirpes de rizóbio mutantes nos genes *nod* são incapazes de formar biofilme “*in vitro*” e “*in vivo*” (FUJISHIGE et al., 2008).

Os exopolissacarídeos de origem rizobiana têm diversas funções na natureza. A produção de EPS é importante para o rizóbio, uma vez que esta substância desempenha diferentes papéis durante os eventos de pré-infecção na rizosfera, podendo: (a) funcionar como molécula receptora do micro simbiote, fazendo uma interação célula / célula e desencadeando o processo de nodulação (KIRICHENKO et al., 2004); (b) induzir a formação de nódulos e micro colônias (BECKER & PÜHLER, 1998); (c) aumentar a adesão da bactéria, promovendo seu crescimento nos espaços intercelulares necessários tanto para a nodulação bem como organogénia da raiz (KOSENKO et al., 2001); (d) agir como sinais moleculares durante o desenvolvimento do nódulo (KOSENKO et al., 2001). Porém, suas funções exatas ainda não estão claras. Entretanto, é sabido que devido à presença de monossacarídeos ácidos na composição da maioria dos EPS rizobianos, mesmo em baixa concentração, o biopolímero torna mais acidificado e o seu acúmulo faz com que o heteropolissacarídeo fique altamente aniônico e, assim, podem atuar como resinas de troca iônica, concentrando minerais e nutrientes ao redor da célula (WHITFIELD, 1988).

Os exemplos acima demonstram a importância desse tipo de molécula para o desenvolvimento microbiano nos ambientes. Pode-se dizer que na natureza, a biossíntese de exopolissacarídeos está diretamente relacionada à capacidade de sobrevivência do microrganismo.

A produção de EPS pelos microrganismos é extremamente interessante do ponto de vista biotecnológico, pois essas moléculas costumam ser produzidas em condições extremas, para manter a presença do microrganismo em um determinado ambiente. Sendo assim, elas podem possuir características químicas e físicas que permitem suas aplicações em diferentes processos industriais.

4. Síntese e Caracterização química de EPS produzidos pelo rizóbio.

Na literatura há poucas informações sobre o processo da biossíntese dos diferentes tipos de exopolissacarídeos. Um bom entendimento do processo bioquímico é importante, uma vez que diferentes parâmetros de produção levam à obtenção de produtos com características heterogêneas. Desse modo, informações relacionadas à regulação da síntese de EPS podem ser usadas para controle e otimização da produção e também para ter conhecimento das características físico-químicas dos mesmos (SUTHERLAND, 2001).

Os primeiros estudos a respeito da composição química dos EPS rizobianos foram realizados na década de 1970, identificando a capacidade de *Rhizobium meliloti* (atualmente *Sinorhizobium meliloti*) em produzir elevadas quantidades de succinoglucanas, cujos monômeros foram identificados como glicose, galactose, ácido pirúvico e radical O-acil (BJORNDAL et al., 1971).

Atualmente, a composição química de um número considerável de EPS rizobianos já foi determinada (REINHOLD et al. 1994; BECKER & PÜHLER 1998; CASTELLANE 2004; CASTELLANE, 2007, CASTELLANE & LEMOS, 2007). A composição dos biopolímeros é limitada a um número pequeno de monossacarídeos e outros componentes não carboidratos, principalmente, os grupamentos acetila e piruvato que são responsáveis pela viscosidade das soluções aquosas destes polímeros.

Embora alguns EPS tenham sido descritos, nem todos foram ainda corretamente caracterizados. Conseqüentemente, a diversidade química e propriedades funcionais são pouco entendidas. Como essas moléculas ocorrem na natureza como misturas heterogêneas dos componentes celulares ou como secreções, faz-se necessário primeiro isolar, purificar e caracterizar estruturalmente estes polissacarídeos (CORRADI DA SILVA et al., 2006), para posterior aplicação nas diferentes áreas.

As características físico-químicas dos polissacarídeos dependem da sequência em que os açúcares estão dispostos na molécula, da presença de resíduos iônicos e da forma como as cadeias se entrelaçam (KUMAR et al., 2007).

A estrutura de muitos polissacarídeos de bactérias Gram-negativas é relativamente simples, compreendendo homopolissacarídeos geralmente compostos de D-glicose, ou heteropolissacarídeos, normalmente compostos de unidades repetitivas compostas de dois a quatro tipos de monossacarídeos e ácido glicurônico, radicais de acetato, piruvato, hidroxibutirato e succinato (SUTHERLAND, 2001). O EPS varia muito em sua composição e, conseqüentemente, em suas propriedades físicas, químicas e estruturais (SUTHERLAND, 2001).

GUENTAS e colaboradores (2001) avaliaram a estrutura molecular do exopolissacarídeo produzido por uma estirpe denominada de *Rhizobium* sp. B., que isolada de nódulos de alfafa. Glicose e ramnose (1:2) foram os principais constituintes, com traços de ácido 2- deoxi-D-arabino hexurônico, caracterizando-se como um EPS diferente daqueles produzidos por outras estirpes de *Rhizobium*. A estrutura química da unidade repetitiva do EPS produzido pelo *Rhizobium* sp. B é semelhante à cadeia principal dos polissacarídeos pertencentes à família das gomas gelanas, conhecidas como bons agentes espessantes.

Diversos estudos demonstraram que nas bactérias Gram-negativas os EPS são sintetizados intracelularmente, utilizando açúcares difosfato nucleotídeos, que fornecem as formas ativadas de monossacarídeos, fornecendo à célula bacteriana um meio de interconversão dos vários monossacarídeos através de reações de epimerização, desidrogenação e descarboxilação (SUTHERLAND, 2001). Este processo é muito complexo, regulado tanto por níveis pós-traducional como transcricional, e dependente da atividade de um complexo de proteína, ambos localizados nas membranas interna e externa, abrangendo o espaço periplasmático entre elas (MOREIRA et al., 2000; SHORUPSKA et al., 2006).

No exterior da célula microbiana os exopolissacarídeos podem permanecer soltos, como muco viscoso, ou podem estar ligados covalentemente a um fosfodiéster ou a um lipídio na superfície da célula. Neste último caso, o material pode formar uma

cápsula, que pode ser reconhecida microscopicamente e que pode estar aderida firmemente à superfície (SILVA et al., 2001; WHITFIELD; ROBERTS, 1999).

Os genes envolvidos no processo de biossíntese do EPS em rizóbio foram mais bem estudados na espécie *Sinorhizobium meliloti*, que produz dois tipos de EPS, denominados EPS I e o EPS II. O EPS I ou succinoglicana é um octo-sacarídeo contendo repetições de uma galactose e sete unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas, com modificações succinil, acetil e piruvil (JOFRÉ & BECKER, 2009; RINAUDI & GONZÁLEZ, 2009; SORROCHE et al., 2010). Já o EPS II ou galactoglicana é um dissacarídeo contendo repetições de uma glicose acetilada e uma galactose com grupo piruvil.

Os extensivos estudos genéticos na bactéria *S. meliloti* resultaram na identificação de diversos reguladores da síntese do EPS I e EPS II por ela produzida, conhecendo-se bem a biossíntese dos nucleotídeos de açúcar e montagem das unidades repetitivas (BECKER et al., 1993; BECKER & PÜHLER, 1998; MOREIRA et al., 2000). Contudo, os passos finais da sua biossíntese ainda estão mal caracterizados. Sabe-se que a síntese de EPS I em *S. meliloti* envolve três grupos de proteínas: (1) as enzimas envolvidas na biossíntese de cada nucleotídeo do açúcar precursor; (2) as transferases que separam cada monossacarídeo na subunidade do nucleotídeo, correspondente ao lipídeo carregador localizado na membrana celular (proteínas ExaA, ExoL, ExoM, ExoO, ExoU, ExoW, ExoY e ExoF); (3) as enzimas envolvidas na alteração do EPS, adicionando compostos não carboidratados na sua estrutura (proteínas ExoH, ExoV e ExoZ); (4) as proteínas encarregadas pela polimerização das unidades repetidas e exportação da cadeia do EPS para a superfície celular no ambiente extracelular (proteínas ExoP, ExoQ e ExoT) (BECKER et al., 1993; BECKER & PÜHLER, 1998).

Enquanto que, a biossíntese da galactoglicana (EPS II) em *S. meliloti* envolve complexos protéicos formados por proteínas Exp, sendo controlada pela limitação de fosfato (BECKER & PÜHLER, 1998; HOANG et al., 2004). Em estudos realizados recentemente, MOREIRA et al. (2000) demonstraram que um dos genes *exp* em particular, que codifica a proteína ExpE1, é essencial para a produção do EPS II.

Todos os genes envolvidos na regulação da síntese de EPS formam grandes operons, sendo localizados no cromossomo ou aglomerados em um megaplasmídeo, de acordo com a espécie de rizóbio. Como, por exemplo, a finalização do seqüenciamento de *S. meliloti* destacou a presença de três replicons no genoma dessa bactéria, a saber: um cromossomo de 3,7Mb (com três cópias de rDNA) e dois megaplasmídeos conhecidos como pSymA (1,4Mb) e pSymB (1,7Mb). CAPELA e colaboradores (1999) indicam que os genes *exoR*, *exoS*, *expR*, e *exoD* estão mapeados no cromossomo, e os genes *exoX*, *exsB* e *expG* no segundo megaplasmídeo, pSymB (BECKER & PÜHLER, 1998).

Já no megaplasmídeo pSymA, encontram-se os genes relacionados com a produção de EPS II ou galactoglicana que são sintetizados quando há limitação de fosfato. Estes exopolissacarídeos são essenciais para formação de biofilmes que são matrizes poliméricas e acabam servindo como barreira física contra antibióticos e compostos de defesa do hospedeiro, além de estresses ambientais, radiação UV, alterações no pH, choques osmóticos e dessecação (RINAUDI et.al. 2009).

Recentemente STAEHELIN e colaboradores (2006), investigaram a participação dos genes *exo* de *Rhizobium* sp. NGR234 envolvidas na síntese das subunidades repetitivas (*exoL*, *exoY* e *exoZ*), polimerização (*exoF*, *exoP* e *exoQ*) e produção (*exoK*) de um EPS com massa molecular baixa, denominado *exo*-oligossacarídeo. Os mutantes obtidos foram cultivados em meio sólido suplementado com o corante vermelho congo e contendo alto teor de sacarose. Sob estas condições, os mutantes NGR Ω *exoF*, NGR Ω *exoL*, NGR Ω *exoP*, NGR Ω *exoQ*, e NGR Ω *exoY* ficaram com coloração avermelhada e formaram colônias secas, ou seja, não produziram goma, enquanto que as colônias de NGR Ω *exoK* e NGR Ω *exoZ* foram mucosas, sugerindo que eles produziram EPS. Neste trabalho os autores também verificaram que tanto a estirpe selvagem NGR234 como o mutante NGR Ω *exoK* carregando o plasmídeo *pexoK* de *S. meliloti* 1021 apresentaram o fenótipo Fix⁺. Em contraste, o mutante NGR Ω *exoK* desprovido do plasmídeo *pexoK* apresentou fenótipo Fix⁻, não sendo capaz de nodular o hospedeiro.

Em *S. meliloti*, o gene *exoY* é responsável pela enzima galactosiltransferase que inicia a união dos succinoglicanos para formar o exopolissacarídeo, quando obtido um mutante para este gene e comparado com a estirpe selvagem, ambos produzem a mesma quantidade de biofilmes, mostrando que o succinoglicano não influencia este processo. Por outro lado, a diminuição da formação de biofilmes ocorreu quando testado em um mutante para o gene *expA* que bloqueia a produção de EPS II. Estes experimentos sugerem que o EPS II é essencial para formação de biofilmes ao passo que o succinoglicano não (RINAUDI & GONZÁLEZ, 2009).

Estudos feitos relacionando a produção de EPS com o seqüestro de Cd(II), devido a sua importância no meio ambiente e a sua toxicidade para os microrganismos, mostraram que a estirpe selvagem de *Sinorhizobium meliloti*, produziu muito mais exopolissacarídeo e menos exoproteínas quando comparadas aos mutantes para o gene *exoY* (que é deficiente para a produção do exopolissacarídeo (SLAVEYKOVA et al., 2010).

Outros trabalhos envolvendo a mesma espécie citada acima, também foram desenvolvidas com o gene *exoH* para analisar quais seriam suas relações com a produção do succinoglicano já que a composição deste é: exopolissacarídeos de alto e de baixo peso molecular. Os *exoV* e *exoH*, que estão relacionados com os últimos passos da síntese de EPS, foram os que mais responderam a mudança de pH, talvez por ser os primeiros genes de um operon extenso já que os centrais, *exoA* e *exoM*, não mostraram expressão significativa (HELLWEG et al. , 2009). De acordo com JOFRÉ & BECKER (2009), os genes *exoQ*, *exoT* e *exoP* estão envolvidos na polimerização e transporte do EPS I para fora da célula, mais especificamente o *exoP*, que expressa uma proteína tirosina quinase. Esta expressão é influenciada por fatores ambientais como osmolaridade.

De acordo com WANG e colaboradores (2010), o gene *chvI* é componente de regulação de sistemas bacteriano. Em *S. meliloti*, este gene está relacionado com o controle de EPS especificamente com a biossíntese de succinoglicano (EPS I) como também do flagelo. Mutantes para este gene não conseguiram crescer em meios complexos, apresentaram tolerância em condições de acidez, produzindo menos poli-3-

hidroxibutirato e um perfil de lipopolissacarídeo alterado, sendo defeituoso na simbiose, quando comparado com a estirpe mutante.

Produtos homólogos de genes envolvidos na regulação da síntese de EPS de outras espécies de rizóbio, também têm sido identificados. Na bactéria *Rhizobium* sp. (estirpe NGR234), um grande número de genes envolvidos na síntese de EPS tem sido identificado no operon *exo* (GRAY et al., 1990; ZHAN & LEIGH, 1990), que tem sido seqüenciado (STREIT et al., 2004). A Figura 1 ilustra a organização física das ORFs de pNGR234.

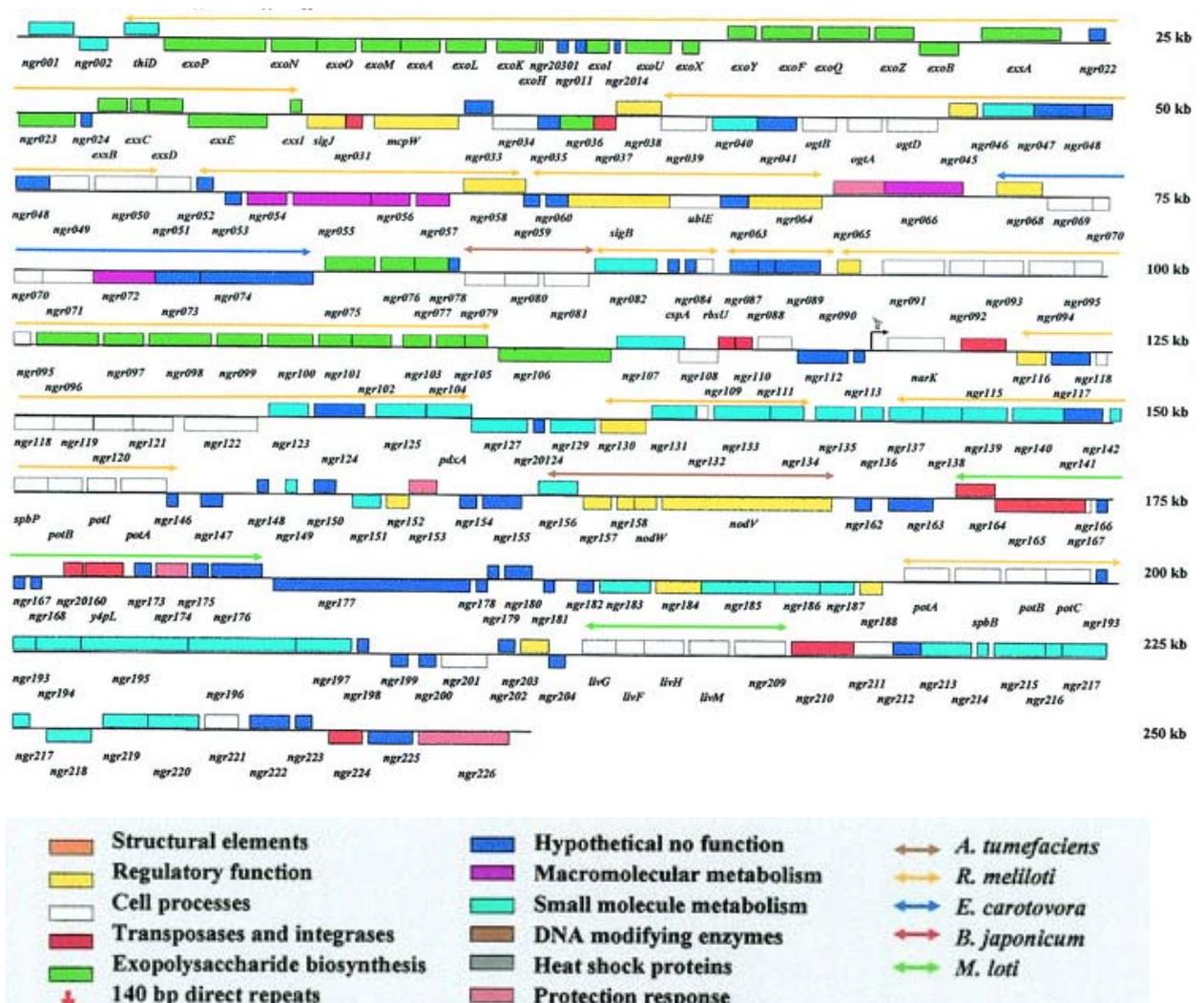


Figura 1. Organização física das ORFs de pNGR234 (STREIT et al., 2004).

Já em biovares de *R. leguminosarum* são conhecidos as funções dos genes *exoB* e *exoR*, que estão localizados no cromossomo (KROL et al., 2007), e algumas proteínas Pss, como, por exemplo, em *R. leguminosarum* bv. *trifolii* foram relatados os genes *pssL*, *pssT*, *pssP*, e *pssN*, requeridos para a secreção e exportação do EPS (MIMMACK et al., 1994; MAZUR et al., 2005).

Em *R. leguminosarum* bv. *trifolii* o gene *rosR* regula a transcrição da síntese do EPS e esta relacionado com a aderência do hospedeiro na raiz e na adaptação bacteriana em condições de estresse. Mutantes para este gene diminuíram em três vezes sua produção de EPS comparando com a selvagem, se tornaram mais sensíveis, reduziu a fração de baixo peso molecular e o número de nódulos. A localização cromossômica deste gene é semelhante à localização do *rosR* em *R. etli* e do *mucR* de *S. meliloti*. Em *R. etli*, foi revelado que o *rosR* influencia na expressão de cerca de cinquenta outros genes, dentre eles, os que são responsáveis pela síntese de polimerização e transporte do EPS (JANCZAREK et al., 2010). Em *S. meliloti*, a proteína traduzida pelo gene *muR* é responsável pela regulação da produção de EPS (RINAUDI et al., 2010), além de reprimir a expressão de uma quantidade de genes durante a simbiose induzindo também a formação de nódulos radiculares (MUELLER & GONZALÉZ, 2011).

Contudo, cada etapa da síntese de exopolissacarídeo requer uma série de enzimas e substratos específicos e, ausência de uma enzima ou substrato, em particular, pode inibir a síntese do polímero. A identificação de genes e a elucidação de mecanismos envolvendo os processos de síntese de EPS por rizóbios têm grande interesse biotecnológico e agrônômico.

5. Avaliação da Produção de EPS Bacterianos.

Diversos estudos têm sido conduzidos no intuito de avaliar a quantidade de EPS produzido por diversos grupos de bactérias, bem como as condições de cultivo que

influenciam neste processo. Inicialmente, ao cultivar estirpes de rizóbio em meios de cultura era desejado que a quantidade de muco produzido por estas bactérias fosse reduzida principalmente em meio líquido para facilitar o manuseio destas culturas bacterianas com relação à produção de inoculantes uma vez que a viscosidade do meio atrapalhava a centrifugação e a filtragem das culturas celulares, chegando a ser desenvolvidos meios de culturas específicos para suprimir a produção de EPS (TULLY, 1985).

Desde então é compreendida a influência da formulação do meio de cultura na produção de EPS pelas estirpes rizobianas. Diversas estirpes de rizóbio são capazes de produzir grandes quantidades de EPS em meios de cultura, variando de acordo com a formulação do meio, principalmente com a fonte de carbono, (TAVERNIER et al., 1997; CASTELLANE & LEMOS, 2007) e de sais (DUTA et al., 2006). Ao cultivar uma estirpe de *Rhizobium* sp. em diferentes meios de cultura, Duta et al. (2006) constataram que a concentração de carbonato de cálcio foi determinante para a produção de EPS, quando as bactérias foram cultivadas em determinadas condições de agitação e aeração. TAVERNIER et al. (1997) verificaram a influência da fonte de carbono na produção de EPS por duas estirpes de rizóbio, observando que a frutose era a fonte de carbono que possibilitou a produção de EPS mais abundantemente por uma estirpe e glicose para a outra.

CASTELLANE (2007), estudando a produção de EPS a partir de duas estirpes de *R. tropici* cultivadas com diferentes fontes de carbono em meio líquido definido para rizóbio, verificou que a alteração da fonte de carbono pode interferir tanto na produção bem como na proporção dos monossacarídeos presentes na composição dos EPS produzidos. Neste trabalho foi observado que quase 90% do pouco produto produzido pela estirpe SEMIA 4077 formou durante a fase de crescimento estacionária, sendo que a outra estirpe SEMIA 4080 teve produção abundante do polímero durante todo o tempo de cultivo, mostrando que a produção de EPS está relacionada ao crescimento (CASTELLANE, 2007).

Existem evidências de que o crescimento e a produção de EPS sejam dois processos competitivos, uma vez que os precursores para a síntese de EPS são os

mesmos usados para funções celulares primárias, entretanto, o que ocasiona o desvio de carbono do metabolismo central para a síntese de EPS ainda não está completamente compreendido (RAMOS et al., 2001).

Uma estratégia para aumentar a reprodução de células e a produção de EPS por rizóbios em meios de cultura pode ser a inclusão de uma pequena concentração de flavonóides no meio. A incubação de células rizobianas em meios de cultura líquidos, suplementados com flavonóides sintéticos ou suspensões de sementes de leguminosas tem resultado em maior crescimento bacteriano em meio de cultura e maior eficiência na formação de nódulos em plantas hospedeiras.

MERCANTE & FRANCO (2000) demonstraram que a produção de meios de cultura utilizando água com exsudados de sementes de feijão comum e de mimosa resultaram em maior crescimento dos rizóbios inoculados e em expressão dos genes nod de rizóbios “*in vitro*”. A suplementação de meios de cultura com pó de sementes de *Amaranthus* sp. resultou em maior concentração de células rizobianas durante todas as fases de crescimento do meio de cultura. Além disso, os autores verificaram que a nodulação de soja também foi maior quando as sementes foram inoculadas com rizóbios cultivados em meios de cultivo com a suplementação citada (LORDA et al., 2007).

Além de resultar em maior proliferação bacteriana em meio de cultura, a suplementação desses meios com flavonóides pode resultar em maior produção de EPS em *S. fredii* (LIN et al., 1999) e em *B. japonicum* (DUNN et al., 1992). Em alguns rizóbios, os flavonóides suplementados nos meios de cultura podem inclusive resultar em alteração da estrutura e do peso molecular dos EPS exsudados (DUNN et al., 1992).

Estirpes de *Rhizobium* sp. geralmente produzem mais EPS em meios sólidos do que estirpes de *Bradyrhizobium* sp., (BUSHBY & MARSHALL, 1977), e essa característica também pode estar associada à resistência a estresses ambientais uma vez que os EPS podem formar uma camada protetora a colônias de rizóbio, quando expostas a elevadas temperaturas ou elevadas concentrações de alumínio trocável (HOLLINGSWORTH et al., 1985).

6. Relação do EPS / PHB produzido por rizóbio.

Existem evidências que a síntese de EPS é inversamente proporcional à síntese de outro importante polímero, o poli-3-hidroxi-butirato. O PHB é o mais conhecido dentre os polímeros bacterianos biodegradáveis denominados polihidroxi-alcanoatos. O PHB foi o primeiro polihidroxi-alcanoato a ser estudado, o qual foi descoberto por Lemoigne por volta de 1926. WALLEN & ROHDWEDDER em 1974 observaram a presença de P(3HB) e poli-3-hidroxi-valerato em águas residuárias a partir de extração com clorofórmio.

Este polímero despertou muito interesse da indústria petroquímica, uma vez que a similaridade estrutural do PHB com o polipropileno atraiu a atenção de diversas indústrias visando sua potencial aplicação em substituição aos plásticos de origem petroquímica e na área médica, em que biodegradabilidade e biocompatibilidade são fatores importantes. O PHB e o polipropileno apresentam graus de cristalinidade semelhantes, porém o PHB apresenta menor resistência a solventes e maiores resistências aos raios UV (HOLMES, 1985). O homopolímero PHB apresenta boas propriedades, embora seja duro e quebradiço, fato que limita suas aplicações.

O PHB é sintetizado por microrganismos a partir de materiais renováveis como açúcares ou outra fonte de carbono. Quando presentes dentro das células o PHB, sendo o PHA mais estudado, forma grânulos fluidos e amorfos, porém após a extração forma um material cristalino e muito quebradiço, tornando-o mecanicamente pouco resistente.

A produção de ambos os polímeros, EPS e PHB, pelas mesmas células, necessita de uma regulação bioquímica das bactérias, devido a ambas vias metabólicas serem grande drenos dos esqueletos de carbono. Esta via metabólica consiste de três reações (MADISON & HUISMAN, 1999) e as rotas metabólicas para a produção de PHB está ilustrada abaixo (Figura 2).

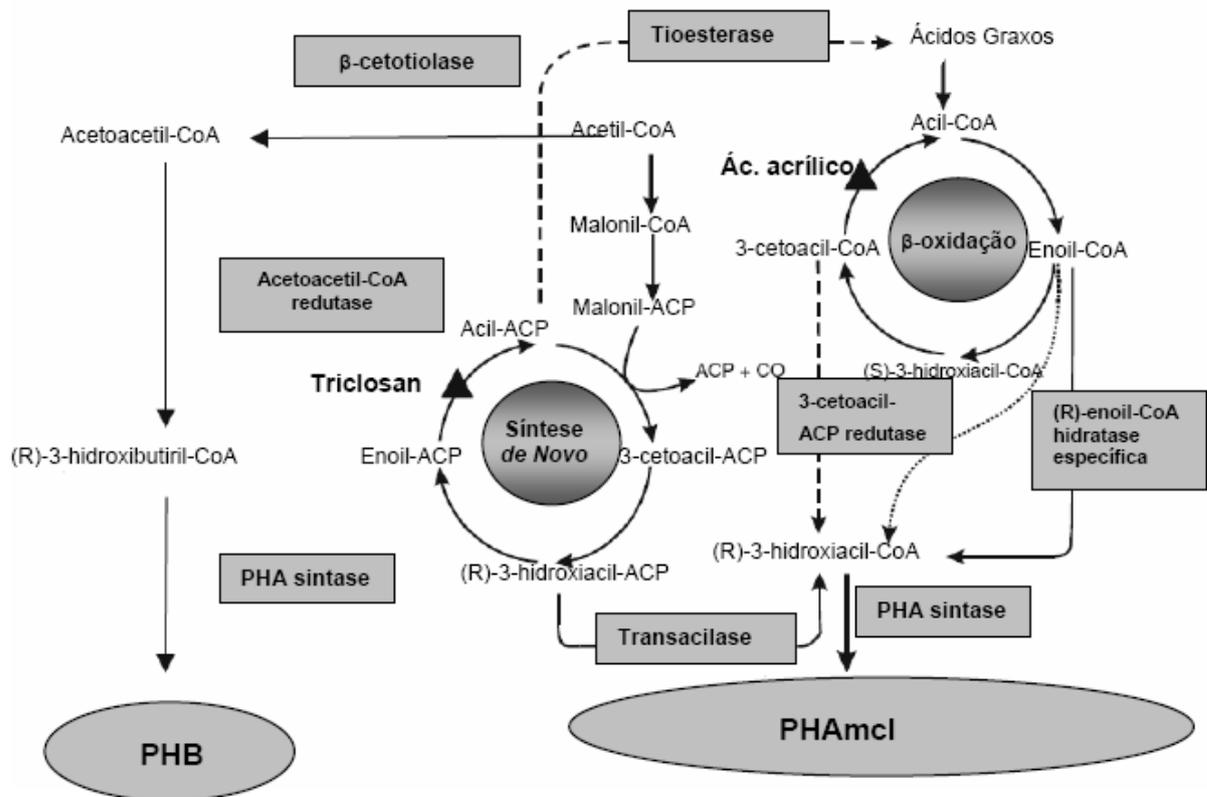


Figura 2. Esquema das Rotas Metabólicas para a Produção de PHB. Fonte: adaptado de REHM (2006).

O composto intermediário chave na síntese e degradação do polímero é o acetil-CoA. Enquanto existe substrato externo forma-se acetil-CoA, que é parcialmente desviado para a produção de PHAs e para crescimento, através do ciclo dos ácidos tricarbóxicos (TCA). A primeira reação contém uma importante intersecção o ciclo TCA uma vez que as tiolases do tipo II (biossintéticas), denominadas de beta – cetoacil – CoA transferase, beta-cetotiolase, acetil-CoA acetiltransferase ou tiolase acetoacetyl-CoA (E.C. 2.3.1.9), catalisa a primeira reação da biossíntese de PHB, que consiste na condensação de duas moléculas de acetil-CoA originando acetoacetyl-CoA, codificada pelo gene *phbA* (MADISON & HUISMAN,1999). Estas também estão envolvidas em

outras vias biossintéticas como síntese de corpos cetônicos e iniciação da cadeia de isoprenóides (LIU et al., 2002; TRAINER & CHARLES, 2006).

Estudos feitos por OEDING & SCHELEGEL (1973) revelaram a existência de dois tipos de 3- β -cetotiolase, cujas atividades estariam relacionadas com o substrato. Um tipo de enzima é ativa somente para substratos com quatro e cinco carbonos, já o outro tipo de enzima é ativa para substratos com cadeia carbônica variando de quatro a dez átomos. Os dois tipos de enzimas podem ser utilizados na biossíntese de PHB.

As enzimas do tipo II atuam tanto na biossíntese (reação de condensação), como na degradação de PHB (reação de tiólise). A regulação da reação de condensação ocorre pela concentração celular de coenzima A. Assim, altas concentrações de CoA fazem com que a reação ocorra no sentido contrário ao da biossíntese de PHAs (OEDING & SCHELEGEL, 1973; LAFFERTY et al., 1988).

O ponto de controle importante é a atividade da enzima β -cetotiolase. Esta enzima é ativada quando a concentração de acetil-CoA é elevada, uma situação que resulta do acúmulo de NADH ou NADPH em resposta a baixa concentração de oxigênio no meio. Com estes metabólitos ocorre a inibição das enzimas (citrato sintase e isocitrato desidrogenase) do ciclo de Krebs reduzindo o fluxo de carbono para este ciclo e levando a um aumento da concentração de acetil-CoA, fato que estimula a atividade da β -cetotiolase. Estas condições também favorecem a atividade da enzima acetoacetil-CoA redutase (EC 1.1.1.36), codificada pelo gene *phbB*, que catalisa a segunda etapa do processo (PAGE, 1992), ocorrendo a conversão de acetoacetil-CoA a hidroxibutiril-CoA, cujo reação é NADPH dependente e este pode ser recuperado pela via das pentoses 6-fosfato ou pela reação envolvendo a isocitrato desidrogenase, enzima do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA).

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* (MADISON & HUISMAN, 1999). Após a exaustão do substrato externo, o PHB é degradado, produzindo-se acetil-CoA que é usado para crescimento e manutenção celular.

As enzimas β -cetotiolase, acetoacetil-CoA redutase e P(3HB) sintase, responsáveis pela biossíntese de PHB, são codificadas pelos genes estruturais *phbA*, *phbB* e *phbC*, respectivamente. 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. A figura 3 ilustra a organização dos genes da biossíntese de PHA em *S. meliloti*.

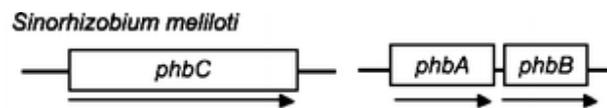


Figura 3. Organização dos genes da biossíntese de PHA em *S. meliloti* (TOMBOLINI et al. 1995).

Cupriatus necator, *Burkholderia sp.* e *Alcaligenes latus* apresentam os três genes em operon, podendo variar apenas a ordem entre eles, mas estando juntos no cromossomo bacteriano, como por exemplo em *C. necator* onde os genes *phbA*, *phbB* e *phbC* estão organizados em um operon *phaCAB* (SLATER et al., 1988). Já em bactérias como *Caulobacter crescentus*, *Rhizobium etli*, *Rhizobium meliloti*, *Paracoccus denitrificans* e *Methylobacterium extorquens*, o gene *phbC*, responsável por codificar a enzima PHB sintase, não está localizado no mesmo operon que os genes *phbA* e *phbB*, os quais são coordenados por um único promotor (REHM, 2003).

KARR et al. (1984) demonstraram que a atividade da β -cetotiolase e da PHB sintase é negativamente correlacionados com a atividade de enzimas do ciclo do TCA, como a aceto-succinil-CoA transferase e piruvato desidrogenase em bacteróides *Bradyrhizobium japonicum* isolados de nódulos de soja. Mutantes de *R. eutropha*, que exibem a atividade de isocitrato desidrogenase reduzida, o acúmulo de PHB ocorre mais eficientemente do que na linhagem selvagem (LEE & PARK, 1996).

Outro fator envolvido na síntese de PHB é a concentração da acetil-CoA, através do mecanismo de regulação da concentração do substrato da enzima β -cetotiolase (HAYWOOD, et al., 1988), uma vez que a afinidade da β -cetotiolase para este substrato

é muito baixa ($K_m=0,5$ mM), se comparado com a afinidade da enzima citrato sintase para este substrato ($K_m =0,07$ mM) em *Methylobacterium rhodesianum* (MOTHES et al., 1997). Além de haver a competição entre as enzimas β -cetotiolase e citrato sintase pelo substrato, a inibição pelo produto CoA ocorre em menores concentrações para a citrato sintase e em maiores para a β -cetotiolase (MOTHES et al., 1997). Além da concentração do produto, a reação catalisada pela enzima β -cetotiolase é NAD(P)H dependente, dessa forma as concentrações celulares de NAD(P) e NAD(P)H influenciam na velocidade desta reação. Concentrações mais elevadas de NAD(P)H inibem em maiores concentrações para a β -cetotiolase do que para a citrato sintase (MOTHES et al., 1997) e para a isocitrato desidrogenase e a citrato sintase, favorecendo a via metabólica de síntese o PHB em detrimento ao metabolismo do ciclo do TCA.

Avaliando a capacidade de produzir EPS, uma intersecção teórica foi proposta por PIROG et al. (2003) para bactérias do gênero *Acinetobacter* onde o piruvato oriundo da glicólise e a acetil-CoA são drenados pela síntese do monômero de um único EPS sintetizado por bactérias deste gênero. Além da possível interação entre essas vias metabólicas, a demanda de carbono pela síntese de EPS provavelmente resulta em uma regulação metabólica entre as vias biossintéticas dos EPS e as demais vias metabólicas primárias e secundárias das células (SKORUPSKA et al., 2006). Dessa forma como a produção de EPS e PHB demandam grande quantidade de carbono bacteriano, e no caso do PHB há uma intersecção com o ciclo do TCA, o metabolismo bacteriano para a produção destes dois polímeros, é raro as estirpes que apresentam em um mesmo estado fisiológico a produção elevada dos dois polímeros (TAVERNIER et al., 1997).

No trabalho realizado por TAVENIER et al. (1997), envolvendo estudo em relação à produção de EPS e PHB em duas estirpes de *Rhizobium meliloti* cultivadas com diferentes fontes de C e N, observaram que a síntese desses produtos é inversamente proporcional, sendo que a natureza da fonte de C e N, e a estirpe em estudo interferiram na produção desses dois polímeros, sendo o pH do meio um fator

altamente importante para a produção desses elementos, favorecendo a produção de um deles.

QUAGLIANO & MIYAZAKI (1999) avaliaram a produção de EPS e PHB por estirpes de *Azotobacter* sp. em relação a condições de cultivo como temperatura, e as fontes de carbono utilizadas, direcionaram a produção de um polímero ou outro. TAVERNIER et al. (1997) avaliaram a produção de EPS e PHB por duas estirpes de *Rhizobium*, verificando que uma delas apresentava a produção de elevadas quantidades de ambos os polímeros independente da concentração dos componentes do meio de cultura, o que não ocorrera com a outra estirpe avaliada.

Estudos realizados por MERCAN et al. (2002) mostram que o percentual de acúmulo de PHB em diferentes estirpes do rizóbio varia entre 1,38 a 40% da massa seca da bactéria, sendo que o melhor percentual de produção (40%) foi encontrado em uma estirpe *Rhizobium* sp. 2426 e a mais baixa produtividade (1.38%) no *Rhizobium* sp. 3173. Entretanto, nessas mesmas estirpes as produções de EPS foram inversamente proporcionais.

7. O envolvimento dos EPS na Interação Planta-Bactéria

Muitos estudos evidenciaram que esses polissacarídeos extracelulares e de superfície bacterianos parecem ter papel determinante no reconhecimento da planta (SPAINK, 2000), e essencial para uma interação simbiótica efetiva (BECKER & PÜHLER, 1998; KIRICHENKO et al., 2004; KOSENKO et al., 2001; LONG, 2001).

Os genes envolvidos na formação da superfície celular da bactéria são os genes determinantes da síntese de exopolissacarídeos (genes “exo”), lipopolissacarídeos (genes “lps”) e 1,2-b-glucanos (genes “ndv”), ligados ao desenvolvimento nodular, mas cujo papel determinante na especificidade hospedeira, embora sugerido por diversos autores (BECKER & PÜHLER, 1998; KIRICHENKO et al., 2004; KOSENKO et al., 2001) ainda não foi comprovado.

O surgimento das técnicas de biologia molecular e o avanço no seqüenciamento de genomas permitiram uma nova abordagem na elucidação de funções gênicas. A mutação de um determinado gene no genoma é uma estratégia muito útil para estudar a função biológica desse mesmo gene na célula. Esta estratégia tem permitido a identificação e caracterização de genes novos, uma vez que é possível empregar sistemas para seleção de fenótipos de interesse. Desta forma, é possível o isolamento e identificação do gene mutado, além de permitir a correlação com a função desempenhada.

Mutações nos genes *exo*, *lps* e *ndv* resultam em diversos distúrbios no processo de infecção, tais como a inabilidade de formar o cordão de infecção, resultando na formação de nódulos vazios, não fixadores, fenótipo definido como Nod⁺ Fix⁻ (ARNOLD et al., 1994).

Tem sido sugerido um possível envolvimento dos genes *exo* e *lps* na determinação da especificidade hospedeira, mas nenhuma evidência mais clara mostrou que os componentes da superfície celular do rizóbio são os determinantes principais da especificidade hospedeira (GRAY & ROLFE, 1990) e, por isso, o papel desses polissacarídeos rizobianos e dos componentes da superfície da raiz da leguminosa envolvidos no processo de nodulação são consenso na literatura pertinente.

Para estirpes diferentes das seqüenciadas, para a qual se conhece perfeitamente a seqüência da região de interesse que se pretende estudar, nomeadamente no caso de estirpes *S. meliloti*, há necessidade de utilizar regiões de homologia mais extensas de forma a aumentar a probabilidade de ocorrer recombinação homóloga no local do genoma pretendido.

Em relação a mutação no gene *exoH* foi observado que um mutante para este gene, que produziria exopolissacarídeos de alto peso molecular em sua quantidade normal e, o de baixo peso molecular em uma quantidade muito reduzida, não conseguiu realizar o processo de infecção (DOWNIE, 2009).

LEVERY e colaboradores (1991) mostraram que linhagens normais de *R. meliloti* produzem um EPS (succinoglucana) formado por unidades repetitivas octassacarídicas, com algumas substituições por acetil e succinil. Mutantes de *R. meliloti* secretaram

outro exopolissacarídeo, denominado EPSb, capaz de formar nódulos para fixação de nitrogênio em alfafa, entretanto foram incapazes de produzir succinoglucana. Evidenciaram também que o EPS b pode executar a mesma função biológica natural que a succinoglucana de *R. meliloti*, consideravelmente mais complexo que o EPSb. Entretanto, as duas estruturas têm uma característica comum que é a presença do dissacarídeo β -Glc-(1 \rightarrow 3)-Gal, o qual poderia representar o ponto de reconhecimento no processo de invasão nodular.

O' CONNELL e colaboradores (1990) estudando mutantes de *Rhizobium* sp., estirpe selvagem CIAT899, atualmente denominado como *R. tropici* CIAT899 (=SEMIA 4077), verificaram que todos produziram colônias secas em meio sólido, portanto, deficientes em produzir EPS, mesmo tendo relatos que crescimento em meio contendo carboidrato é usualmente acompanhado pela produção de goma (36). Porém, observaram que os mutantes afetados na produção de EPS não perderam ou tiveram afetada a capacidade de interagir com seus hospedeiros, uma vez que induziram nódulos com coloração rósea, apresentando nodulação efetiva no feijoeiro. Por outro lado, diversos estudos mostraram que na espécie *S. meliloti*, os nódulos induzidos por mutantes não produtores de EPS são pequenos, contêm poucos ou nenhum bacteróides, e são incapazes de fixar nitrogênio (BECKER et al., 1993; BECKER & PÜHLER, 1998; MOREIRA *et al.*, 2000).

GONZALÉZ e colaboradores (1996) demonstraram que mutantes de *S. meliloti* não produzem um EPS (conhecido com EPS II), e eram incapazes de infectar a *Medicago sativa*. Wang et al. (2008) avaliando diversas linhagens de mutantes obtidos através da inserção do transposon Tn5, em *Mesorhizobium tiashanense*, demonstraram que as linhagens incapazes de produzir EPS abundantemente também não formavam biofilme e não eram capazes de nodular a sua hospedeira de origem.

8. Algumas características reológicas de polissacarídeos extracelulares.

A caracterização dos EPS microbianos é importante na determinação da aplicabilidade desses biopolímeros. Entre as metodologias adotadas na caracterização dos EPS, a avaliação reológica destaca-se por fornecer informações a respeito da estrutura molecular e de possíveis aplicações biotecnológicas (KACI et al., 2005).

A reologia é a ciência que estuda a deformação e o fluxo dos materiais sob influência de tensões. Dentro deste contexto, a matéria pode estar no estado líquido, sólido ou gasoso (BRETAS & D'ÁVILA, 2005; DAK et al., 2007). Os fluidos podem ser classificados em: viscoelásticos, dependentes e independentes do tempo, como podemos ver na Figura 4.

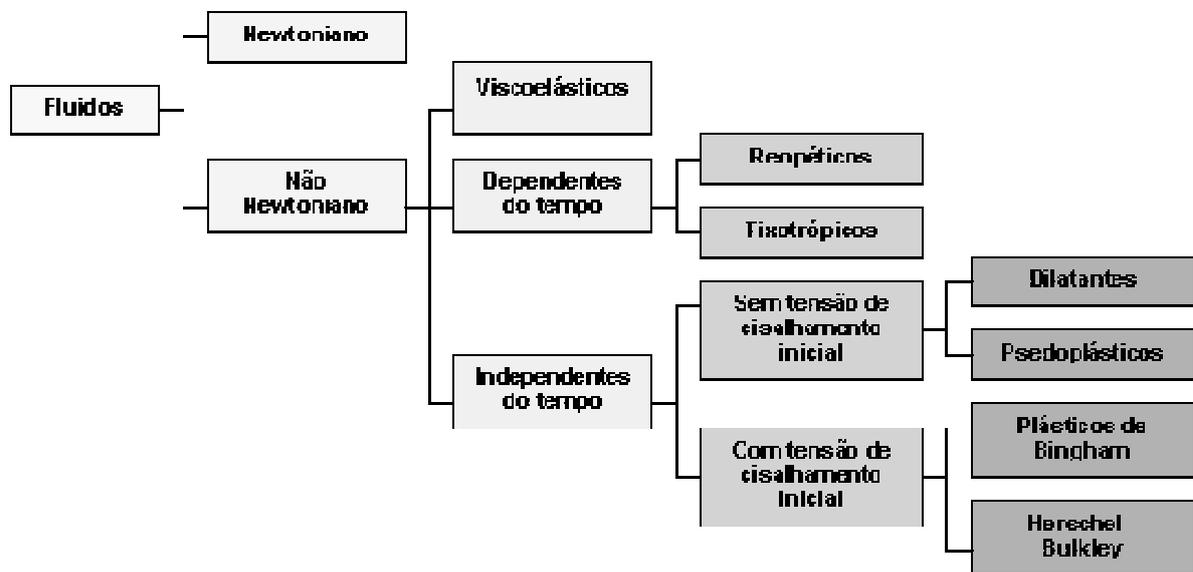


Figura 4. Classificação dos Fluidos segundo seu comportamento reológico. (Fonte: http://www.setor1.com.br/analises/reologia/cla_ssi.htm)

Segundo SCHRAMM (2006), sólidos ideais deformam-se elasticamente e a energia necessária para a deformação é completamente recuperada quando a tensão é removida. Fluidos ideais como líquidos e gases deformam-se irreversivelmente, eles escoam e, neste caso, a energia requerida para a deformação é dissipada dentro do fluido na forma de calor e não pode ser recuperada simplesmente pela remoção das tensões.

A reologia considera dois materiais como ideais: o sólido elástico e o líquido viscoso. No sólido elástico a propriedade de maior interesse é a elasticidade, ou seja, um material com forma definida quando deformado por uma força externa, dentro de certos limites, retornará à sua forma e dimensões originais, após a remoção dessa força. Já no líquido viscoso a propriedade de maior interesse é a viscosidade, que tem como característica não possuir forma definida, escoando irreversivelmente com a aplicação de uma força externa (BRETAS & D'ÁVILA, 2005).

Os líquidos pseudoplásticos apresentam uma diminuição da viscosidade com o aumento da taxa de deformação, que depende principalmente da orientação/alinhamento de moléculas ou partículas na direção do fluxo, superando o movimento Browniano de moléculas. Em taxas de deformação muito baixas, o movimento Browniano das moléculas as mantêm em uma ordem interna irregular, sem alteração significativa da estrutura tridimensional, apesar dos efeitos iniciais da orientação de cisalhamento. Deste modo, o líquido apresenta um comportamento semelhante ao dos líquidos Newtonianos, com a viscosidade independente da taxa de deformação. Quando o cisalhamento excede o efeito aleatório do movimento Browniano, a viscosidade cai drasticamente pela indução do alinhamento das moléculas na direção do fluxo. Em taxas de deformação extremamente altas, a viscosidade se aproxima de um nível finito constante.

Taxas de deformação ainda maiores não são mais capazes de reduzir a viscosidade, pois o ótimo da orientação/alinhamento das moléculas foi alcançado. Este alinhamento se perde quando o cisalhamento diminui ou é interrompido. Dentre os líquidos pseudoplásticos estão diversas substâncias de alta importância técnica e

comercial, tais como soluções poliméricas, emulsões, suspensões ou dispersões (VRIESMANN, 2008).

Os fluidos pseudoplásticos, durante o escoamento, podem apresentar três regiões distintas de taxas de deformação: baixa, média e alta. Na região newtoniana ou de baixas taxas de deformação, a viscosidade aparente (η_0), chamada de viscosidade limitante à taxa de deformação zero, não varia com a taxa de deformação aplicada. Na região de taxas de deformação médias, a viscosidade aparente (η) diminui com o aumento da taxa de deformação (comportamento pseudoplástico) e, na região de altas taxas de deformação, a viscosidade aparente (η^∞) volta a ficar constante e é chamada de viscosidade limitante a taxas de deformação infinitas (TONELI et al., 2005).

Os líquidos dilatantes mostram um aumento da viscosidade quando a taxa de deformação aumenta, pois as partículas exigem um espaço maior para o movimento e, havendo líquido disponível para ocupar os novos espaços, o fluido se dilata (TONELI et al., 2005).

Os fluidos plásticos não fluem até que uma tensão de cisalhamento crítica (*yield point*) seja excedida. O sistema em repouso apresenta um caráter sólido, com uma viscosidade extremamente alta em razão das forças das ligações intermoleculares, as quais restringem mudanças de posição de elementos de volume, e impedem o fluxo. Quando a força externa excede as forças das ligações, verifica-se um ponto de ruptura, no qual a estrutura entra em colapso, os elementos de volume podem mudar de posição irreversivelmente, o sólido se torna líquido e começa a fluir. Em outras palavras, a plasticidade descreve líquidos pseudoplásticos com limite de escoamento, tais como graxa, massas para batom, pasta de dentes e borrachas naturais (SCHRAMM, 2006; TOSIN, 2008).

A grande maioria dos fluidos apresenta um comportamento reológico que os classifica entre os líquidos e sólidos: eles são chamados de viscoelásticos. Deste modo, a viscosidade e a elasticidade são duas possibilidades de resposta à tensão a que são submetidos. O comportamento sólido (distensão) ou líquido (fluxo) vai depender das características relacionadas ao tempo natural de relaxação e ao tempo de duração do experimento (SCHRAMM, 2006).

III. OBJETIVOS

Neste trabalho, buscou-se a inativação através da mutagênese insercional por transposição *in vitro* dos genes *exoZ* da estirpe selvagem *Rhizobium tropici* SEMIA 4080 envolvidas na síntese das subunidades repetitivas do EPS e nos genes *phbAB* em “tandem”, responsáveis pela síntese do PHB, com o intuito de obter microrganismos com aspecto altamente mucoso, produtor superior de EPS em relação a estirpe selvagem. Análises comparativas com a estirpe selvagem e as suas formas mutadas quanto à produção, composição, características físico-químicas e propriedades reológicas dos EPSs obtidos com vista a novas potenciais aplicações biotecnológicas, bem como no processo de nodulação e eficiência de fixação de N também foram realizadas.

Tendo os seguintes objetivos específicos:

- Obter duas estirpes mutantes: sendo uma estirpe mutante nos genes *phbAB*, e outra no gene *exoZ* de *R. tropici* por inserção do transposon EZ::Tn5 <KAN-2>;
- Confirmar a presença do transposon EZ::Tn5 <KAN-2> nos genes alvos através de seqüenciamento;
- Avaliar o fenótipo mucoso das estirpes mutantes em relação à selvagem;
- Realizar análises comparativas quanto á produção e características físico-químicas dos EPSs;
- Estudar as propriedades reológicas dos EPSs obtidos com vista a novas potenciais aplicações biotecnológicas;
- Avaliar a capacidade de nodulação e eficiência de fixação de N em plantas de feijoeiro inoculadas com as estirpes mutantes e selvagem de *R. tropici* SEMIA 4080.

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi executado no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP) do Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da UNESP de Jaboticabal. Os protocolos das técnicas moleculares, quando não especificados pelo fornecedor dos Kits ou reagentes, foram baseados em SAMBROOK & RUSSEL (2001). Tais técnicas não oferecem risco para o meio ambiente e saúde humana, encaixando-se nos padrões de biossegurança (NB-1).

1. Bactérias e plasmídeos

As bactérias e plasmídeos utilizados neste trabalho estão listados na Tabela 2. A estirpe *Escherichia coli* DH10B foi utilizada na clonagem de produtos de PCR, utilizando vetor plasmidial pGem T-Easy (Promega).

2. Meios de Cultura, condições de cultivo e estocagem das bactérias.

Os meios de culturas utilizados no desenvolvimento deste trabalho estão relatados nas Tabelas 3.

A bactéria de *E. coli* estirpe DH10B foi cultivada em meio líquido Luria-Bertani Broth (LB) conforme descrito por SAMBROOK & RUSSEL (2001).

A bactéria selvagem de *R. tropici* SEMIA 4080 e seus mutantes foram cultivados em meio de cultura TY “Tryptone-Yeast Medium” (BERINGER, 1974) a 29°C, durante 24 h. Após este período foi retirada uma alíquota de 800 µl do cultivado, sendo essa adicionada em 200 µL de glicerol. Tal amostra foi submetida ao congelamento em nitrogênio líquido e posteriormente estocada a -80°C, sendo esse o estoque definitivo. A estirpe SEMIA 4080 também foi mantida a 4°C em tubos contendo meio TY sólido, sendo esse o estoque de trabalho.

Tabela 2. Linhagens bacterianas e plasmídeos.

Linhagem / Estirpe	Genótipo / Fenótipo	Fonte ou Referência
<i>Rhizobium tropici</i> SEMIA 4080 (estirpe PRF81) 4080ΩZ03 (MUTZC3)	<i>exoZ</i> ::Tn5	Coleção FEPAGRO, Porto Alegre, RS. Desenvolvido neste estudo
4080ΩPhb7 (MUTPA7)	genes <i>phbAB</i> ::Tn5	Desenvolvido neste estudo
<i>E. coli</i> DH10B	Sm ^r ; F'[<i>proAB</i> ⁺ <i>lacZ</i> ΔM15] Linhagem hospedeira do vetor pGem-T-easy	SAMBROOK et al., 1989
Plasmídeo		
<i>pGem-T easy</i>	Vetor de clonagem Amp ^r , f1 ori, <i>lacZ</i>	Promega
<i>pGem-T EXOZ</i>	pGem-T contendo uma região do genoma de <i>R. tropici</i> com o gene <i>exoZ</i> .	Desenvolvido neste estudo
<i>pphbAB</i>	pGem-T contendo uma região do genoma de <i>R. tropici</i> com os genes <i>phbA</i> e <i>phbB</i> .	Desenvolvido neste estudo
<i>pexoZKan</i>	pGem-T contendo um transposon que confere resistência a canamicina na região codificadora do gene <i>exoZ</i> de <i>R. tropici</i> .	Desenvolvido neste estudo
<i>pphbABKan</i>	contendo um transposon que confere resistência a canamicina na região codificadora dos genes <i>phbAB</i> em "tandem" de <i>R. tropici</i> .	Desenvolvido neste estudo

Tabela 3. Composição dos meios de culturas.

Meio LB (Luria Bertani) por litro (SAMBROOK et al., 1989).	
Triptona	10g
Extrato de levedura	5g
NaCl	10g
Composição do meio SOC (SAMBROOK et al., 1989) por litro, suplementado com glicose estéril 20 mmol/L.	
Triptona	20g
Extrato de levedura	5g
NaCl	0,5g
KCl	0,186g
MgCl ₂	0,95g
Composição do meio TY “ Tryptone-Yeast Medium ” (BERINGER, 1974) por litro. O pH do meio foi ajustado para 6,8.	
Triptona	5g
Extrato de levedura	3g
CaCl ₂	0,87g
Composição do meio YMA “ Yeast Mannitol Agar ” (VINCENT, 1970) por litro.	
K ₂ HPO ₄	0,50g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,20 g
NaCl	0,1g
Manitol	10,0 g
Extrato de levedura	0,40 g
Vermelho Congo	5,0 mL
Agar	0,40 g

O pH do meio LB foi ajustado para 6,8. Para o preparo do meio sólido (**LA**) foi adicionado 1,5% (p/v) de Agar no meio LB. Após o preparo o meio foi autoclavado por 20 min a 120 °C a 1 atm.

Para o cultivo da linhagem *R. tropici* e seus mutantes, foram utilizados os meios de cultura TY, YMA, PGYA e PSYA conforme descrito a seguir. Após o preparo os meios foram autoclavados por 20 min a 120 °C a 1 atm.

O meio de cultura extrato de levedura e manitol foi utilizado para comprovação da pureza da cultura, uma vez que, o meio YMA contém o corante vermelho congo, o qual indica possíveis contaminações, já que a estirpe de interesse *R. tropici* não

absorvem o corante, formando colônias brancas, e a maioria das linhagens contaminantes absorvem o corante formando colônias vermelhas.

Os meios de culturas utilizados para a produção de EPS estão relatados na Tabela 4 e 5.

Tabela 4. Composição do meio **PGYA** (Campanharo, 2006) por litro. O pH do meio foi ajustado para 6,8.

K ₂ HPO ₄	1,4 g
KH ₂ PO ₄	1,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,20 g
Glicerol	10,0 g
Extrato de levedura	3,0 g
Agar	0,40 g

Tabela 5. Composição do meio **PSYL** (Campanharo, 2006) por litro. O pH do meio foi ajustado para 6,8.

K ₂ HPO ₄	1,2 g
KH ₂ PO ₄	0,8 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,20 g
Sacarose	30,0 g
Extrato de levedura	1,0 g

2.1. Antibióticos.

As soluções de antibióticos utilizadas foram preparadas conforme descrito por SAMBROOK et al. (2001). As soluções estoque de canamicina (Kan) e ampicilina (Amp), foram preparadas em água destilada nas concentrações de 100 e 250 mg/mL respectivamente, e esterilizados por filtração em filtro Millipore 0,22 µm. Todos os antibióticos foram estocados a -20°C e adicionados aos meios de cultura

imediatamente antes do uso. As concentrações usadas em cada estirpe estão apresentadas abaixo na Tabela 6.

Tabela 6. Antibióticos.

Antibiótico	Concentração final para culturas de <i>E. coli</i>	Concentração final para culturas de <i>R. tropici</i>
Canamicina (Kan)	50 µg/mL	60 µg/mL
Ampicilina (Amp)	100 µg/mL	-

3. Desenho de oligonucleotídeos iniciadores para isolamento dos genes *exoZ* e *phbAB*.

A construção dos oligonucleotídeos iniciadores *exoZ*-R e *exoZ*-F, utilizados para isolar o gene *exoZ*, foi baseada na sequência homóloga das espécies (número de acesso entre parênteses): *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841 (RL0234); *R. etli* CFN 42 (RHE_CH00226); *R. etli* CIAT 652 (RHECIAT_CH0000269), que possuem o gene de interesse já identificado e seqüenciado. As seqüências das ORFs relacionadas ao gene *exoZ* foram obtidas a partir dos bancos de dados do Projeto Genoma *R. leguminosarum* ([http://www.sanger.ac.uk/Projects/R leguminosarum](http://www.sanger.ac.uk/Projects/R_leguminosarum)) e do Projeto Genoma *R. etli* (<http://kinich.cifn.unam.mx/~retligen/>).

Enquanto que, os oligonucleotídeos iniciadores para isolar os genes *phbA* e *phbB* foram construídos conforme PAGANELI (2009), que a partir do conhecimento das seqüências dos genes *phbA* e *phbB* inteiras adotou a estratégia de construção de iniciadores que amplifiquem os dois genes inteiros, para a clonagem do produto de PCR. Como tais genes estão em “tandem” na maioria dos microrganismos, optou-se por desenhar iniciadores que amplifiquem os dois genes juntos, resultando no “tandem” *phbAB*.

O desenho dos iniciadores para isolamento dos genes de interesse foi feito através do programa Gene Runner versão 3.05” (Hastings Software, Inc).

Os oligonucleotídeos iniciadores foram diluídos em TE 1 X (constituído de 50 μL Tris-HCl 2M, 20 μL EDTA 0,5M e 9.93 mL H_2O milli-Q, pH final da solução 7,4) no qual foram obtidas soluções estoque com concentração de 100 pmoles/ μL . Deste estoque foi retirado volume necessário para obtenção da solução trabalho na concentração de 5 pmoles/ μL .

4. Técnicas de extração de DNA

4.1. Extração de DNA genômico.

A extração do DNA genômico das bactérias foi realizada segundo o método modificado de MARMUR (1961). Este método foi adotado neste trabalho devido ter sofrido adaptações para micro tubo tipo “ependorf”.

As células foram cultivadas em meio líquido TY à 29°C, com agitação de 140 rpm por 32 h, a suspensão celular foi centrifugada a 12.000 x g durante 30 min a 4°C, descartando o sobrenadante. O sedimento foi lavado duas vezes com 1000 μL de solução salina (NaCl 0,85%) para remoção de polissacarídeos extracelulares e possíveis resíduos do meio de cultivo. O pellet foi ressuspenso em 400 μL de solução salina (NaCl 0,85%). Em seguida foram adicionados 40 μL de lisozima (20 mg/ml), 10 μL de RNase (10 mg/ml) e 88 μL de SDS 10%, para lise da parede celular e da membrana plasmática e a degradação de RNA. Após, 158 μL de Acetato de sódio 3 M foi adicionado, seguido pela extração com 650 μL da mistura de 24:1 de clorofórmio e álcool isoamílico. A precipitação do DNA ocorreu adicionando-se posteriormente dois volumes de etanol absoluto (4°C) à amostra. As amostras foram centrifugadas a 15.600 x g por 30 min a 4°C, e em seguida lavadas com 1000 μL etanol 70%. O DNA obtido foi seco a temperatura ambiente e dissolvido em 200 μL de água ultra-pura estéril por filtração e por autoclavagem (121°C por 15 min).

4.2. Extração de DNA plasmidial de *E. coli*

Coletou-se 05 (cinco) colônias das placas contendo os clones (obtidos conforme descrito no item 6.1), com o auxílio de um palito de madeira esterilizado, manipulado pelo uso de uma pinça (flambada ao rubro), transferiu-se para tubo falcon de 15 mL contendo 5 mL de meio LB e incubou-se a 37°C sob agitação de 190rpm durante o período de aproximadamente 12-18h. Este caldo foi utilizado para extração de DNA plasmidial ou pré-inóculo para os cultivos realizados neste estudo.

Para o isolamento do DNA plasmidial de todas as construções realizadas foram utilizados um “kit” comercial. Esta extração foi realizada segundo a metodologia descrita no protocolo do kit de extração (Wiz Plus SV Minipr DNA Purif Sys, Prodimol).

5. Técnicas de manipulação do DNA

5.1. Quantificação em NanoDrop e eletroforese de DNA

O DNA genômico, o vetor linearizado e o fragmento de DNA de interesse devidamente cortado com as enzimas adequadas foram quantificados tanto através de visualização após eletroforese em gel de agarose, bem como pelo auxílio do aparelho NanoDrop ND-1000 (Uniscience).

As soluções trabalho de DNA foram diluídas para a concentração final de 50 ng de DNA genômico. Os estoques de DNA permaneceram a -20°C.

Para eletroforese foram utilizados géis de agarose (0,7 a 1%) acrescidos em brometo de etídio (0,5 µg/ml). A eletroforese do DNA genômico foi realizada em uma cuba horizontal modelo HORIZON 11-14 contendo tampão TEB 1x [Tris 89 mM, Ácido Bórico 89 mM e EDTA 2,5 mM, pH 8,3]. As amostras foram diluídas em Fsduds (Tris-HCl 65 mmol/L pH 8,0, EDTA 1,75 mmol/L, Ficoll® 10%, SDS 1%, azul de bromofenol

0,02%) e foram aplicadas no gel. A voltagem e o tempo de corrida variaram conforme a amostra que estava sendo analisada ou purificada.

O marcador de tamanho molecular utilizado para servir como referência de migração eletroforética para cálculo dos tamanhos dos fragmentos foi o 1 kb DNA “Ladder” (Fermentas). A revelação do gel foi realizada sob luz UV e a imagem foi documentada em um aparelho foto-documentador (Bio Rad – Gel Doc 1000), através do “software” Quantity OneR (Bio Rad™, Hercules, CA, USA).

5.2. Amplificação dos genes de interesse

A amplificação dos genes de interesse foi realizada pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) como descrito por KOCHER & WILSON (1991). A condição da reação de PCR para os genes *phbAB* foi a mesma utilizada por PAGANELLI (2009). E a padronização da reação de amplificação do gene alvo *exoZ* escolhido foi realizada em termo gradiente (COBBERT), determinando-se a temperatura de pareamento ideal para o iniciador.

As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador de gradiente de temperatura, com os seguintes ciclos: 3 min de desnaturação inicial a 94 °C; 35 ciclos constituídos de: 40 segundos de desnaturação a 94 °C, 1 min de pareamento com a temperatura variando entre 60,7 °C, 1,5 min de alongação a 72 °C. Após os ciclos, as reações são submetidas a uma extensão final por 7 min a 72 °C e 4 °C até a retirada dos micro tubos do termociclador.

Após cada reação de amplificação, os fragmentos amplificados foram analisados em gel de agarose a 1,0% em tampão TBE 1X, por eletroforese e o seu tamanho foi estimado por comparação com padrões lineares de DNA, conforme especificado no item 5.1. Deste modo, para cada gene determinou-se as melhores condições para a PCR, as quais foram utilizadas em todas as reações.

5.3. Purificação e clonagem dos insertos em vetor.

Os produtos de amplificações dos genes de interesses foram purificados, segundo protocolo dos kits de purificação GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification System (GE Healthcare), para eliminar fragmentos de DNA não-específicas e evitar clones falso-positivos.

Os produtos de PCR foram ligados ao vetor comercial pGem T-Easy (Promega) para transformar *E. coli* DH10B conforme descrito em SAMBROOK & RUSSEL (2001), sendo os genes *phbA* e *phbB* clonados em “tandem” em um mesmo vetor e o gene *exoZ* clonado separadamente. Este vetor possui 3.015 pares de bases (Figura 5). Entre as características específicas deste vetor, podemos citar: origem de replicação f1 ori para crescimento em *E. coli*; resistência a ampicilina; e sistema de seleção de colônias baseado na expressão do gene *lacZ*.

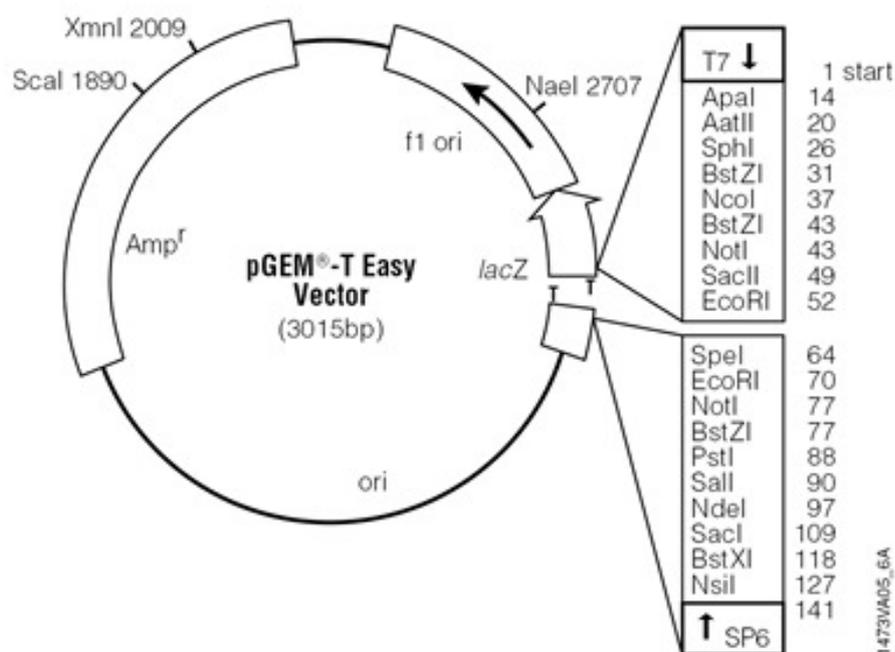


Figura 5. Esquema ilustrativo apresentando características do vetor comercial pGem T-Easy (Promega).

A ligação foi realizada mantendo uma relação de concentração de insertos de DNA SEMIA 4080 com DNA vetor na proporção molar [1:3], relação esta exigida pelo kit.

A reação foi executada em um volume de 20 μL contendo 2 μL da amostra amplificada (49,4 ng), 1 μL de água Milli-Q estéril, 5 μL de tampão de ligação 2 X, 1 μL de pGem T-Easy (50 ng / μL) e 1 μL da enzima T4 DNA ligase (3 unidades/ μL). Essa reação foi mantida a 4°C durante 16 h.

5.4. Restrição dos clones de produto de PCR para confirmar a clonagem

Para confirmar a presença de inserto nos clones obtidos do ensaio de clonagem dos fragmentos de interesse, realizou-se a restrição dos plasmídeos obtidos por lise alcalina para cada clone. Os clones foram cultivados e os DNA plasmidial extraídos conforme descrito anteriormente no item 4.2. As amostras de DNA foram clivadas utilizando as condições mais adequadas para a atividade da enzima de restrição, conforme indicação do fabricante. Para tanto, com os clones pGEM–T EXOZ fez-se uma digestão enzimática utilizando *EcoR* I (Biolabs) para liberar o possível inserto, conforme a seguinte reação: 245 ng de DNA plasmidial; 1 unidade de *EcoR* I (Biolabs); 1 μL de Tampão T4 e H₂O Milli-Q q.s.p. 10 μL . Para os clones *pphbAB*, este foram submetidos à digestão com enzima de restrição *NotI* (Biolabs) conforme indicação do fabricante. Essas preparações foram mantidas a 37°C por 2 h. Após, este período foram submetidos a eletroforese (item 5.1.).

5.5. Seqüenciamento e análise de DNA

Esta técnica foi utilizada para a confirmação dos clones contendo os genes de interesse obtidos e confirmação da entrada do transposon contendo o gene que confere resistência a canamicina, utilizado para a inativação nos genes *exoZ* e *phbAB*.

As reações de seqüenciamento foram realizadas segundo o método de terminação da cadeia por dideoxynucleotídeo (SANGER et al., 1977). Após a PCR de seqüenciamento, as amostras foram submetidas ao seqüenciamento capilar de DNA utilizando o aparelho ABI 3100 DNA Analyzer-Applied Biosystems. As seqüências obtidas foram analisadas pelo “Sequencing Analysis 3.4” e a montagem da seqüência, verificação da qualidade das bases dos eletroferograma e arquivos gerados no formato FASTA realizados pelo pacote de programas “Phred/Phrap/Consed” (GORDON et al. 1998).

As seqüências confirmadas nos sentidos 3' e 5' foram submetidas para buscar alinhamentos significativos, utilizando-se os algoritmos *Blastn* (para seqüências de nucleotídeos) ou *Blastp* (para seqüência deduzida de aminoácidos) através de seqüências depositadas no banco de genes ("GeneBank database") do National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). A seqüência deduzida de aminoácidos obtidas neste estudo e as *best hits* do *Blast* foram alinhadas no programa Clustalw.

6. Transformação bacteriana

6.1. Transformação de células competentes de *E. coli*

As células competentes de *Escherichia coli* estirpe DH10B, foi gentilmente fornecida pelo Laboratório de Genética de Microrganismos, do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, da FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal. E nos experimentos de transformação, foi utilizado o seguinte protocolo:

Tubos plástico tipo “eppendorf” (1,5ml) contendo alíquotas de 200 µL células competentes de *E. coli*, estirpe DH10B, foram removidos do freezer – 80°C e mantidos no gelo para descongelamento lento. Posteriormente, os 10 µL da reação de ligação (item 5.3.) foram misturados aos 200 µL de células competentes, seguindo-se agitação suave. Os tubos foram mantidos em gelo por 30 min. Após esse tempo, a suspensão de células foi submetida a tratamento de choque térmico

pela transferência do tubo para o banho regulado a 42 °C por 90 s, transferindo-o novamente para o gelo e mantendo-o por 2 min.

A estes foram adicionados 800 µL de meio SOC e incubados a 37 °C, com agitação de 110 rpm, durante 1 h em agitador rotativo. Decorrido esse tempo, uma alíquota de 100 µL da cultura foi transferida para placas contendo meio LB, contendo 100 µL de IPTG (0,240 g dissolvidos em 5 mL de água, esterilizado por filtração) e 100 µL de X-GAL (0,05 g dissolvidos em 1 mL de Dimetil-formamida), contendo ampicilina (100 mg L⁻¹) a fim de se selecionar os transformantes, contendo o plasmídeo que ancora o gene de resistência ao antibiótico. As placas foram incubadas em estufa do tipo BOD (Biological Oxygen Demand) por 18 h a 37 °C.

6.1.1. Seleção dos clones

Os clones foram selecionados no meio Agar LB contendo o antibiótico ampicilina, o qual é adequado para seleção, visto que o plasmídeo ancora o gene de resistência a este antibiótico. Após o período de incubação, foram selecionadas as colônias de coloração branca. A inserção do fragmento de DNA se dá na região do gene lacZ, responsável pela síntese de β-galactosidase que quebra o substrato X-gal, originando coloração azul. Portanto, as células que receberam o inserto formam colônias brancas e as que não receberam, formam colônias azuis. Os clones transformados que formaram colônias bem isoladas foram transferidos com auxílio de um palito de madeira estéril para placas estéreis de poliestireno para cultivo de bactérias (96 “well assay plate” poço) contendo 900 µL de meio LB com ampicilina (100mg/ml) e foram incubadas com agitação 190 rpm, a 37 °C, por 22 h.

Para a manutenção desses clones em estoque, deste cultivo coletou-se 250 µL de cultura de células dentro de tubos de estoque contendo 250 µL de glicerol puro e mantidas a -80 °C.

6.2. Teste de sensibilidade a canamicina.

A estirpe de *R. tropici* SEMIA 4080 também foi crescida em meio líquido YML por 24h a 28°C e alíquotas de 100 µl de cada linhagem foram semeadas sobre meio YMA suplementado com canamicina (30, 60, 100, 150, 200, 300 ou 400 µg.mL⁻¹) e placa controle sem adição de antibiótico. O crescimento da estirpe foi monitorado por 48 h e a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano foi escolhida para o experimento de transformação.

6.3. Preparação de células competentes de *R. tropici* SEMIA 4080.

Uma colônia isolada da bactéria em estudo foi transferida para 3 mL de meio líquido TY (BERINGER, 1974) e incubada sob agitação a 28°C e 150 rpm por 24 h. O mesmo volume foi transferido para 25 mL do mesmo meio mantido sob as mesmas condições e a cultura cultivadas por 48 h. Após esse período a cultura foi transferida para garrafas de polipropileno e centrifugada (10.621 x g, 4°C, 30 min).

A metodologia de preparação de células eletrocompetentes de *R. tropici* SEMIA 4080 foi segundo GARG e colaboradores (1999), com modificações. As células foram então lavadas duas vezes com 50 mL de água Milli-Q estéril e depois adicionado 50 mL de glicerol 10% estéril ao tubo, todo esse processo foi feito em gelo. Os sedimentos bacterianos foram ressuspensos, evitando bruscos movimentos dos tubos. Após a completa ressuspensão, as células foram novamente centrifugadas (4.000 rpm, 4°C, 10 min) e o sobrenadante descartado. A lavagem com glicerol 10% foi repetida sob as mesmas condições descritas acima. A segunda etapa de ressuspensão das células é mais rápida que a primeira, já que parte das impurezas extracelulares foi removida durante a primeira lavagem, diminuindo a coesão nos sedimentos. As células foram coletadas por centrifugação (4.000 rpm, 4°C, 10 min) e os sedimentos foram ressuspensos em 5 ml de glicerol 10%.

Após a completa ressuspensão, as células eletrocompetentes foram distribuídas em alíquotas de 100 µL em tubos do tipo “eppendorf”, congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para uso futuro.

6.3.1. A eletroporação de *R. tropici* SEMIA 4080.

Alíquotas de 100 µL de células de SEMIA 4080 eletrocompetentes foram descongeladas sobre gelo por aproximadamente 10 min. Em seguida, foi adicionado 100 ng de DNA do plasmídeo selecionado a estas células eletrocompetentes de rizóbio, sendo transferidas para eletrocubetas com espaço de 2 mm (BIO-RAD) previamente geladas (4°C). A cubeta foi incubada sobre gelo por 2 min, e colocada entre os eletrodos do equipamento eletroporador Gene Pulser II (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), onde foi aplicado um pulso elétrico com os seguintes parâmetros: 4,0 kV de voltagem, 200 V de resistência e 25 FD de capacitância por cerca de 6-10 ms. A corrente gerada altera a estrutura da membrana celular, abrindo poros temporários aquosos na bicamada lipídica que possibilitam a entrada do DNA recombinante na célula-alvo. Após o pulso elétrico as células foram recuperadas em 1,0 mL de meio líquido TY sem antibiótico, incubadas a 29°C por 4 horas.

Posteriormente, alíquotas de 50 µL dessas células foram semeadas em meio TY sólido contendo $60\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ de canamicina. A suspensão de bactérias também foi plaqueada nas diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-7} em solução salina (0,85 %). As placas foram devidamente identificadas e incubadas em estufa tipo B.O.D a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, até o aparecimento das colônias resistentes. Após o período de incubação foi possível observar vários mutantes que foram coletados com palitos esterilizados.

Obtido sucesso no processo de transformação, as colônias de cada mutante selecionada, foram crescida em 3 mL de meio TY líquido com canamicina a $29\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h. Do total, 800 µL foram utilizados para a estocagem do material e o restante repicado para manutenção em placa de Petri contendo meio YMA suplementado com Vermelho Congo para verificação da pureza dos mutantes.

7. Mutagênese insercional nos genes *exoZ* e *phbAB* de *R. tropici* SEMIA 4080.

Inúmeros procedimentos podem ser utilizados para a inativação ou ruptura de genes. Uma das possibilidades é a utilização de transposões ou elementos móveis, que através da recombinação homóloga acabam introduzindo este tipo de alterações nos genes escolhidos como alvo. A facilidade de sua introdução causando as mudanças fenotípicas reside na presença de seqüências repetidas opostas em suas extremidades, (FINNEGAN, 1989) que são reconhecidas pela a enzima transposase, responsável pela transposição (SNUSTAD & SIMMONS, 2001).

Dessa forma, *R. tropici*, estirpe SEMIA 4080 foi transformada com o vetor que contém o transposoma EZ-Tn5 < KAN-2> (Figura 6) que consiste em um complexo estável formado pelo transposona artificial EZ::Tn5 <Kan-2>, transposon que codifica o gene Kan-2, fornecendo resistência ao antibiótico canamicina, e a enzima transposase EZ::Tn5 que é necessária para a reação de transposição. A transposase é ativada por Mg²⁺ presente no ambiente intracelular, resultando em inserções randômicas do transposon EZ-Tn5 <KAN-2> no DNA genômico da bactéria eletroporada.

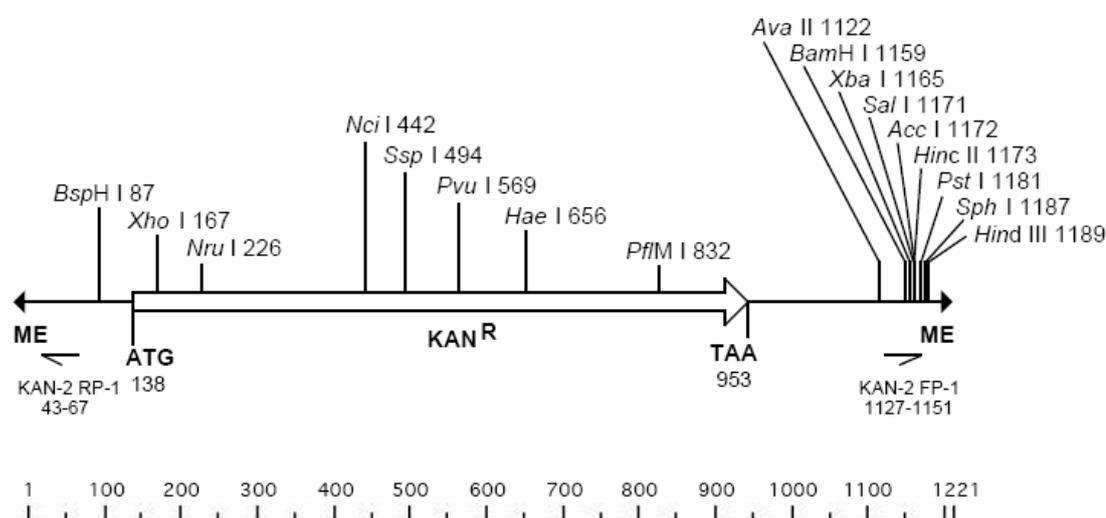


Figura 6. Transposon EZ-Tn5 < KAN-2> utilizado para mutagênese. O transposon EZ-Tn5 <KAN-2> forma um complexo estável com a enzima transposase EZ-Tn5, e gene de resistência a canamicina que são funcionais em *E. coli*, flanqueados por seqüências de reconhecimento (ME) da EZ-Tn-5 Transposase (EPICENTRE Biotechnologies, Madison, Wisconsin, USA).

Com a inserção da construção na estirpe selvagem de *R. tropici* SEMIA 4080 ocorre o fenômeno de “cross-over”, que pode ser simples ou duplo. Com isso haverá a inserção do cassete de resistência a canamicina no gene *exoZ* e nos genes *phbA* e *phbB* do cromossoma da bactéria.

7.1.1. Construção do plasmídeo *pexoZKan*

O produto de amplificação que possui o fragmento correspondente ao gene *exoZ* foi obtido do clone EXOZ-J-B02 do banco de clones do LBMP. Este fragmento foi ligado ao vetor pGem-T easy e transformados em *E. coli*. Após extração do plasmídeo, o DNA selecionados foram digeridos com a enzima *EcoRI* para a liberação de um fragmento de aproximadamente 0,8 kb. Este plasmídeo foi denominado de pGem-T EXOZ.

Em seguida o plasmídeo pGem-T EXOZ foi utilizado para a reação de inserção de transposon KAN-2 (EZ-Tn5, EPICENTRE) conforme metodologia fornecida pelo fabricante. A reação foi realizada contendo os seguintes componentes: 1000 ng DNA plasmidial; 0,7 pmol *EZ::Tn5 <KAN-2> transposon*; 1 U *EZ::Tn5 <KAN-2> transposase*; H₂O Milli-Q estéril e autoclavada q.s.p 10 µl. Esta mistura foi incubada durante 2 h a 37 °C. Em seguida a reação foi interrompida pela adição de 1 µL de *EZ::Tn5 10x stop solution* e a incubação por 10 min a 70 °C.

O plasmídeo resultante foi denominado de *pexoZKan* e foi transformado em *E. coli* estirpe DH10B. O surgimento de colônias resistentes a canamicina indicaram que ocorreu a integração do transposon no genoma e, portanto foram isoladas e estocadas a -80 °C.

A transferência para *R. tropici* estirpe SEMIA 4080 foi feita por eletroporação como descrito anteriormente no item 6.3.1.

7.2. Construção do plasmídeo *pphbABKan*.

Foi utilizada a mesma estratégia desenvolvida para a mutação do gene *exoZ*. O fragmento correspondente aos genes *phbAB*, contendo a região codificadora das proteínas beta-cetotiolase (*phbA*) e acetoacetyl-CoA redutase (*phbB*), utilizado foi obtido do clone PHBAB-J-A03 construído durante a execução deste trabalho pertencente ao banco de clones funcional do LBMP. O clone foi digerido com a enzima *NotI* para a liberação de um fragmento de aproximadamente 2,3 kb, confirmando os genes *phbAB* em “tandem” inserido no plasmídeo. Este plasmídeo foi denominado de *pphbAB*.

Em seguida o plasmídeo *pphbAB* foi utilizado para a reação de inserção de transposon KAN-2 (EZ-Tn5, EPICENTRE) conforme descrito no item anterior 7.2.1. O plasmídeo resultante foi denominado de *pphbABKan* e transformado em *E. coli* estirpe DH10B, como descrito no item 6.1. Os clones resultantes também foram inicialmente selecionados pela resistência a canamicina e posteriormente pelo perfil de restrição. A transferência para *R. tropici* estirpe SEMIA 4080 também foi realizada através de eletroporação conforme descrito anteriormente.

8. Triagem dos mutantes de *R. tropici* SEMIA 4080.

8.1. Crescimento em Meio Sólido Contendo Calcofluor e corante Vermelho Congo.

Como foram obtidos vários mutantes de *R. tropici*, necessitava-se de um método rápido para seleção dos mutantes que mais produzissem EPS. Para isto, algumas das estirpes mutantes de *R. tropici* foram cultivadas em placas de Petri utilizando meios de cultura PSY acrescidos de Agar (9 g L⁻¹), suplementado com corante vermelho congo (0,025 mg mL⁻¹). As culturas foram incubadas em estufa tipo B.O.D. a 28 °C durante 36 h. Depois, as culturas foram fotografadas.

Para comparação dos fenótipos também foram realizados ensaios com placas de Petri contendo meio sólido PSY acrescidos de um corante epifluorescente com comprimento de emissão de 430 nm (calcofluor bright 28 – SIGMA) na concentração final de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Este corante fluorescente é específico para polissacarídeos que contém ligações do tipo β -1 \rightarrow 4 ou β -1 \rightarrow 3 (WOOD, 1980). A detecção da produção de EPS de cada estirpe foi determinada com a iluminação das placas por luz UV num comprimento de onda de 365 nm. As culturas também foram fotografadas em luz branca.

9. PCR e SEQÜENCIAMENTO DOS GENES MUTADOS *exoZ* e *phbAB*.

O DNA da estirpe selvagem *R. tropici* SEMIA 4080 e dos prováveis mutantes foi extraído de acordo com a metodologia descrita no item 4.1. As mutações foram confirmadas pelo seqüenciamento dos produtos de PCR conforme já descrito anteriormente (item 5.5).

10. Método para obtenção do exopolissacarídeos rizobiano.

10.1. Inóculo e Condições de Cultivo.

Para realizar análises comparativas da estirpe selvagem e mutadas quanto à produção, composição em monossacarídeos e propriedades reológicas do EPS, inicialmente foram preparados pré-inóculos a partir de culturas crescidas sobre meio sólido PGYA (Campanharo, 2006). Uma colônia de 24 h foi inoculada em “erlenmeyer”, com capacidade para 125 mL, contendo 20 mL de meio líquido PGYL, e incubado em agitador rotatório 140 rpm, 29 °C por 30 h, ou seja, até obtenção de uma suspensão com leitura de densidade óptica (DO 600) igual a 0,3.

Alíquotas das culturas correspondentes a 0,10% (v/v) foram transferidas para “erlenmeyer” de 1000 mL contendo 500 mL do meio líquido PSYL (Campanharo, 2006) e incubadas novamente por 144 h, a 140 rpm, a 29°C. Estes microrganismos foram cultivados em triplicata.

10.2. Quantificação da biomassa celular.

Após 144 horas de cultivo, as culturas foram submetidas à centrifugação (10000 x g, a 4 °C, por 50 min), separando as células do sobrenadante. O sobrenadante coletado foi utilizado para a recuperação do EPS.

As células (biomassa celular) foram lavadas com água destilada e, secas em estufa a 50 °C até obterem peso constante. A biomassa celular seca foi avaliada por gravimetria, através da pesagem da biomassa celular produzida.

10.3. Isolamento, Purificação e Produção de Exopolissacarídeo.

Ao sobrenadante, resultante da centrifugação, foi adicionado álcool etílico 96° gelado (1:3; v/v) para a recuperação do EPS por precipitação, sendo imediatamente observada a formação do precipitado de imediato. Foi armazenado sob refrigeração (± 4 °C) durante 24 h. Transcorrido o tempo de refrigeração as amostras, foram novamente centrifugadas (10000 x g, a 4 °C, por 30 min), para separação precipitado/solvente, sendo o precipitado lavado várias vezes com álcool etílico que foi evaporado posteriormente. A precipitação com solventes resulta também em purificação parcial do polímero por eliminação dos componentes solúveis no solvente. A purificação total dos EPS foi feita por reprecipitação fracionada com solvente (CHI & ZHAO, 2003).

Posteriormente, o produto obtido foi seco em um liofilizador Hetovac vr-1 até peso constante, pesado em balança de precisão para a verificação da quantidade

obtida de EPS (grama de EPS por litro de meio de cultura) e então, preparados para as análises subseqüentes de CLAE e reologia.

10.4. Análise do Exopolissacarídeo: Determinação da composição em monossacarídeo do EPS das estirpes por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

Para a composição em monossacarídeo do EPS das bactérias, o EPS bruto foi analisado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando a química de marcação dos monômeros com 1-fenil-3-metil-5-pirazolone (PMP), segundo a metodologia descrita por FU & O'NEILL (1995). Para isto, amostra de 1,0 mg de EPS foi hidrolisada com 200 μL de ácido trifluoracético 4 mol L^{-1} em tubos de hidrólise de 13 x 100 mm e selados com uma chama de maçarico sob vácuo.

Os tubos então foram incubados a 120°C, durante 2 h. Após resfriamento a temperatura ambiente, os tubos foram abertos e a solução foi evaporada em um liofilizador Hetovac vr-1. O resíduo foi dissolvido em 0,5 mL de isopropanol, novamente evaporado.

Após isso, o EPS hidrolisado e os monossacarídeos padrões foram prederivatizados (marcação química) com PMP. As reações foram conduzidas em tubos tipo "ependorf", acrescentando-se em cada tubo 40 μL de solução de PMP (0,5 mol L^{-1} em metanol) e 40 μL de solução de hidróxido de sódio (0,3 mol L^{-1}), os tubos foram agitados e incubados a 70 °C por 2 h. Após o resfriamento a temperatura ambiente, a mistura foi neutralizada pela adição de 40 μL de solução de ácido hidrocloreídrico (0,3 mol L^{-1}). Para a extração dos derivados de monossacarídeos, foram adicionados 0,5 mL de éter butílico, sendo os tubos agitados por 5 segundos. As fases foram separadas por centrifugação a 5000 x g por 5 min e a fase superior (orgânica) foi removida e descartada. Este procedimento de extração foi repetido por 3 vezes e a fase aquosa resultante foi misturada com 1,0 mL de água milli-Q.

As análises dos monossacarídeos marcados com PMP foram desenvolvidas num sistema para CLAE equipado com um detector UV/VIS (Shimadzu, modelo SPD-M10A). O comprimento de onda para a detecção foi de 245 nm. A separação dos

monossacarídeos derivados com PMP foi realizada através de uma coluna GHRC ODS-C-18 (4,6 mm i.d. x 15 cm) com velocidade de fluxo constante de 0,5 mL min⁻¹ e usando os tampões A e B, constituídos por 100 mmol L⁻¹ de acetato de amônio e pH 5,5 25% de acetonitrila com 10% e 25% de acetonitrila, respectivamente. O gradiente para a separação foi: 0% de B, 30 min e 0-100% de B, até 100 min.

Como monossacarídeos padrões foram utilizados glicose, manose, ramnose, galactose, ácido glicurônico e ácido galacturônico, e as seguintes concentrações dos mesmos: 0,0125, 0,0250, 0,0500, 0,1000 mg mL⁻¹ para a construção da curva de calibração. A quantidade de amostra injetada no cromatógrafo foi de 30 µL. As análises foram feitas em duplicatas. Os dados obtidos da quantificação da composição em monossacarídeos do EPS foram submetidos à análise de variância, e as médias, comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

10.5. Propriedades Reológicas do EPS.

As amostras foram moídas em moinho de inox até se obter um sólido pulverizado para facilitar a solubilização. O estudo do comportamento reológico foi realizado pelo Núcleo de Reologia e Processamento de Polímeros (NRPP), vinculado ao Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de São Carlos (DEMa/UFSCar).

Os EPS foram solubilizados em água deionizada à temperatura de ± 20 °C, nas concentrações de 5 e 10 g L⁻¹. As soluções foram mantidas sob agitação mecânica constante, em velocidade média, à temperatura de ± 20 °C por 20 min.

As avaliações reológicas das soluções polissacarídicas foram efetuadas em reômetro de deformação controlada ARES, da Rheometrics Scientific. Foi utilizado geometria de cilindros concêntricos, com diâmetro do cilindro interno de 25 mm e diâmetro do cilindro externo de 27 mm, faixa de frequência avaliada entre 0,01 e 100 rad/s. As amostragens foram realizadas em duplicata à temperatura de 25 °C. Os

reogramas, para cada uma das duas concentrações de cada EPS, foram gerados utilizando-se software *RheoWin* (versão 3.20).

O modelo da Lei da Potência (Equação 1) foi ajustado aos reogramas e os valores do índice de consistência e índice de comportamento de fluxo do fluido foram determinados para as concentrações das soluções analisadas.

$$\tau = K \cdot \dot{\gamma}^n \quad (1)$$

onde: τ = tensão de cisalhamento (Pa); $\dot{\gamma}$ = taxa de deformação (s⁻¹); K = índice de consistência (Pa.s); n = índice de comportamento de fluxo do fluido (adimensional).

11. ENSAIOS COM PLANTAS: Avaliação da nodulação e Eficiência de fixação de N dos microrganismos.

O experimento foi conduzido em condições controladas em casa de vegetação do Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, Campus de Jaboticabal, Estado de São Paulo, localizado nas coordenadas geodésicas 21° 15' latitude Sul e 48° 18' longitude Oeste. Apresenta altitude média de 570 m e clima Aw de acordo com a classificação de Koeppen.

O plantio do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar IAC-Carioca foi realizado no dia 15 de outubro de 2010, em vasos plásticos, com capacidade de 1 L, contendo como substrato vermiculita autoclavada (120°C por 1 h).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições, tendo uma unidade experimental um vaso com uma planta e cinco tratamentos, sendo avaliados dois microrganismos geneticamente modificados 4080ΩZ03 e 4080ΩPhb7 e, utilizando para comparação, um tratamento correspondente à inoculação com a estirpe selvagem SEMIA 4080 (= PRF 81) de *R.*

tropici, que está entre aquela recomendada comercialmente para a produção do inoculante comercial no Brasil. Além dos tratamentos inoculados, havia tratamentos-controle sem inoculação: testemunha sem adição de N e testemunha nitrogenada, resultando em 20 parcelas. A testemunha nitrogenada recebeu 300 mg de nitrogênio na forma de NH_4NO_3 por vaso, sendo parcelada com 165 mg de N 14 dias e 135 mg de N, 28 dias após a semeadura. A disposição dos tratamentos está de acordo com a Tabela 7.

Tabela 7. Disposição dos tratamentos dos ensaios de nodulação e eficiência de fixação simbiótica de nitrogênio.

Tratamento	Descrição
T1	Inoculação com estirpe selvagem de <i>R. tropici</i> SEMIA 4080 (= PRF 81)
T2	Inoculação com mutante 4080ΩZ03
T3	Inoculação com mutante 4080ΩPhb7
T4	Tratamento controle sem inoculação e sem adição de N
T5	Tratamento controle sem inoculação e com adição de N

Antes da semeadura, as sementes foram previamente desinfetadas por imersão em etanol 70% e em hipoclorito de sódio 4%, seguindo-se de três lavagens em água destilada estéril (VINCENT, 1970). Foram utilizadas três sementes de feijoeiro em cada vaso.

O desbaste foi efetuado 5 dias depois do plantio e cada plântula foi inoculada com uma suspensão de rizóbio contendo cerca de 10^9 unidades formadoras de colônia por mL (Absorbância 0,8 - 1,0 com comprimento de onda 545 nm), utilizou 5 mL da suspensão próximo ao seu colo.

Procedeu-se a irrigação diariamente com 200 mL de água por parcela. Toda 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, esterilizada e com pH ajustado para 6,0, sendo aplicado em cada vaso 10 mL de solução nutritiva a cada sete dias.

Após 35 dias da semeadura foi efetuada a colheita, e as avaliações foram realizadas através da contagem do número de nódulos totais, massa da matéria seca dos nódulos por planta e teor de nitrogênio nas folhas.

11.1. Número e massa seca dos nódulos por planta.

Após coleta, lavagem e secagem das raízes, os nódulos foram separados e contados. Os dados foram resultantes de cada planta, de cada tratamento, e expressos em números de nódulos por planta (n° nod planta⁻¹). Os nódulos destacados foram pesados em balança digital. Os dados foram resultantes de cada planta, de cada tratamento, e expressos em MG planta⁻¹.

11.2. Teor de nitrogênio nas folhas.

Após a secagem da plantas em estufa com circulação forçada de ar, regulada a temperatura de 50°C, até atingir peso constante, foram coletadas as folhas do terceiro e quarto nó da planta a partir do ápice (Potafos, 2006). Em seguida, estas foram moídas (em moinho de inox) e armazenadas em frascos hermeticamente fechados. As amostras foram, então, submetidas à digestão com ácido sulfúrico, destilação e titulação para a obtenção do teor de N, expresso em porcentagem, conforme metodologia indicada por Malavolta et al. (1997).

O índice de efetividade simbiótica (*Efra*) dos variantes foi calculado por meio da equação 2, conforme descrito por Brockwell et al. (1966) citado por Sá (2001).

$$Efra = \frac{N \text{ total fixado}}{N \text{ total T C/N}} \times \frac{N \text{ total T S/N}}{N \text{ total T S/N}} \times 100 \quad (2)$$

Onde: N total fixado: Nitrogênio total do tratamento;
 N total T S/N: Nitrogênio total da testemunha sem nitrogênio;
 N total T C/N: Nitrogênio total da testemunha nitrogenada.

11.3. Análise Estatística.

Os dados obtidos foram analisados no programa estatístico SISVAR e submetidos à análise de variância com teste de F, utilizando-se o Teste de Tukey a 5 % para comparação entre médias de tratamentos.

V. RESULTADOS E DISCUSSÕES

1. Extração de DNA genômico.

Na Figura 7 observa-se o perfil eletroforético do DNA genômico da linhagem de *R. tropici* SEMIA4080 e dos mutantes 4080ΩZ03 e 4080ΩPhb7. Observa-se que os DNAs extraídos possuem alto peso molecular (acima de 10 kb), e estão bastante concentrado, apresentando alta emissão de fluorescência pelo brometo de etídeo, o que gera uma banda intensamente escura na fotodocumentação do gel. Esperava-se obter uma estimativa visual da concentração do DNA, pela comparação de sua intensidade com a da banda na altura de 6 Kb do marcador de tamanho molecular 1 kb DNA “ladder” (Fermentas) que possui 70 ng.

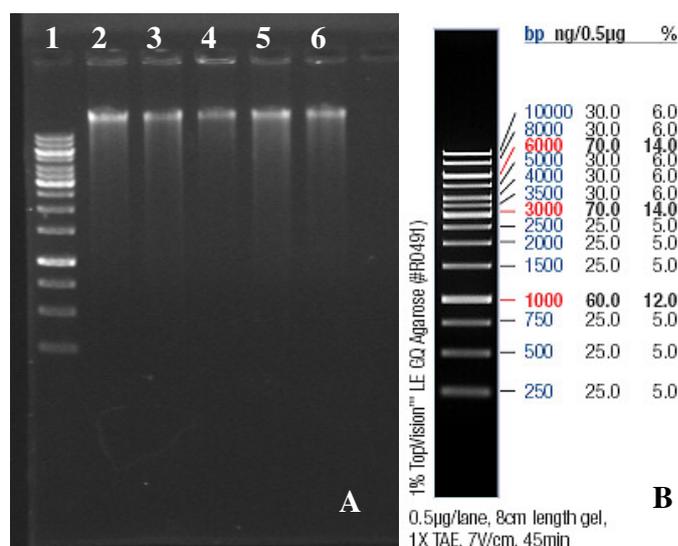


Figura 7. Perfil eletroforético de DNA genômico em gel de agarose 0,8% (p/v), contendo brometo de etídeo (0,5 mg/µL). **(A)** Canaletas: 1. Padrão de tamanho molecular (1 Kb DNA Ladder – FERMENTAS); 2. DNA genômico total *R. tropici*; 3-4. DNA genômico total do mutante 4080ΩZ03; 4-5. DNA genômico total do mutante 4080ΩPhb7. **(B)** Perfil eletroforético do marcador de tamanho molecular 1kb DNA “ladder” (Fermentas), com as respectivas massas contidas em cada banda.

O DNA foi quantificado em NanoDrop ND-1000 (Uniscience) e a quantidade e pureza do DNA genômico da estirpe escolhida e suas formas mutadas, utilizando-se a técnica de extração segundo metodologia descrita por MARMUR (1961), foi satisfatória para a realização da PCR (Tabela 8).

Tabela 8. Pureza (valor da relação 260/280) e concentração do DNA obtidos a partir da técnica de extração conforme MARMUR (1961).

Amostras	Relação 260/280	Concentração de DNA (ng/μl)
SEMIA 4080	1,86	438,00
4080ΩZ03	1,82	131,00
4080ΩPhb7	1,90	167,00

A presença de proteínas, RNA, detergentes e solventes orgânicos na preparação podem interferir nas medidas. Uma vez que os máximos de absorção de DNA e proteínas ocorrem respectivamente à 260 e 280 nm, uma medida aproximada da pureza do DNA isolado pode ser obtida determinando-se a relação $A_{260\text{nm}} / A_{280\text{nm}}$. As amostras obtidas foram consideradas adequadas para utilização em reações de PCR, possuindo a relação $A_{260\text{nm}} / A_{280\text{nm}}$ entre 1,80 a 2,00. A concentração de DNA foi utilizada como base para diluição do DNA e preparo de uma solução trabalho de 50 ng/μL.

2. Desenho de iniciadores para o isolamento dos genes de interesse.

Na Tabela 9 podem ser observadas as seqüências dos iniciadores, bem como suas temperaturas de anelamento e tamanho do produto da amplificação.

Tabela 9. Genes de interesse e iniciadores correspondentes.

Iniciadores	Sequências	Produto da amplificação	Temperatura de Anelamento
<i>exoZ</i> -R <i>exoZ</i> -F	CGCCGCCGATTGACGACAGCA TGCCTGAGGGGTTTCGTGAT	788 pb	60°C
<i>phbAB</i> -F <i>phbAB</i> -R	AGTTGCGGTACCATGTCCATGTCAGACGAT AGTTGCGCATGCTCAGGCGTGATACTGGCC	2300 pb	65°C

3. Padronização das reações de PCR.

A padronização das reações de PCR para os genes alvos foi realizada em termo gradiente (COBBERT), determinando-se a temperatura de pareamento ideal para cada iniciador.

Vários testes foram realizados na tentativa de obtenção do fragmento correspondente ao tamanho molecular de cada gene de interesse estudado. Desta maneira, foi padronizada as condições para cada um dos iniciadores dos genes, sendo essas: 1x de tampão; 1,5 mM de MgCl₂; 200 mM de dNTPs; 20 pMol de cada iniciador; 100 ng de DNA e 1U de TaqDNA polimerase(gotaq Promega), completando com água para um volume final de 20 µL. Para os iniciadores do gene *exoZ* foi utilizada as mesmas condições, apenas utilizando 25 pMol de cada iniciador em vez de 20 pMol, e 50 ng de DNA.

Nas condições definidas para os iniciadores, em relação ao gene *exoZ* foi obtido um fragmento entre 750 pb e 1000 pb, como era esperado para este gene (Figura 8A). Na Figura 8B, observa-se o fragmento do produto de amplificação, entre 2000 pb e 2500 pb, a qual corresponde a amplificação dos genes *phbAB* em *tandem*, o que era o esperado para tal produto de PCR.

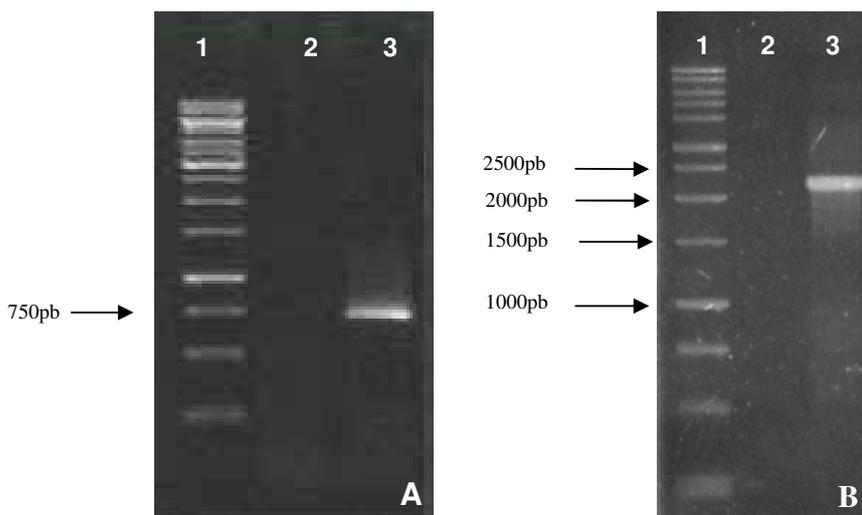


Figura 8. Perfis eletroforéticos dos produtos de PCRs para o gene *exoZ* (**A**); *phbAB* (**B**) em gel de agarose 1% (p/v), contendo brometo de etídio (0,5 mg/μL). A) Canaletas: 1. Padrão de tamanho molecular (1 Kb DNA Ladder – FERMENTAS); 2. Controle negativo *exoZ*; 3. Controle positivo (DNA genômico *R. tropici*) *exoZ*. B) Canaletas: 1. Padrão de tamanho molecular (1 Kb DNA Ladder – FERMENTAS); 2. Controle negativo *phbAB*; 3. Controle positivo (DNA genômico *R. tropici*) *phbAB*.

4. Inserção em *E. coli* e confirmação da ligação dos produtos de PCR ao vetor pGem T-Easy (PROMEGA).

Como restos de reagentes podem influenciar negativamente nas etapas de clonagem do fragmento de amplificação, realizou-se um tratamento prévio de purificação da amostra antes das etapas de clonagem.

O aumento do número de fragmentos de DNA pode ser obtido através de um processo de clonagem, onde se ligam os fragmentos resultantes da amplificação aos vetores. Quando um vetor é então duplicado no interior de uma bactéria, duplica-se também o fragmento de DNA.

O vetor pGem T-Easy foi selecionado para a clonagem por possuir um resíduo de Timina em suas extremidades, o que torna fácil a ligação de um produto de PCR obtido por amplificação com a enzima Taq DNA polimerase, que deixa um resíduo de Adenina.

O fragmento dos genes *phbAB* e do gene *exoZ* foram ligados separadamente ao plasmídeo de clonagem *pGem T-Easy* (Promega). Dos clones gerados, foram selecionados 96 e colocados em placas de cultivo de bactérias (“mega-titer plates”, 96 poços) sendo realizada a extração plasmidial de 05 (cinco) clones.

Para confirmação da entrada dos insertos desejados, os clones foram submetidos à digestão com enzima de restrição NotI (IBioLabs) para os clones *pPhbAB* e EcoRI para os clones *pGem-T EXOZ*, as quais possuem dois sítios de corte no vetor *pGem T-Easy* (Promega) e não possui sítio de corte nos fragmentos clonados. O conhecimento prévio dos sítios de restrição da enzima tornou possível a constatação da presença de cada fragmento inserido ao vetor.

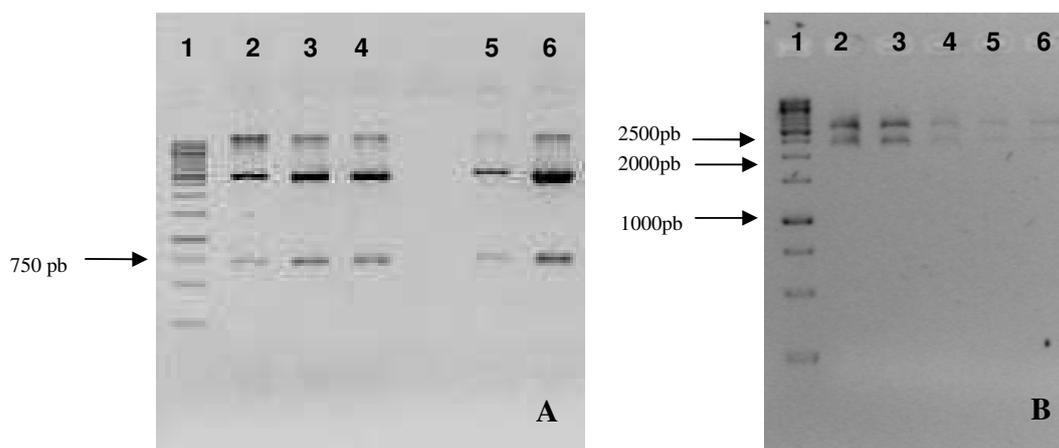


Figura 9. Perfis eletroforéticos dos plasmídeos digeridos referentes à construção em *pGem-T easy* em gel de agarose 1% (p/v), contendo brometo de etídio (0,5 mg/μL). **A)** Canaletas: 1. Padrão de tamanho molecular (1 Kb DNA Ladder – FERMENTAS); 2-6. Construção *pGem-T EXOZ* digerida com enzima de restrição EcoRI. **B)** Canaletas: 1. Padrão de tamanho molecular (1 Kb DNA Ladder – FERMENTAS); 2-6: Construção *pPhbAB* digerida com enzima de restrição NotI.

Alguns clones do fragmento de amplificação por PCR do controle positivo, obtidos em vetor *pGem T- Easy* e transformados em *E. coli* DH10B, foram escolhidos para submissão ao seqüenciamento, para comprovação se os fragmentos correspondem aos genes em questão.

5. Seqüenciamento

As seqüências obtidas foram comparadas ao banco de genes ("GeneBank database") do National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) para buscar alinhamentos significativos e comprovação da sua identidade.

A função do gene *exo* é conhecido em *S. meliloti* (BECKER & PÜHLER, 1998), e teve semelhança entre suas seqüências de genes *exo* de NGR234 (STREIT et al., 2004), o qual codifica uma acetil transferase. Entretanto, propõe-se que *ExoZ* de *R. tropici* SEMIA 4080 tem a mesma função, uma vez que pela avaliação das seqüências pelo *Blastn*, a seqüência do gene *exoZ* clonado neste trabalho apresentou 90% de identidade com homólogos nos genomas de outros simbióticos: *R. leguminosarum* bv. *trifoli* WSM2304 (CP001191.1); *R. leguminosarum* bv. *trifolii* WSM1325 (CP001622.1); *R. leguminosarum* bv. *trifolii* estirpe TA1 (DQ778610.1); *R. etli* CIAT 652 (CP001074.1); *R. etli* CFN 42 (CP000133.1).

Para as construções referentes aos genes envolvidos a biossíntese de PHB, foi possível comprovar que produto de PCR liberado refere-se aos genes *phbA* e *phbB*, que codifica beta-cetotilase e acetoacetil-CoA redutase, respectivamente, uma vez que o seqüenciamento da região "forward" quando comparada com o banco de dados BLAST, apresentou acima de 95% de similaridade com bactérias pertencentes a outras espécies de rizóbio, como por exemplo, *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 (NP 766865.1); *Sinorhizobium meliloti* 1021 (NP 387367.1); *S. fredii* NGR 234 (YP 002827755.1); *Bradyrhizobium* sp. ORS 278 (YP 001202743.1), entre outras.

6. OBTENÇÃO DA ESTIRPE MUTANTE

Para a obtenção da estirpe mutante *exoZ*⁻ e *phbAB*⁻ de *R. tropici* SEMIA4080, foi utilizado plasmídeo pré-selecionados contendo os genes de interesse clonado no vetor comercial *pGem T-Easy* (Promega), que foram construídos neste estudo.

Após a confirmação da presença do gene *exoZ* no plasmídeo pGem-T EXOZ e dos genes *phbAB* no plasmídeo *pphbAB* foram realizadas reações para inserção do transposon *EZ::TNTM<KAN>* *in vitro*. Obtiveram-se vários clones, que foram analisados para verificar a região de inserção do transposon. Para a identificação de um clone com inserção no gene *exoZ* e, um outro clone com a inserção nos genes *phbAB* em “tandem”, os plasmídeos das colônias selecionadas aleatoriamente foram purificados e submetidos a análise por enzimas de restrição com sítios únicos no inserto conforme descrito em materiais e métodos. A análise dos perfis eletroforéticos permitiu realizar a seleção de colônias de *E. coli* que receberam apenas o vetor contendo o fragmento de DNA com uma inserção do elemento *EZ::Tn5* dentro do gene de interesse conforme apontam as Figuras 10 e 11.

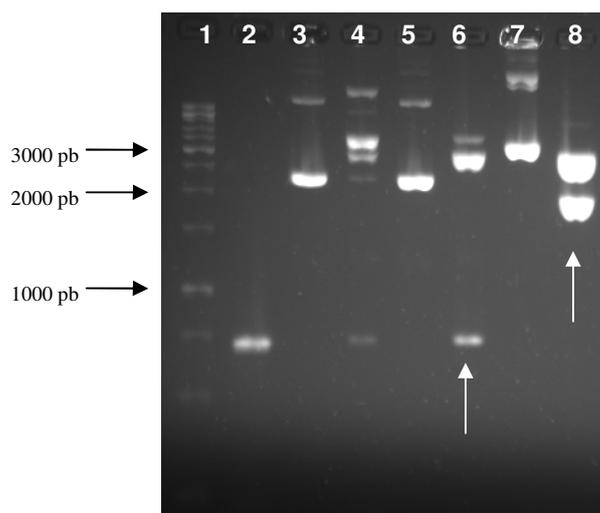


Figura 10. Perfis eletroforéticos dos plasmídeos selecionados pGem-T EXOZ e *pexoZKan* em gel de agarose 1% (p/v), contendo brometo de etídio (0,5 mg/ μ L). Canaletas: 1. Padrão de tamanho molecular (1 Kb DNA Ladder – FERMENTAS); 2. controle positivo (DNA genômico *R. tropici*) de amplificação do produto de PCR correspondente ao gene *exoZ*; 3 e 5. DNA plasmidial referente ao plasmídeo pGem-T EXOZ; 4 e 6. padrão esperado de restrição com enzima *EcoRI* dos clones positivos, contendo região do genoma de *R. tropici* com o gene *exoZ*; 7. DNA plasmidial referente ao plasmídeo *pexoZKan*; 8. padrão esperado de restrição com enzima *EcoRI* do plasmídeo *pexoZKan* com inserção do elemento *EZ::Tn5* dentro do gene *exoZ*.

A figura 10, apresenta o controle positivo (DNA genômico *R. tropici*) de amplificação do produto de PCR correspondente ao gene *exoZ*. Enquanto que nas canaletas 3 e 5 apresenta o perfil desejado do padrão de restrição com enzima *EcoRI*

do vetor pGEM-T Easy contendo uma região do genoma de *R. tropici* com o gene *exoZ*, confirmando a clonagem do gene de interesse. Sendo estes os DNA plasmidiais (canaletas 2 e 4) selecionados para a reação de inserção do transposon. Desta forma, resultou no plasmídeo *pexoZKan* (canaleta 6), e na canaleta 7 está o fragmento de 2009 pb, o qual corresponde ao padrão esperado de restrição deste plasmídeo (*pexoZKan*) com inserção do elemento *EZ::Tn5* dentro do gene *exoZ*.

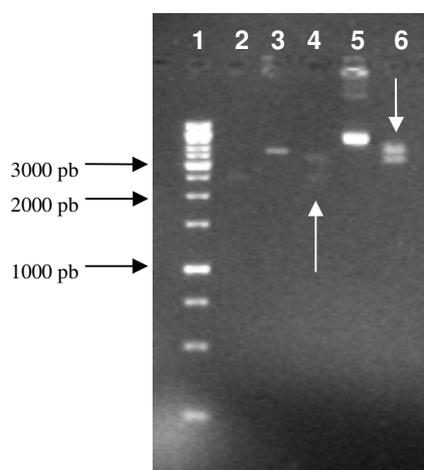


Figura 11. Perfis eletroforéticos dos plasmídeos selecionados *pphbAB* e *pphbABKan* em gel de agarose 1% (p/v), contendo brometo de etídio (0,5 mg/μL). Canaletas: 1. Padrão de tamanho molecular (1 Kb DNA Ladder – FERMENTAS); 2. controle positivo (DNA genômico *R. tropici*) de amplificação do produto de PCR correspondente ao *phbAB*; 3. DNA plasmidial referente ao plasmídeo *pphbAB*; 4. padrão esperado de restrição com enzima *NotI* para os clones positivos, contendo região do genoma de *R. tropici* com o *phbAB*; 5. DNA plasmidial referente ao plasmídeo *pphbABKan*; 6. padrão esperado do padrão de restrição com enzima *NotI* do plasmídeo *pphbABKan* com inserção do elemento *EZ::Tn5* dentro dos genes *phbAB*.

Na figura 11, observa-se o controle positivo (DNA genômico *R. tropici*) de amplificação do produto de PCR correspondente ao *phbAB*, cujo tamanho é de 2300 pb e, com inserção do elemento *EZ::Tn5* dentro do *phbAB* resultou em um fragmento de 3521 pb, o que era esperado para o padrão esperado de restrição com enzima *NotI* do plasmídeo *pphbABKan*.

7. Seleção dos mutantes obtidos através da mutagênese insercional por transposição *in vitro*.

A eletrocompetência celular da estirpe SEMIA 4080 foi conseguida pela coleta das células em fase de crescimento exponencial seguida por sucessivas lavagens que visaram à remoção de íons e impurezas do meio extracelular. Todavia, estas células foram capazes de receber os fragmentos de DNA exógeno através de poros temporariamente formados na membrana celular, induzidos por um pulso elétrico de alta voltagem.

Depois da transformação da bactéria *Rhizobium tropici* SEMIA 4080, a inserção do transposon foi evidenciada primeiramente pela resistência a canamicina e, posteriormente pela PCR (Figura 12) e seqüenciamento dos produtos de amplificação.

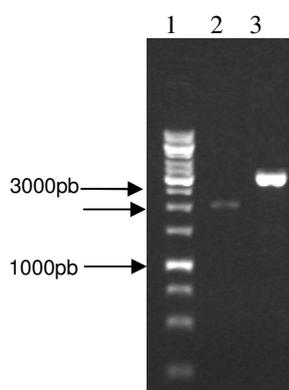


Figura 12. Perfil eletroforético dos produtos de PCRs para o gene *exoZ* e *phbAB* após a recombinação homóloga, em gel de agarose 1% (p/v), contendo brometo de etídio (0,5 mg/ μ L). linha 1: Padrão de tamanho molecular (1 Kb DNA Ladder – FERMENTAS); linha 2: *exoZ* com transposon (2009 pb = 788 + 1221); linha 3: *phbAB* com transposon (3521 pb = 2300 + 1221).

A caracterização dos mutantes de acordo com o tipo de recombinação se deu pela resistência a antibióticos. Mutantes cultivados em meio contendo ampicilina e canamicina seriam caracterizados pela simples recombinação, indicando assim, além da presença do gene mutado, a presença do vetor integrado ao DNA cromossômico,

uma vez que a resistência a ampicilina é característica do vetor. No entanto, não foi observado crescimento bacteriano na presença dos dois antibióticos, indicando assim, a não ocorrência de simples recombinação homóloga e nem estabilidade do plasmídeo no interior da bactéria. A dupla recombinação foi caracterizada de acordo com a resistência dos mutantes à canamicina, indicando que o gene nativo fora substituído pelo gene mutado e o vetor desintegrado. O perfil de resistência a antibióticos observados possibilitou a seleção de mutantes gerados pelo mecanismo molecular de dupla recombinação e o sucesso da mutagênese foi confirmado por ensaios moleculares de PCR e sequenciamento desses produtos de PCR.

Através da amplificação do fragmento de interesse foi então possível determinar a mutação presente nestas estirpes de maneira mais rápida, simples e segura do que o método de hibridização com sondas radioativas. A comparação entre os produtos de PCRs para o gene *exoZ* e *phbAB* das bactérias mutantes (Fig. 12) e selvagem (Fig.8) permitiu observar que em relação ao gene *exoZ* com uma inserção da seqüência do transposon, resultou em um fragmento de 2009 pb, sendo a soma do tamanho do gene 788 pb e o tamanho do transposon de 1221 pb e, em relação ao *phbAB* com transposon resultou em um fragmento de 3521 pb (2300 + 1221) confirmando, assim, a ocorrência da recombinação homóloga entre os genes selvagens e mutados.

8. Comparação entre os fenótipos

Na figura 13 é possível observar que tanto a estirpe selvagem como os mutantes produziram colônias mucosas quando cultivadas em placas de Petri contendo meio PSAY sólido suplementado com corante Vermelho Congo. O aspecto mucoso dos mutantes 4080ΩZ03 e 4080ΩPhb7 aparentou ser mais firme quando comparada a sua estirpe selvagem. Sendo que esta última apresenta uma goma mais “líquida”, podendo coalescer por toda a placa de Petri. Enquanto que, na Figura 14 nota-se a estirpe selvagem e seus mutantes cultivados em meio sólido PSY adicionado um corante epifluorescente com comprimento de emissão de 430 nm (calcofluor bright 28 – SIGMA) na concentração final de 200 µg/mL.



Figura 13. Estirpe selvagem de *R. tropici* SEMIA4080 e mutantes 4080ΩZ03 e 4080ΩPhb7 cultivados em placas de Petri contendo meio PSAY sólido suplementado com corante Vermelho Congo visualizados sob luz branca. Estas bactérias foram cultivadas por 24 h a 30 °C.

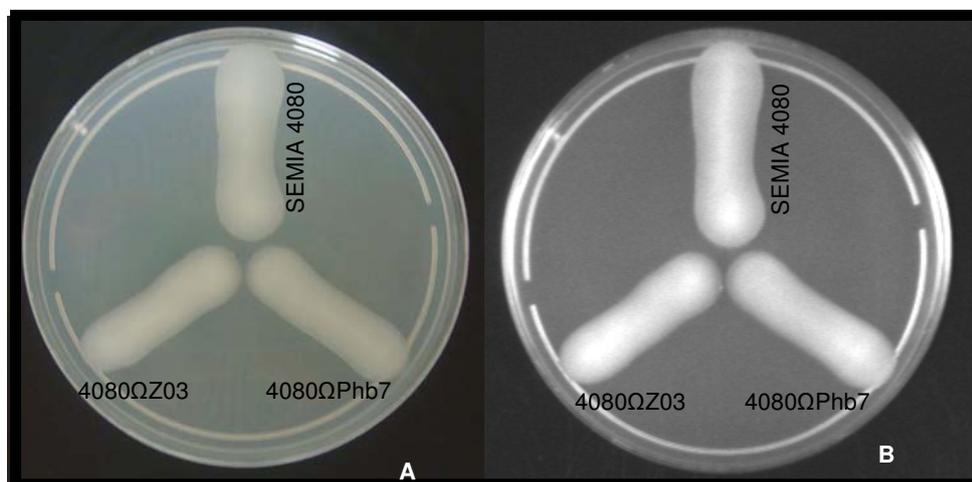


Figura 14. Estirpe selvagem de *R. tropici* SEMIA4080 e mutantes 4080ΩZ03 e 4080ΩPhb7 cultivados em placas de Petri contendo meio PSAY sólido adicionado um corante epifluorescente (calcofluor bright 28 – SIGMA) na concentração final de 200 µg/ml, visualizados sob luz branca (A) e luz UV (B). Estas bactérias foram cultivadas por 24 h a 30 °C.

Como o corante fluorescente é específico para polissacarídeos que contém ligações do tipo β -1 \rightarrow 4 ou β -1 \rightarrow 3 (WOOD, 1980), nota-se que o mutante 4080 Ω Z03 produz maior quantidade de material *Calcofluor-binding* em relação a estirpe selvagem e ao mutante 4080 Ω Phb7 (Figura 14).

A produção de polissacarídeos microbianos pode ser influenciada por fatores físicos e químicos, como temperatura, fonte de carbono, fonte de nitrogênio, aeração, agitação e a presença de micro elementos. A escolha da espécie de rizóbio também interfere na produção (CASTELLANE 2004; CASTELLANE, 2007). Muitos microrganismos produtores de polissacarídeos respondem de maneira diferente a esses fatores de crescimento e para alguns, a fonte de carbono é a principal determinante da quantidade do polissacarídeo formado (CAMPANHARO, 2006; CASTELLANE, 2007).

Os mutantes obtidos e a estirpe selvagem foram cultivados em sacarose comercial como única fonte de carbono. Esta fonte de carbono apresenta baixo custo e fácil aquisição, e também por já ter apresentado resultados satisfatórios na produção de exopolissacarídeo por estirpes pertencentes a espécie *R. tropici* (CASTELLANE, 2007). As estirpes do gênero *Rhizobium* são de crescimento rápido e utilizam uma série de carboidratos como fontes de carbono, tais como: pentoses, hexoses, polióis, ácidos orgânicos, dissacarídeos e polissacarídeos (MONZA et al., 1992 citado por VICARI, 1992). Crescimento em meio contendo carboidrato é usualmente acompanhado pela produção de goma (JORDAN, 1984).

9. Avaliação da produção de EPS

Campanharo (2006) realizou ensaios com a finalidade de definir o reagente mais adequado para a recuperação de EPS e observou que a solução de cetramida 1% a 4°C (0,3 volumes) foi a mais eficiente em recuperar o EPS em todas as amostras avaliadas, entretanto, toda a pigmentação amarela do extrato de levedura restante do cultivo também foi precipitada. CASTELLANE (2007) analisou os constituintes não carboidratados na composição do EPS bruto, precipitado com etanol anidro (1:3; v/v), aplicando-se o método espectroscópico no Infravermelho com

Transformada de Fourier (FTIR) e os resultados evidenciaram que o uso do solvente etanol anidro mostrou-se eficiente, uma vez que todos os sinais observados eram característicos de sacarídeos parcialmente esterificados e sem presença de impureza de proteínas. Deste modo, o método de recuperação adotado neste trabalho foi o mesmo descrito por CASTELLANE & LEMOS (2007).

Com a mistura rápida do etanol e o sobrenadante, a precipitação foi imediata, e com o auxílio de um bastão de vidro foi possível coletar praticamente todo o material precipitado (Figura 15). O fato de serem secretados para o meio extracelular confere aos EPS grandes vantagens sob os demais polissacarídeos microbianos, uma vez que estes não necessitam de processos complexos para extração e ao mesmo tempo são livres de contaminantes celulares.



Figura 15. Representação da recuperação do EPS com adição de etanol anidro (1:3; v/v) ao sobrenadante das amostras.



Figura 16. EPS seco e moído.

Para avaliar a produção dos EPS, o volume do frasco foi medido antes de precipitá-lo, e depois foi feita a conversão para g.L^{-1} . A biomassa e os materiais de EPS secos (Figura 16) obtidos foram pesados e, os valores encontrados, estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Produção de exopolissacarídeos e de biomassa celular no meio de cultura por rizóbios selvagem e mutante, e eficiência relativa de produção de EPS.

Microrganismo	Quantidade de EPS	Biomassa	Eficiência relativa
	g.L^{-1}		(EPS/Biomassa)
SEMIA 4080	2,52	1,14	2,21
4080ΩZ03	5,06	0,75	6,75
4080ΩPhb7	3,94	0,71	5,55

FERNANDES JÚNIOR e colaboradores (2009) ao avaliar a diversidade fenotípica de bactérias isoladas de nódulos de três cultivares de guandu, bem como a capacidade desses isolados em produzir exopolissacarídeos, polihidroxibutirato e amilases, observou que as estirpes de *R. tropici*, BR 322 e BR 520, ambas recomendadas para a produção de inoculantes para o feijoeiro comum no Brasil e geneticamente muito próximas, apresentaram produtividade e capacidade de crescimento diferenciados, e produção de EPS: 1,13 e 1,89 g L^{-1} , respectivamente, quando cultivadas em meio YML. Enquanto que, a estirpe selvagem de *R. tropici* SEMIA 4080 apresentou 2,52 g l^{-1} , e os mutantes 4080ΩZ03 e 4080ΩPhb7 apresentaram produção de EPS correspondente a 5,06 e 3,94 g l^{-1} , respectivamente, nas condições de cultivos descritas do presente estudo (Tabela 13).

A produção de biomassa celular dos mutantes 4080ΩZ03 (0,75 g L^{-1}) e 4080ΩPhb7 (0,71 g L^{-1}) foi menor em relação à estirpe selvagem (1,14 g L^{-1}). Geralmente, a produção do polímero é inversamente proporcional à taxa de crescimento bacteriano, o que sugere uma regulação entre o metabolismo bacteriano

em detrimento ao catabolismo, onde as células em determinado ponto de sua curva de crescimento não investem em esqueletos de carbono para o crescimento, em detrimento da atividade metabólica das células.

De acordo com KUMARI et al. (2009) a produção de EPS por isolados de rizóbio utilizados para a produção de inoculantes pode variar de acordo com as características fenotípicas e genéticas de cada isolado. A produção de EPS pode ser elevada para isolados de rizóbio utilizados em inoculantes para indigófera na África, porém pode ser reduzida para os rizóbios recomendados para outras espécies. A produção de EPS por estirpe de *Rhizobium tropici* e seus mutantes variou muito no presente estudo. Ao avaliar a eficiência relativa na produção de EPS, dada pela relação entre o total de EPS e a biomassa celular, houve destaque para o mutante 4080ΩZ03 (6,75), seguido do mutante 4080ΩPhb7 (5,55) e por último a estirpe selvagem (2,21). Em bactérias, é comum encontrar produção variável de EPS, mesmo em bactérias do mesmo gênero cultivadas nas mesmas condições, conforme demonstrado em *Rhizobium* (KUMARI et al., 2009), *Xanthomonas* (ANTUNES et al., 2003; ROTTAVA et al., 2009) e *Sphingomonas* (BERWANGER et al., 2007), o que está de acordo com os resultados encontrados no presente estudo. Segundo MARGARITI & PACE (1985), obtém-se um alto rendimento quando ocorre a conversão de 70-80% da fonte de carbono utilizada em biopolímero.

A próxima etapa desse trabalho foi determinar a composição monossacarídica de cada um dos EPS. A primeira reação é a hidrólise efetiva dos polímeros que tanto pode ser efetuada por ácido quanto por enzima (PAZUR, 1994) e desta maneira é possível conhecer seus resíduos monossacarídicos.

10. Análises da composição dos exopolissacarídeos.

Os resultados obtidos pela análise dos EPSs da estirpe selvagem de *R. tropici* SEMIA 4080 e seus mutantes 4080ΩZ03 e 4080ΩPhb7, cultivadas em meio de cultura contendo sacarose como fonte de carbono, estão relatadas na Tabela 11.

Tabela 11. Composição dos exopolissacarídeos em monossacarídeos ⁽¹⁾ produzidos pela estirpe selvagem de *Rhizobium tropici* e seus mutantes.

Microrganismo ²	Man	Rha	GlcA	GalA	Glc	Gal
	(µg mL ⁻¹)					
SEMIA 4080	2,0 a	6,0 a	20,0 a	*	129,0 c	75,5 c
4080ΩZ03	2,0 a	7,0 b	*	7,0 a	144,0 a	109,0 a
4080ΩPhb7	3,0 b	6,0 a	*	7,0 a	141,5 b	101,5 b

⁽¹⁾ Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. ⁽²⁾ Estirpes crescidas em meio líquido PSYL, contendo sacarose como fonte de carbono, por 144 horas à 140rpm, a uma temperatura de 29°C ±1. * traços, ou seja, quantidade abaixo do limite de detecção do detector UV-visível. Abreviações: Man, manose, Rha, ramnose, GlcA, ácido glicurônico, GalA, ácido galacturônico, Glc, glicose, Gal, galactose.

A partir desses resultados é possível afirmar que os EPS dos microrganismos são heteropolímeros, tendo em sua composição açúcares neutros (manose, ramnose, glicose e galactose), e açúcares ácidos (ácido glicurônico e galacturônico) em diferentes concentrações.

Os biopolímeros dos microrganismos consistiram predominantemente da presença de galactose e glicose (Tabela 11). Entretanto, os mutantes 4080ΩZ03 e 4080ΩPhb7 apresentaram quantidades pequenas de manose, ramnose e ácido galacturônico com traços de ácido glicurônico, enquanto que, o EPS produzido pela estirpe selvagem SEMIA 4080 contém quantidades pequenas de manose, ramnose e ácido glicurônico com traços de ácido galacturônico (Tabela 11). Recentemente, STAEHELIN *et al.* (2006) analisando o EPS de *Rhizobium* sp. estirpe NGR234 também encontraram uma quantidade muito pequena de ácido glicurônico nas amostras. A presença de monossacarídeos ácidos (ácido glicurônico e galacturônico), mesmo em baixa concentração, torna o EPS mais acidificado e o seu acúmulo faz com que o heteropolissacarídeo fique altamente aniônico e, assim, podem atuar como resinas de troca iônica, concentrando minerais e nutrientes ao redor da célula (WHITFIELD, 1988). A presença de ácidos glicurônico e pirúvico na goma xantana, confere ionicidade à mesma, promovendo alterações na conformação molecular e aumentando a solubilidade de suas soluções (DIAZ *et al.*, 2004).

O monossacarídeo manose foi encontrado na mesma concentração de $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ nas amostras de EPS produzidos pelo mutante 4080 Ω Phb7 e a estirpe selvagem SEMIA 4080, enquanto que no EPS produzido pelo mutante 4080 Ω Z03 está concentração foi de $3,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. MANDAL et al. (2007), avaliaram a composição de EPS de rizóbio isolado de mungo verde (*Vigna mungo*), e sugeriram a presença do pentassacarídeos Manose4-Ribose1, como monômeros de um EPS de peso molecular aproximado de 750 kDa.

A ramnose é considerada um monossacarídeo característico do LPS. Embora, STREETER (1999) tenha observado que polissacarídeos extracelulares produzidos em nódulos que se diferenciavam dos demais EPSs pela presença da ramnose. Sugere-se que a presença desse açúcar seja uma característica desejável, pois, em geral, os polímeros dos quais faz parte possuem capacidade de formar géis verdadeiros (MCNELLY & KANG, 1977). E em relação a este monossacarídeo o teor encontrado variou de $6,0-7,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ nos EPSs produzidos pelos microrganismos.

Assim, a estrutura de EPS de rizóbios de diferentes origens pode auxiliar a explicar as peculiaridades de adaptação que as espécies rizobianas apresentam aos seus ambientes.

11. Comportamento reológico das soluções formadas pelos exopolissacarídeos produzidos pelos microrganismos.

De acordo com SAUDE e colaboradores (2002), para que os polissacarídeos possam ser aplicados na indústria há necessidade que algumas informações sobre estrutura química e características físico-químicas, sejam previamente conhecidos. Entre as metodologias adotadas na caracterização dos EPS, a avaliação reológica destaca-se por fornecer informações a respeito da estrutura molecular e é importante na determinação da aplicabilidade biotecnológica desses biopolímeros (KACI et al., 2005).

Além disso, as medidas reológicas possibilitam a caracterização de polímeros em soluções e géis, fornecendo dados importantes para o desenvolvimento dos processos tecnológicos, para o controle de qualidade das matérias-primas e produtos

padronizados e para a determinação de dados na pesquisa e desenvolvimento de um material específico (TOSIN, 2008).

Os biopolímeros bacterianos são capazes de formar soluções viscosas e géis em meio aquoso, mesmo em baixas concentrações. Segundo STADING (1988), não existe outra categoria de substâncias que exiba esse comportamento. Dos parâmetros que interferem na viscosidade dos polímeros, pode-se citar o tipo de estrutura molecular e concentração de polímero. Para a avaliação das propriedades reológicas dos biopolímeros para a utilização como possíveis viscosificantes em fluídos de perfuração para prospecção de petróleo, as amostras após serem moídas foram dispersas em água destilada em duas concentrações diferentes ($5,0 \text{ g l}^{-1}$ e $10,0 \text{ g l}^{-1}$).

A curva de fluxo, definida a partir das medidas de tensão de cisalhamento (t) x taxa de deformação ou taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$), permite verificar o comportamento de fluxo das soluções polissacarídicas. A partir da construção do reograma é possível estabelecer se um líquido apresenta comportamento de fluxo Newtoniano ou não-Newtoniano, em determinadas condições de tensão ou taxa de deformação. Um líquido Newtoniano é representado, graficamente, por uma reta com início na origem da curva de fluxo. Os que não exibem esse comportamento são chamados não-Newtonianos. A análise dos reogramas com diferentes concentrações poliméricas permite evidenciar a transição de um comportamento Newtoniano para não-Newtoniano (SCHRAMM, 2006). Na Figura 17 são apresentadas as curvas de viscosidade em função da taxa de cisalhamento para as amostras analisadas, na temperatura de 25°C .

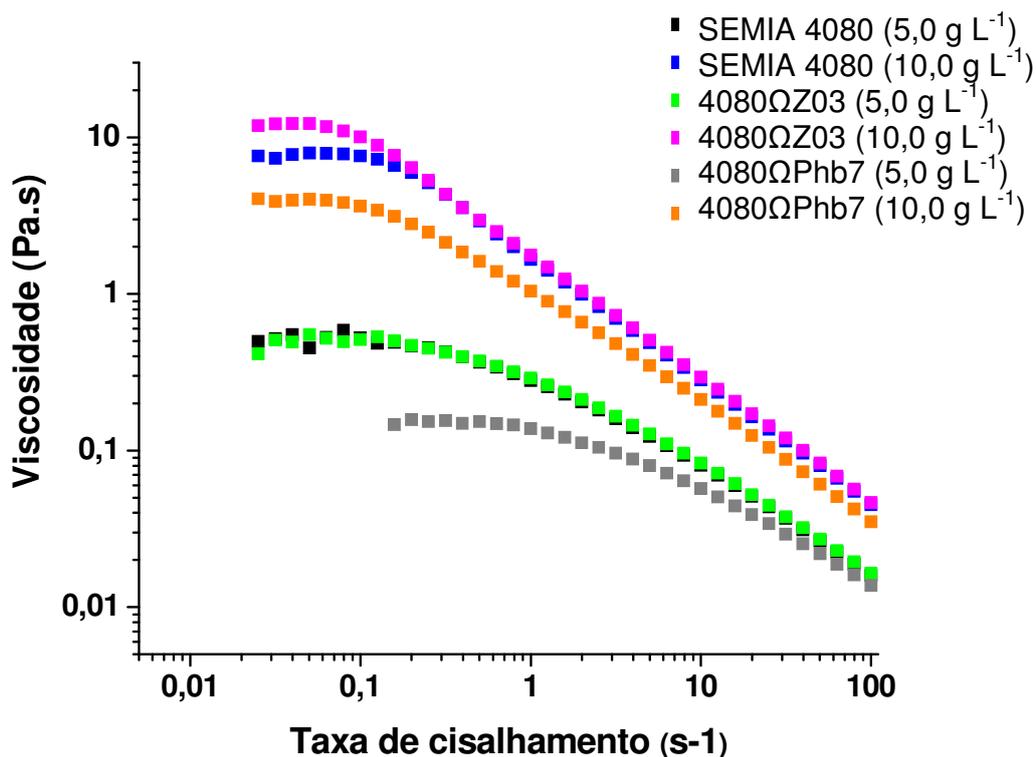


Figura 17. Viscosidade em função da taxa de cisalhamento para as amostras analisadas, a 25 °C.

Observou-se, também, influência da concentração de EPS sobre a viscosidade aparente das soluções aquosas. A viscosidade da solução aquosa de um polissacarídeo está diretamente relacionada com a rigidez de sua molécula que, por sua vez, depende da sua estrutura, principalmente primária e secundária, a qual está diretamente relacionada à bactéria utilizada e às condições operacionais do processo (BRADSHAW et al., 1983). Os resultados demonstram que as amostras referentes ao material produzido pela estirpe selvagem SEMIA 4080 e o seu mutante 4080ΩZ03 apresentam um comportamento viscoso semelhante em ambas as concentrações avaliadas, ou seja, de 5,0 g L⁻¹ e 10,0 g L⁻¹. No caso da amostra de EPS produzido pelo mutante 4080ΩPhb7, na concentração de 5,0 g L⁻¹ de EPS em solução, devido à sua baixa viscosidade nesta concentração, o equipamento só teve sensibilidade para registrar os pontos em taxas superiores a 0,1 s⁻¹, e os resultados difere das demais e apresentou os menores valores de viscosidade.

Os grupos acetila e outros substituintes não açúcares podem alterar grandemente as propriedades físicas, assim como conferir carga ao

exopolissacarídeo. Na ausência de tais cargas as macromoléculas podem ser insolúveis, contudo, dependem das ligações estruturais. O piruvato e o acetato influenciam a transição e estabilização ou desestabilização da conformação ordenada, respectivamente. Grupos acetila geralmente impedem a associação sinérgica e sua remoção produz polímeros geleificantes em concentrações baixas (SUTHERLAND, 1998). Esta seria a explicação a respeito da propriedade reológica do biopolímero produzido pelo transformante de rizóbio que teve mutação no seu gene *exoZ*, o qual codificada uma acetil transferase, para apresentar maior viscosidade em função da taxa de cisalhamento no início da curva.

A partir da construção do reograma (Figura 17) foi possível observar um comportamento de fluxo de líquidos pseudoplástico para os três exopolissacarídeos estudados. O aumento da tensão de cisalhamento a partir do aumento da taxa de deformação caracteriza-os como fluidos pseudoplásticos. Estudos sobre avaliação de EPS de isolados de rizóbio têm demonstrado que esses biopolímeros geralmente apresentam comportamento não newtoniano e pseudoplástico (Kaci et al., 2005; Aranda-Selverio et al., 2010). As amostras estudadas obtiveram o mesmo comportamento da goma Xantana, que é considerada um polissacarídeo de referência, podendo formar gel elástico e termorreversível quando combinado com a goma locusta. Altas viscosidades de Xantana são encontradas quando combinadas com a goma guar. A goma xantana é completamente solúvel em água gelada ou quente, produz altas viscosidades a baixas concentrações e apresenta excelente estabilidade ao calor e variações do valor de pH.

Resultados semelhantes aos obtidos por CAMPANHARO (2006), que evidencia um comportamento pseudoplástico para as soluções dos EPS produzidos pelos isolados de *Phaseolus vulgaris*, *Leucaena leucocephala v. cunnie*, *Pisium sativum* e *Arachis pintoe*, e as soluções formadas pelo EPS, produzido por três diferentes linhagens de bactérias do gênero *Rhizobium*, apresentaram comportamento de fluxo de líquidos não-Newtonianos (Aranda-Selverio et al., 2010). A diminuição no crescimento da tensão com o aumento da taxa de cisalhamento, resultando em menor viscosidade aparente, caracteriza as soluções como fluidos pseudoplásticos (NAVARRO, 1997).

KACI e colaboradores (2005) isolaram e identificaram um EPS produzido por uma estirpe de *Rhizobium*, de solos áridos, como um polímero formado por glucose,

galactose e ácido manurônico na proporção molar de 2:1:1. Análises reológicas mostraram que as soluções do polissacarídeo têm comportamento de fluido pseudoplástico, sendo utilizado como agente espessante, com propriedades polieletrólíticas.

Soluções formadas pelo EPS 450, produzido pelo *Bacillus* sp, também apresentam comportamento pseudoplástico assim como várias outras soluções de polissacarídeos microbianos (ROTTAVA, 2005).

Contudo, apesar do comportamento pseudoplástico, a viscosidade de soluções de EPS de diferentes estirpes de rizóbios pode variar em uma mesma taxa de cisalhamento (ARANDA-SELVERIO et al., 2010), o que sugere diferentes aplicações biotecnológicas a esses biopolímeros.

A descrição do comportamento reológico dos materiais pode ser feita através de modelos que relacionam como a tensão de cisalhamento varia com a taxa de deformação. Dentre os modelos matemáticos existentes, alguns dos mais utilizados para os sistemas de alimentos são Ostwald-De-Waele (Lei da Potência), Casson, Herschel-Bulkley e Mizrahi-Berki. Os dois primeiros utilizam equações matemáticas com dois parâmetros e os demais com três parâmetros (HAMINIUK et al., 2006). Para as soluções formadas pelos exopolissacarídeos produzidos pela estirpe selvagem de *R. tropici* SEMIA 4080 e mutantes 4080QZ03 e 4080QPhb7, nas concentrações de 5 e 10 g L⁻¹, a uma temperatura de 25°C, o modelo de Ostwald-De-Waele proporcionou os melhores ajustes (Tabela 12). A Tabela 12 mostra os dados relativos ao comportamento viscosimétrico das amostras, com os valores das constantes K (índice de consistência) e n (índice de lei das potências).

O valor de n é uma medida da “pseudoplasticidade” do polímero (BRETAS & D’ÁVILA, 2005). O desvio de “n” da unidade indica o grau de desvio do comportamento newtoniano, sendo que, se $n < 1$ o comportamento é pseudoplástico e, se $n > 1$, dilatante (TONELI et al., 2005). Portanto, as soluções polissacarídicas estudadas neste trabalho apresentaram $n < 1$, indicando comportamento pseudoplástico (Tabela 12).

Tabela 12. Valores de consistência e do índice de lei das potências medidos para cada uma das amostras.

Amostra	Concentração		
	(g/L)	K (Pa.s ⁿ)	n
SEMIA 4080	5,0	0,29	0,41
SEMIA 4080	10,0	1,71	0,22
4080ΩZ03	5,0	0,30	0,40
4080ΩZ03	10,0	1,77	0,22
4080ΩPhb7	5,0	0,17	0,48
4080ΩPhb7	10,0	1,03	0,29

É possível, ainda, observar a partir do índice de consistência (K) (Tabela 12) um aumento progressivo da viscosidade conforme se aumenta a concentração das soluções de todos EPS. Nota-se um perfil reológico muito próximo dos biopolímeros produzidos pela estirpe selvagem e mutante 4080ΩZ03 em ambas as concentrações.

Os exopolissacarídeos produzidos pelos diferentes mutantes de bactérias da espécie *R. tropici*, apresentaram diferenças sutis em suas composições monossacarídicas (estrutura primária) em relação a sua estirpe selvagem que, acredita-se, foram suficientes, para promover alterações da estrutura secundária ou conformacional das moléculas. Isso pode ser constatado a partir dos resultados encontrados nas análises reológicas, para cada um dos EPS estudados. Espera-se que os resultados apresentados neste trabalho contribuam com informações que permitam considerar essas macromoléculas e seus respectivos organismos produtores como objetos alvo de futura investigação e aplicação industrial.

12. Efeito da mutação no gene *exoZ* e *phbAB* sobre o processo de formação dos nódulos e a fixação biológica de nitrogênio em *Phaseolus vulgaris* L. inoculados com a estirpe selvagem e mutantes de *R. tropici* SEMIA 4080.

R. tropici forma nódulos do tipo determinado em feijoeiro e indeterminado em leucena (*Leucaena leucocephala*). Todo este controle por conta da planta hospedeira indica que a mesma possui a informação genética para a infecção e nodulação, e a bactéria o papel colocar toda esta programação simbiótica em funcionamento. Uma

série de estudos anteriores tem sugerido que a síntese de EPS é necessária para uma nodulação eficaz em hospedeiros com nódulos indeterminados, mas não é necessário para nodulação eficaz dos nódulos determinados. Os resultados dos ensaios de nodulação e eficiência de fixação de N dos microrganismos estudados estão apresentados na Tabela 13.

Os nódulos se concentraram no ponto de aplicação do inóculo, próximo ao colo das plantas, na raiz principal e, o este procedimento tanto com *R. tropici* bem como com os mutantes proporcionaram boa nodulação, uma vez que STRALIOTTO (2002) relata que uma boa atividade do rizóbio ocorre quando houver a formação de pelo menos 10 a 20 nódulos por planta. Os tratamentos com a estirpe selvagem SEMIA 4080 e o mutante 4080ΩPhb7 não diferiram entre si, apresentando 197,25 e 193,25 números de nódulos por planta, respectivamente (Tabela 13). Ao avaliar a nodulação e a fixação do nitrogênio em feijão-caupi, guandu e feijão de porco em condições de casa de vegetação, FERNANDES e colaboradores (2003) também avaliaram que alguns dos isolados selecionados apresentaram nodulação estatisticamente igual àquela apresentada pelas estirpes recomendadas.

Tabela 13. Número de nódulos (NN), massa seca dos nódulos (MSN), Teor de nitrogênio na biomassa seca da parte aérea (N) e índice de efetividade simbiótica (EFRA) de feijão cultivar IAC-Carioca inoculado com estirpe selvagem e mutadas de rizóbio, na ausência de inoculação (testemunha) e com aplicação de N mineral, cultivada em vasos plásticos contendo substrato estéril.

Tratamentos	Parâmetros			
	NN	MSN	N	EFRA
	n° nod planta ⁻¹	mg planta ⁻¹	%	%
SEMIA 4080	197,25 a	52,47 a	1,91 b	48,94 b
4080ΩZ03	162,75 b	36,70 bc	1,72 bcd	43,99 bcd
4080ΩPhb7	193,25 a	32,60 c	1,59 cd	40,89 cd
T s/Ino s/N	-	-	1,53 d	39,28 d
T s/Ino c/N	-	-	3,90 a	100,00 a
C. V.	8,01	18,40	5,80	5,78

* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. CV = coeficiente de variação.

Os EPS de membrana, que não são exsudados no meio e são aderidos à face externa da membrana plasmática, desempenham a função de proteger as células bacterianas dos danos causados pelos mecanismos de defesa além de ser capaz de proporcionar o papel de reconhecimento da célula bacteriana pelo vegetal (MORGANTE et al., 2005; MORGANTE et al., 2007). Rizóbios deficientes na capacidade de produzir EPS de membrana apresentam baixa capacidade de infectar o hospedeiro, além de serem mais susceptíveis aos danos celulares causados pelos mecanismos de defesas vegetais (MORGANTE et al., 2007). Conforme demonstrado anteriormente, o mutante 4080ΩZ03 foi capaz de produzir EPS abundantemente. Sabe-se que este material é secretado no meio extracelular envolvendo as células e as protegendo de dessecação e estresses ambientais (SUTHERLAND, 1998), porém, este mutante gerou um menor número de nódulos.

Os resultados obtidos por GONZALÉZ et al. (1996) demonstraram que mutantes de *S. meliloti* que eram incapazes de produzir um EPS (conhecido com EPS II), não eram capazes de infectar a *Medicago sativa*. WANG et al. (2008) avaliando diversas linhagens de mutantes obtidos através da inserção do transposon Tn5, em *Mesorhizobium tianshanense*, demonstraram que as linhagens incapazes de produzir EPS abundantemente também não formavam biofilme e não eram capazes de nodular a sua hospedeira de origem.

Ao avaliar a matéria seca dos nódulos, observou-se que a estirpe selvagem SEMIA 4080 apresentou uma massa de matéria seca nodular de 52,47 mg por planta, diferindo-se estatisticamente das estirpes mutantes 4080ΩZ03 (36,70 mg planta⁻¹) e 4080ΩPhb7 (32,60 mg planta⁻¹). Por sua vez, estas não diferem entre si. É interessante ressaltar que o mutante 4080ΩPhb7 apresentou o mesmo número de nódulos por planta obtidos pela estirpe selvagem SEMIA 4080, porém, obteve a metade da massa de matéria seca dos nódulos em relação a esta estirpe. Neste mutante ocorreu a mutação de dois genes, o *phbA* e *phbB*, envolvidos na síntese do PHB, o impossibilitando de produzir reservas de PHB para serem utilizados durante o processo de FBN. Entretanto, experimentos realizados com *S. meliloti* mutantes incapazes de produzir PHB demonstraram a capacidade de nodular eficientemente as hospedeiras e estabelecer a simbiose efetiva (WILLIS & WALKER, 1998).

A produção de PHB pelas bactérias está diretamente relacionada com o potencial redox da célula. Nos nódulos, a concentração de O₂ é muito reduzida, o que

diminui o potencial redox, favorecendo a produção de PHB. Isso ocorre, porque em condições microaerófilas, há o aumento da concentração celular de NAD(P)H o que resulta na inibição por feedback das enzimas Citrato Sintase e Isocitrato Desidrogenase do ciclo do ácido tricarboxílico, resultando no carreamento da Acetil-CoA para síntese de PHB (STAM et al., 1986).

Experimentos realizados com *R. etli* mutantes, incapazes de produzir a enzima ceto-acil-CoA thiolase, devido a uma mutação no gene *phbA*, apresentam um período maior de atividade da nitrogenase, comparado com a estirpe não mutante (CEVALLOS et al., 1996). HAHN et al. (1984), já havia reportado que bacteróides de *B. japonicum* mutantes em três genes *nif* (*nifD*, *nifK* e *nifH*) apresentaram maior produção de PHB do que a estirpe não mutante. Porém esses resultados não são corroborados por estudos mais recentes onde um mutante de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, incapaz de sintetizar a enzima PHB polimerase, não apresentou alterações da capacidade FBN, quando comparada com a estirpe não mutante (LODWIG et al., 2005).

Outro estudo recente avaliou a capacidade de *S. meliloti* mutante no gene *phbC* em nodular e fixar nitrogênio em *Medicago sativa* e em *M. truncatula*. Os autores observaram que o silenciamento do gene *phbC* resultou em redução da nodulação em ambas as espécies, comparando com a estirpe selvagem, porém maior redução da nodulação foi observada em *M. truncatula* se comparada com *M. sativa*. A FBN influenciada negativamente em nódulos mais jovens de *M. truncatula* e em nódulos mais velhos de *M. sativa* (WANG et al., 2007), indicando haver uma interação entre a produção de PHB pelo bacteróide e o genótipo da planta hospedeira.

As reservas de PHB em bacteróides em nódulos de crescimento determinado podem representar uma reserva de carbono importante para a volta ao ambiente "solo", após um período de intensa atividade bioquímica nos nódulos, o que não ocorre com os bacteróides em nódulos de crescimento indeterminado (DENISON, 2000).

De acordo com essas observações, conclui-se que os mutantes tiveram alterações da capacidade FBN, quando comparada com a estirpe não mutante, uma vez que os dados dos teores de nitrogênio nas folhas variaram bastante, desde 1,53 a 3,90% (Tabela 13). O teor de nitrogênio da parte aérea obtidos por estirpes de *R. tropici*, quando inoculadas no cultivar de feijão Carioca, mostram que, em geral, os

tratamentos inoculados com estirpe selvagem e mutantes apresentaram comportamento bem heterogêneo, tendo a estirpe SEMIA 4080 se destacado ente as demais porém não se diferenciando estatisticamente da estirpe mutada 4080ΩZ03.

Altos teores de N com adubação mineral são esperados. Teores mais altos foram reportados por NEVES et al. (2009). FERNANDES et al. (2003) consideraram que o teor de N acumulado pelas plantas inoculadas com estirpes eficientes, superior ao das plantas sem inoculação, tem origem na FBN. As espécies da família Leguminosae têm a capacidade de fixar biologicamente o N e as bactérias podem fornecer à planta de 60 a 100% de suas necessidades de N (COSTA JÚNIOR, 1997).

Os índices de eficiência relativa obtidos por estirpes de *R. tropici* e os mutantes, quando inoculadas no cultivar de feijão IAC-Carioca, variaram de 40 a 48,94 %. Em geral, os tratamentos inoculados com estirpe original e mutantes apresentaram comportamento bem heterogêneo, tendo a estirpe SEMIA 4080 apresentado maior eficiência relativa em relação aos seus variantes.

Neste trabalho verificou-se que a estirpe selvagem 4080 como os mutantes apresentaram o fenótipo Fix+, induziram nódulos com coloração rósea, apresentando nodulação efetiva no feijoeiro e fixando N. Por outro lado, diversos estudos mostraram que na espécie *S. meliloti*, os nódulos induzidos por mutantes não produtores de EPS são pequenos, contêm poucos ou nenhum bacteróides, e são incapazes de fixar nitrogênio (BECKER & PÜHLER, 1998; MOREIRA et al., 2000). Esta importância do biofilme para a infecção e formação de nódulos já era conhecida e teve a sua integração com o processo de FBN mais bem entendido após a recente demonstração de que estirpes de rizóbio mutantes nos genes *nod* são incapazes de formar biofilme “*in vitro*” e “*in vivo*” (FUJISHIGE et al., 2008).

VI. CONCLUSÕES

- Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que os parâmetros utilizados para introdução de DNA exógeno por transformação de *R. tropici*, já bem estabelecidos para outras bactérias, se mostraram satisfatórios.
- Os mutantes de rizóbio apresentam diferenças na produção e na eficiência relativa da produção de exopolissacarídeos.
- Os resultados encontrados indicam que os diferentes mutantes de um mesmo microrganismo produzem soluções polissacarídicas com propriedades reológicas (comportamento de fluxo e viscosidade) distintas.
- A estirpe selvagem e todos os mutantes induziram a formação de nódulos em feijoeiro, desta forma os genes *exoZ* e *phbAB* não influenciaram nos processos de infecção e formação nodular, mas sim para a fixação biológica de nitrogênio.

VII. REFERÊNCIAS

- ANTUNES, A.E.C.; MOREIRA, A.S.; VENDRUSCOLO, J.L.S.; VENDRUSCOLO, C.T. Screening of *Xanthomonas campestris* pv pruni strains according to their production of xanthan and its viscosity and chemical composition. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.6, p.317-322, 2003
- ARANDA-SELVERIO, G.; PENNA, A.L.B.; CAMPOS-SÁS, L.F.; SANTOS JÚNIOR, O. dos; VASCONCELOS, A.F.D.; SILVA, M. de L.C. da; LEMOS, E.G.M.; CAMPANHARO, J.C.; SILVEIRA, J.L.M.S. Propriedades reológicas e efeito da adição de sal na viscosidade de exopolissacarídeos produzidos por bactérias do gênero *Rhizobium*. **Química Nova**, v.33, p.895-899, 2010.
- ARNOLD, W.; BECKER, A.; KELLER, M.; ROXLAU, A.; PÜHLER, A. The role of *Rhizobium meliloti* surface polysacharides in the infection of *Medicago sativa* nodules. **Endocytobiosis and Cell Research**, Tuebingen, v.10, p. 17-28, 1994.
- BARBOSA, A.M.; CUNHA, P.D.F.; PIGATTO.M.M.; CORRADI DA SILVA, M.L.. Produção e aplicação de exopolissacarídeos fúngicos. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v.25, n.1, p29-42, 2004.

- BECKER, A.; PÜHLER, A. Production of exopolysaccharides. In: SPAINK, H.P.; KONDOROSI, A.; HOOYKAAS, J.J. (Eds.). **The Rhizobiaceae**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998. p. 97-118.
- BECKER, A; KLEICKMANN, A; ARNOLD, W; PÜHLER, A. Analysis of the *Rhizobium meliloti* *exoH/exoK/exoL* fragment: ExoK shows homology to excreted endo-beta-1, 3-1, 4-glucanases and ExoH resembles membrane proteins. **Mol Gen Genet**. v.238, p.145-154, 1993.
- BERINGER, J.E. R factor Transfer in *Rhizobium leguminosarum*. **Journal of General Microbiology**, v.84, p.188-198, 1974.
- BERWANGER, A.L. da S.; SCAMPARINI, A.R.P.; DOMINGUES, N.M.; VANZO, L.T.; TREICHEL, H.; PADILHA, F.F. Produção de biopolímero sintetizado por *Sphingomonas capsulata* a partir de meios industriais. **Ciência e Agrotecnologia**, v.31, p.177-183, 2007.
- BILLA, N.; YUEN, K. H.; KHADER, M.A.A.; OMAR, A. Gamma scintigraphic study of the gastrointestinal transit and in vivo dissolution of a controlled release diclofenac sodium formulation in xanthan gum matrices. **International Journal of Pharmaceutics**, v.201, p.109-120, 2000.
- BJORNDAL, H.; ERBING, C.; LINDBERG, B.; FAHRAEUS, G.; LJUGGREN, H. Studies on an extracellular polysaccharide from *Rhizobium meliloti*. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 25: 1281–1286. 1971.
- BRADSHAW, I. J.; NISBET, B. A.; KERR M. H.; SUTHERLAND, I. W. Modified xanthan: its preparation and viscosity. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v.3, p.23-38, 1983.
- BRETAS, R. E. S.; D'ÁVILA, M. A. **Reologia de polímeros fundidos**. 2. ed. São Carlos: EdUFSCar, 2005.
- BUSHBY, H.V.A.; MARSHALL, K.C. Some factors affecting the survival of root nodule bacteria on desiccation. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 9: 143–147. 1977.
- CASTELLANE, T. C. L. & LEMOS, E. G. M. Composição de exopolissacarídeos produzidos por estirpes de rizóbios cultivados em diferentes fontes de carbono. **Pesq. agropec. bras.**, v.42, n.10, p. 1503-1506, 2007.
- CAMPANHARO, J. C. **Produção e avaliação de exopolissacarídeos sintetizados por rizóbios**. 2006. 66f. Tese. (Doutorado em Microbiologia Agropecuária).

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

CASTELLANE, T. C. L. **Análise de polissacarídeos essenciais para a nodulação do feijoeiro por *Rhizobium tropici* cultivados em diferentes fontes de carbono.** 2007. 74f. Dissertação. (Mestrado em Agronomia – Produção Vegetal). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

CASTELLANE, T. C. L. **Composição dos exopolissacarídeos produzidos por diferentes estirpes padrões de rizóbio.** 2004. 95f Monografia (Graduação em Agronomia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

CEVALLOS, M. A.; ENCARNACIÓ, N S.; LEIJA, A.; MORA, Y.; MORA, J. Genetic and Physiological Characterization of a *Rhizobium etli* Mutant Strain Unable To Synthesize Poly- β -Hydroxybutyrate. **Journal of bacteriology**, p.1646–1654, 1996.

CHI, Z. & ZHAO, S. Optimization of medium and cultivation conditions for pullulan production by a new pullulan-producing yeast strain. **Enzyme and Microbial Technology**, 33, 206-211, 2003.

CORRADI DA SILVA , M.L.; MARTINEZ, P.F.; IZELI, N.L.; SILVA, I.R.; VASCONCELOS, A.F.D.; CARDOSO, M.S.; STELUTTI, R.M.; GIESE, E.C.; BARBOSA, A.M. Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas. **Química Nova**, São Paulo, v.29, p.85-92, 2006.

COSTA JÚNIOR, P. F. **Comportamento de leguminosas arbóreas inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares e rizóbio em estéril de argila.** 1997. 64 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, 1997.

CUNHA, M. A. A.; SANTOS, J. C.; GÓMEZ, R. J. H. C.; SILVA, S. S. Goma curdlana: Propriedades e aplicações. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, São Paulo, v. 33, p. 55-61. 2004.

DAK, M.; VERMA, R.C.; JAAFREY, S.N.A. Effect of temperature and concentration on rheological properties of “*Kesar*” mango juice. **Journal of Food Engineering**, Davis, v.80, p.1011–1015, 2007.

DENISON R.F. Legume sanctions and the evolution of symbiotic cooperation by rhizobia. **American Naturalist**, v. 156: 567–576. 2000.

- DIAZ, P.S.; VENDRUSCOLO, C.T.; VENDRUSCOLO, J.L.S. Reologia de xantana: Uma revisão sobre a influência de eletrólitos na viscosidade de soluções aquosas de gomas xantana. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 25: 15-28. 2004.
- DOWNIE, J.A., The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. **FEMS Microbiology Reviews**, v.34, p.150-170, 2009.
- DUNN, M.F.; PUEPPKE, S.G.; KRISHNAN, H.B. The *nod* gene inducer genistein alters the composition and molecular mass distribution of extracellular polysaccharides produced by *Rhizobium fredii* USDA 193. **FEMS Microbiology Letters**, v. 97: 107–102. 1992.
- DUTA, F.P.; FRANCA, F.P. de; LOPES, L.M.D. Optimization of culture conditions for exopolysaccharides production in *Rhizobium* sp. using the response surface method. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.9, p.391-399, 2006.
- FERNANDES JÚNIOR; P.I.; ROHR, T.G.; OLIVEIRA, P.J.; XAVIER, G.R.; RUMJANEK, N.G. Polymers as carriers for rhizobial inoculant formulations. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44. 1184-1190. 2009.
- FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. P. M.; HUNGRIA, M. Selection of indigenous rhizobia to the cowpea, pigeonpea and jackbean crops in the coastal tableland of Sergipe, Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 7, p. 835-842, 2003.
- FINNEGAN, D.J. Eukariotic transposable elements and genoma evolution. **Trends in Genetics**, Kidlington, v.5, p.107-109, 1989.
- FRAYSSE, N.; COUDERC, F.; POINSOT, V. Surface polysaccharide involvement in establishing the *rhizobium*-legume symbiosis. **Eur. J. Biochem.**, v.270, p.1365-1380, 2003.
- FU, D.; O'NEILL, R. A. Monossaccharide composition analysis of oligosaccharides and glycoproteins by high - performance liquid chromatography. **Analytical. Biochemistry**, v. 227, p. 377-384, 1995.
- FUJISHIGE, N.A.; LUM M.R.; DE HOFF P.L.; WHITELEGGE J.P.; FAULL K.F.; HIRSCH A.M.. *Rhizobium* common *nod* genes are required for biofilm formation. **Molecular Microbiology**, v. 67: 504–515. 2008
- GARRITY, G. M., BELL , J. A. & LILBURN, T. (2005). Family VII. Bradyrhizobiaceae fam. nov. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edn, vol. 2 (The Proteobacteria), part C (The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria), p. 438.

Edited by D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley & G. M. Garrity. New York: Springer.

GIBSON, A. H. Evaluation of nitrogen fixation by legumes in the greenhouse and growth chamber. In: ELKAN, G.H. **Symbiotic nitrogen fixation technology**. New York: Marcel Dekker Inc., 1987. p. 321-369.

GONZALÉZ. J.E.; REUHS. B.; WALKER. G.C. Low molecular weight EPS II of *Rhizobium meliloti* allows nodule invasion in *Medicago sativa*, **Proceedings of National Academy of Science of United States of America**, v. 93: 8636–8641. 1996.

GORDON D, ABAJIAN C, GREEN "Consed: A Graphical Tool for Sequence Finishing". **Genome Research** v.8 (3), p.195–202, 1998.

GORRET, N.; RENARD, C.M.G.C.; FAMELART, M.H.; MAUBOIS, J.L.; DOUBLIER, J.L. Rheological characterization of the EPS produced by *P. acidi-propionici* on milk microfiltrate. **Carbohydrate Polymers**, Nova Iorque v.51, p.149-158, 2003.

GRAY, J. X.; B. G. ROLFE. Exopolysaccharide production in *Rhizobium* and its role in invasion. *Molecular Microbiology*, Oxford, v.4, p.1425-1431, 1990.

GRAY, JX; DJORDJEVIC, MA; ROLFE, BG. Two genes that regulate exopolysaccharide production in *Rhizobium* sp. Strain NGR234: DNA sequences and resultant phenotypes. **Journal of Bacteriology**, v.172, p.193-203, 1990.

GUENTAS, L.; PHEULPIN, P.; MICHAUD, P.; HEYRAUD, A.; GEY, C.; COURTOIS, B.; COURTOIS, J. Structure of a polysaccharide from a *Rhizobium* species containing 2- deoxy-_-D-arabino-hexuronic acid. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 332, n.2, p. 167–173, 2001.

HAHN, M.; MEYER, L.; STUDER, D.; REGENSBURGER, B.; HENNECKE, H. Insertion and deletion mutations within the *nif* region of *Rhizobium japonicum*. **Plant Molecular Biology**, v. 3: 159-168, 1984.

HAMINIUK, C.W.I.; SIERAKOWSKI, M-R.; IZIDORO, D.R.; MASSON, M.L. Rheological Characterization of Blackberry Pulp. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v.9, p.291-296, 2006.

HAYWOOD, G.W.; ANDERSON, A.J.; CHU, L.; DAWES, E.A. Accumulation of polyhydroxyalkanoates by bacteria and the substrate specificities of the biosynthetic enzymes. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 60, p. 1046-1047, 1988.

- HELLWEG, C.; PUHLER, A.; WEIDNER, S., The time course of the transcriptomic response of *Sinorhizobium meliloti* 1021 following a shift to acidic pH. **BMC Microbiology**, v.9, p.1-16, 2009.
- HOANG, HH; BECKER, A; GONZALEZ, JE. The LuxR homolog ExpR, in combination with the Sin quorum sensing system, plays a central role in *Sinorhizobium meliloti* gene expression. **J Bacteriol**, v.186, p.5460-5472, 2004.
- HOLLINGSWORTH, R.; SMITH, E.; AHMAD, M.H. Chemical composition of extracellular polysaccharides of cowpea rhizobia. **Archives of Microbiology**, 142: 18–20. 1985.
- HOLMES, P.A. Applications of PHB - a microbially produced biodegradable thermoplastic. **Phys. Technol.**, v.16, p. 32-36, 1985.
- FDA. [http:// www.cfsam.fda.gov/ ~ rdb/opa-g099.html](http://www.cfsam.fda.gov/~rdb/opa-g099.html); acesso em 10/03/2009.
- HUNGRIA, M.; BOHRER, T.R.J. Variability of nodulation and dinitrogen fixation capacity among soybean cultivars. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.31, p.45-52, 2000.
- HUNGRIA, M.; CAMPOS, R. J.; MENDES, I. C. Benefits of inoculation of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with eficiente and competitive rhizobium strains. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 39, p. 88-93, 2003.
- HUNGRIA, M.; PHILLIPS, D.A. Effects of a seed color mutation on rhizobial nod-gene-inducing flavonoids and nodulation in common bean. **Molecular Plant- Microbe Interaction**, Saint Paul, v. 6, p.418-422, 1993.
- JANGZAREK, M.; KUTKOWSKA, J.; SKORUPSKA, A. *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* *rosR* is required for interaction with clover, biofilm formation and adaptation to the environment. **BMC Microbiology**, v.10, p.1-23, 2010.
- JOFRÉ, E.; BECKER, A., Production of succinoglycan polymer in *Sinorhizobium meliloti* is affected by SMb21506 and requires the N-terminal domain of ExoP. **The American Phytopathological Society**, v.22, n.12, p.1656-1668, 2009.
- JORDAN, D.C. *Rhizobiaceae* Conn 1938. In: KRIEG, N.R. & HOLT, J.G. (Eds.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore/London, Williams & Wilkins, 1984. p.235-244.
- KACI, Y.; HEYRAUD, A.; BARAKAT, M.; HEULIN, T. Isolation and identification of an EPS producing *Rhizobium* strain from and soil (Algeria): characterization of its EPS

- and the effect of inoculation on wheat rhizosphere soil structure. **Research in Microbiology**, v.156, p.522-531, 2005.
- KARR, D. B.; WATERS, J. K.; SUZUKI, F.; EMERICH, D. W. Enzymes of the poly-beta-hydroxybutyrate and citric-acid cycles of *Rhizobium japonicum* bacteroids. **Plant Physiology**, v. 75: 1158-1162. 1984.
- KHAN, T.; PARK, J. K.; KWON, J. Functional biopolymers produced by biochemical technology considering applications in food engineering. **Korean Journal of Chemical Engineering**, Nova lorque, v. 24, n. 5, p. 816-826, 2007.
- KIRICHENKO, E.V.; TITOVA, L.V.; YA-KOTS, S. The significance of exometabolites in the formation and operation of soybean-*Rhizobium* symbiosis. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.40, n.5, p.490-493, 2004.
- KOCHER TD & WILSON AC. DNA amplification by the polymerase chain reaction. pp. 187-209 in Essential Molecular Biology, Volume 2. T.A. Brown (ed.) Oxford University Press.
- KOSENKO, L.V.; KHAILOVA, G.F.; KORELOV, V.E. Fiziology Biokhim. Kul's Rast., v.33, n.4, p.347-354, 2001.
- KROL, J. E. MAZUR, A. MARCZAK, M. SKORUPSKA, A. Syntenic arrangements of the surface polysaccharide biosynthesis genes in *Rhizobium leguminosarum*. **Genomics**. v. 89(2), p.237-47, 2007.
- KUMAR, A.S.; MODY, K.; JHA, B. Review article: Bacterial exopolysaccharides – a perception. **Journal of Basic Microbiology**. Wheinhein, v.47, p. 103-107, 2007.
- KUMARI, B.S.; RAM, M.R.; MALLAIAH, K.V. Studies on exopolysaccharide and indole acetic acid production by *Rhizobium* strains from *Indigofera*. **African Journal of Microbiology Research**, v.3, p.10-14, 2009.
- KUYKENDALL (L.D.): Order VI. *Rhizobiales* ord. nov. In: D.J. BRENNER, N.R. KRIEG, J.T. STALEY and G. M. GARRITY (eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, second edition, vol. 2 (The *Proteobacteria*), part C (The *Alpha-*, *Beta-*, *Delta-*, and *Epsilonproteobacteria*), Springer, New York, 2005, p. 324.
- KUYKENDALL, L.D., J.M. YOUNG, E. MARTINEZ-ROMERO, A. KERR, AND H. SAWADA. 2005. Genus *Rhizobium*, a highly divergent genus in a revised family, the *Rhizobiaceae*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Edition, 2nd Volume. George Garrity, (Ed.) Springer-Verlag , New York , NY, , pp. 324-340

- LAFFERTY, R.M.; KORSATKO, B.; KORSATKO, W. Microbial production of poly- β -hydroxybutyric acid. In: RHEM, H.J.; REED, G. (Ed.). **Biotechnology**. Weinheim: VCH., 1988. v. 6b, p.136-176.
- LEE, S.Y.; PARK, S.J.; PARK J.P.; LEE, Y.; LEE, S.H. Economic aspects of biopolymer production. In: STEINBÜCHEL, A. (Ed.). **Biopolymers**. Münster: Wiley-VCH, 2003. v.10: General aspects and Special Applications.
- LEVERY, S. B.; ZHAN, H.; LEE, C.C.; M LEIGH, J.A.; HAKOMORI, S. Structural analysis of a second acidic exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti* that can function in alfalfa root nodule invasion. **Carbohydrate Research**, Amsterdam , v. 210, p. 339-347, 1991.
- LIN, C.C.; CHEN, Y.C.; SONG, S.C.; LIN, L.P. Flavonoids as inducers of extracellular proteins and exopolysaccharides of *Sinorhizobium fredii*. **Biology and Fertility of Soils**, v. 30: 83–89. 1999.
- 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 Plant-Microbe Interactions** , v. 18: 67- 74, 2005.
- LONG, S.R. Genes and signals in the *Rhizobium* -legume symbiosis. **Plant Physiology**, v.125, p.69-72, 2001.
- LORDA, G.; BRACCIA, J.D.; BARBEITO, V.; PAGLIERO, F.; BOERIS, S; CASTAÑO, C.; PORDOMINGO, A.; ALTOLAGUIRRE, F.; PASTOR, M.D. Peat-based inoculum of *Bradyrhizobium japonicum* and *Sinorhizobium fredii* supplemented with xanthan gum. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23: 1-5. 2007.
- MADISON L.L.; HUISMAN, G.W. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.63(1), p.21–53, 1999.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2.ed. Piracicaba: POTAFÓS, 1997. 319 p.
- MARGARITIS, A.; PACE, G.W. Microbial Polysaccharides in: **Comprehensive biotechnology: the principles, applications and regulations of biotechnology in industry, agriculture and medicine**. H.W. Blanch, S. Drew, D.I.C. Wang (Eds), Pergamon Press, p.1005-1044, 1985.

- Marmur, J. 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. **J. Mol. Biol.** 3:208-218.
- MARTÍNEZ-ROMERO, E.; SEGOVIA, E.; MERCANTE, F. M.; FRANCO, A. A.; GRAHAM, P. H.; PARDO, M. A. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 41, p. 417-426, 1991.
- MATA, J.A.; BÉJAR, V.; BRESSOLIER, P.; TALLON, R.; URDACI, M.C.; QUESADA E.; LLAMAS, I. Characterization of exopolysaccharides produced by three moderately halophilic bacteria belonging to the family *Alteromonadaceae*. **Journal of Applied Microbiology**, Northern Ireland, v.105, p. 521-528, 2008.
- MAZUR, A; MARCZAK, M; KRÓL, JE; SKORUPSKA, A. Topological and transcriptional analysis of *pssL* gene product: a putative Wzx-like exopolysaccharide translocase in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* TA1. **Arch Microbiol**, v.184, p1-10, 2005.
- MCNELLY, W.; KANG, K. PS-7 a new bacterial heteropolysaccharide. In: SANDFORD P. A.; LASKIN, A. ed. *Extracellular Microbial Polysaccharides*, Washington, D. C: American Chemical Society, p.220-230, 1977.
- MERCAM, N. Production of polyhydroxybutyrate (PHB) by some rhizobium bacteria. **Turk J Biol** v.26, p.215–219, 2002.
- MERCANTE, F. M. ; FRANCO, A. A. . Expressão dos genes nod de *Rhizobium tropici*, *R. etli* e *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* e estabelecimento da nodulação do feijoeiro na presença de escudados de sementes de *Mimosa flocculosa* e *Laeucaena leucocephala*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 24: 301–310. 2000.
- MICHIELS, J.; VERRETH, C.; VANDERLEYDEN, J. Effects of temperature stress on bean-nodulating *Rhizobium* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, p. 206-1212, 1994.
- MIMMACK, ML; BORTHAKUR, D; JONES, MA; DOWNIE, JA; JOHNSTON, AWB. The *psi* operon of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*: identification of two genes whose products are located at the bacterial cell surface. **Microbiol**, v.140, p.1223-1229, 1994.
- MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2006. 488p.

- MOREIRA, LM; BECKER, JD; PÜHLER, A; BECKER, A. The *Sinorhizobium meliloti* ExpE1 protein secreted by a type I secretion system involving ExpD1 and ExpD2 is required for biosynthesis or secretion of the exopolysaccharide galactoglucan. **Microbiology**, v.146, p.2237-2248, 2000.
- MORGANTE, C.; CASTRO, S.; FABRA, A. Role of rhizobial EPS in the evasion of peanut defense response during the crack-entry infection process. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39: 1222–1225. 2007.
- MORGANTE, C.; CASTRO, S.; FABRA, A. Role of rhizobial exopolysaccharides in crack entry/intercellular infection of peanut. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 37:1436–1444. 2005.
- MOSTASSO, L. et al. Selection of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. **Field Crops Research**, Amsterdam, v.73, n.2/3, p.121-132, 2002.
- MUELLER, K.; GONZALÉZ, J.E. Complex regulation of symbiotic functions is coordinated by *mucR* and quorum sensing in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*, v.193, n.2, p. 485-496, 2011.
- NAVARRO, R. F. **Fundamentos de reologia de polímeros**. Caxias do Sul: Editora da Universidade de Caxias do Sul, 1997.
- NEVES, A. L. R.; LACERDA, C. F.; GUIMARÃES, F. V. A.; GOMES FILHO, E.; FEITOSA, D. R. C. Trocas gasosas, crescimento e teores de minerais no feijão-de-corda irrigado com água salina em diferentes estádios. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.13, p.873-881, 2009.
- NEVOT, M.; DERONCELÉ, V.; MESSNER, P.; GUINEA, J.; MERCADÉ, E. Characterization of outer membrane vesicles released by the psychrotolerant bacterium *Pseudoalteromonas Antarctica* NF. **Environmental Microbiology**, Braunschweig, v.8, p.1523–1533, 2006.
- O'CONNELL, K.P.; ARAUJO, R.S.; HANDELSMAN, J. Exopolysaccharide-deficient mutants of *Rhizobium* sp. strain CIAT899 induce chlorosis in common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Molecular Plant-Microbe Interactions** v.3(6), p.424-428, 1990.
- OEDING, V.; SCHLEGEL, H.G. β -ketothiolase from *Hydrogenomonas eutropha* H16 and its significance in the regulation of poly- β -hydroxybutyrate metabolism. **Biochem. J.**, v. 134, p. 239-248, 1973.

- Ortega-Morales. B.O., J.L. Santiago-García, M.J. Chan-Bacab, X. Moppert, E. Miranda-Tello, M.L. Fardeau, J.C. Carrero, P. Bartolo-Pérez, Alex Valadéz- González and J. Guezennec, (2007), Characterization of extracellular polymers synthesized by tropical intertidal biofilm bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 102: 254-264.
- OSAKU, C.A.; SASSAKI, G.L.; ZANCAN, G.T.; IACOMINI, M. Studies on neutral exopolysaccharides produced by the ectomycorrhiza *Thelephora terrestris*. **FEMS Microbiology Letters**, Wales, v.216, p.145-149, 2002.
- PACE, G. W.; RIGHELATO, R. C. Production of extracellular microbial polysaccharides. **Advances in Biochemical Engineering**, v.15, p.41-70, 1980.
- PAGANELLI, F.L. **Clonagem e expressão heteróloga dos genes responsáveis pela síntese de polihidroxibutirato em *Bradyrhizobium elkanii***. Instituto de Biologia, Universidade Estadual De Campinas, 2009. 78p. (Dissertação de Mestrado).
- PAGE, W.L. Production of poly- β - hydroxybutirate by *Azotobacter vinelandii* in media containing sugars and complex nitrogen sources. **Appl. Micorbiol. Biotechnol.**, v. 38, p. 117-121, 1992.
- RAMOS, A.; BOELS, I.C.; DEVOS, W.M.; SANTOS. Relationship between glycolysis and exopolysaccharide biosynthesis in *Lactococcus lactis*. **Applied an Environmental Microbiology**, v.67, p.33-41, 2001.
- RAPOSEIRAS, R.; PINTO, P.P.; PASSOS, R.V.M.; SCOTTI, M.R.M.M.L.; PAIVA, E.; SELDIN, L.; SÁ, N.M.H. Variabilidade de colônias isoladas de estirpes de *Rhizobium* efetivas na nodulação do feijoeiro, antes e após exposição à temperatura elevada. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 23.; REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 7.; SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 5.; REUNIÃO BRASILEIRA DE BIOLOGIA DO SOLO, 2., 1998, Caxambu. **Anais...** Caxambu: Universidade Federal de Lavras, 1998. p.208.
- REHM, B. H. A. Genetics and biochemistry of polyhydroxyalkanoate granule self-assembly: The key role of polyester synthases. **Biotechnol. Lett.**, v. 28, p. 207-213, 2006.
- REHM, B. H. A. Polyester synthases: natural catalysts for plastics. **Biochem. J.** v. 376, p. 15–33, 2003.
- REINHOLD, B. B.; CHAN, S. Y. ; REUBER, T. L. ; MARRA, A.; WALKER G. C.; REINHOLD V. N. Detailed structural characterization of succinoglycan, the major

symbiotically important exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti* strain Rm1021. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.176, p. 1997–2002, 1994.

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

RICHERT, L.; GOLUBIC, S.; GU, L.R.; RATISKOL, J.; PAYRI, C.; GUEZENNEC, J. Characterization of Exopolysaccharides Produced by Cyanobacteria Isolated from Polynesian Microbial Mats. **Current Microbiology**, Braunschweig, v.51, p. 379–384, 2005.

RINAUDI, L.V.; GONZÁLEZ, J.E., The low-molecular-weight fraction of exopolysaccharide II from *Sinorhizobium meliloti* is a crucial determinant of biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, v.191, n.23, p.7216-7224, 2009.

RINAUDI, L.V.; SORROCHE, F.; ZORREGUIETA, Á.; GIORDANO, W. Analysis of the mucR gene regulating biosynthesis of exopolysaccharides: implications for biofilm formation in *Sinorhizobium meliloti* Rm1021. **FEMS Microbiology Letters**, v.302, p.15-21, 2010.

RINAUDI, L.V.; SORROCHE, F.; ZORREGUIETA, A.; GIORDANO, W., Analysis of the mucR gene regulating biosynthesis of exopolysaccharides: implications for biofilm formation in *Sinorhizobium meliloti* Rm1021. **FEMS Microbiology**, p.15-21, 2009.

RINAUDO, M. Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. **Polymer International**, v. 57:397-430. 2008

ROTTAVA, I. **Seleção de linhagens de Xanthomonas sp. Para produção de goma**
ROTTAVA, I.; BATESINI, G.; SILVA, M.F.; LERIN, L.; OLIVEIRA, D.; PADILHA, F.F.; TONIAZZO, G.; MOSSI, A.; CANSIAN, R.L.; DI LUCCIO, M.; TREICHEL, H. Xanthan gum production and rheological behavior using different strains of *Xanthomonas* sp. **Carbohydrate Polymers**, v. 77: 65-71. 2009.

RUMJANEK, N.G.; FONSECA, M.C.C. da; XAVIER, G.R. Quorum sensing em sistemas agrícolas: comportamento multicelular em procaríoto via comunicação intercelular. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n.33, p.35-50, 2004.

SÁ, E.L.S. **Diversidade fenotípica e genética de rizóbios isolados de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) em solos ácidos de Cunha – SP.** 2001. 109f. Tese (Doutorado)- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3. ed., New York: Cold Spring Harbor, 2001.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATS, A. A generalized godel of plasmid replication. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 33, p. 1135, 1989.
- SANGER F, NIKLEN S, COULSON AR. DNA sequencing with chain termination inhibitors. **Proc Nat Acad Sci USA**, v.74:5, p.163-9, 1977.
- SAUDE, N.; JUNTER, G.A. Production and molecular weight characteristics of alginate from free and immobilized-cell cultures of *Azotobacter inelandii*. **Process Biochemistry**, Vandoeuvre-les-Nancy, v. 37, p. 895–900, 2002.
- Schramm, G. Em *Reologia e Reometria: Fundamentos teóricos e práticos*; Mothé, C.; Correia, D. Z.; Petri, H. M.; Gonçalves, M.; Carestiato, T.. eds.; Artliber Ed. Ltda: São Paulo, 2006, caps. 1, 2 e 3.
- SELBMANN, L.; CROGNALE, S; PETRUCCIOLI, M.Exopolysaccharide production from *Sclerotium gluconicum* NRRL 3006 and *Botryosphaeria rhodina* DABAC-P82 on raw and hydrolysed starchy materials. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.34, p.51-55, 2002.
- SHAH, A. A.; HASAN, F.; HAMEED, A.; AHMED, S. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. **Biotechnol. Adv.**, v.26, p. 246-265, 2008.
- SILVA, F. R.; VETTORE, A. L.; KEMPER, E. L.; LEITE, A.; ARRUDA, P. Fastidium gum: the *Xylella fastidiosa* exopolysaccharide possibly involved in bacterial pathogenicity. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, n.203, p.165-171, 2001.
- SKORUPSKA, A; JANCZAREK, M; MARCZAK, M; MAZUR, A; KRÓL, J. Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions. **Microbial Cell Factories**, v.5, p.1-19, 2006.
- SLATER, S.; HOUMIEL, K.L.; TRAN, M.; MITSKY, T.A.; TAYLOR, N.B.; PADGETTE, S.R.; GRUYS, K.J. Multiple β -ketothiolases mediate poly(β -hydroxyalkanoate) copolymer synthesis in *Ralstonia eutropha*. **J. Bacteriol.**, v. 180, p. 1979-1987, 1997.
- SLAVEYKOVA, V.I.; PARTHASARATHY, N.; DEDIEU, K.; TOESCHER, D. Role of extracellular compounds in Cd-sequestration relative to Cd uptake by bacterium *Sinorhizobium meliloti*. **Environmental Pollution**, v.158, p.2561-2565, 2010.
- SNUSTAD, P; SIMMONS, M.J. *Fundamentos de genética*. 2. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2001. p. 415-431.

- SORROCHE, F.G.; RINAUDI, L.V.; ZORREGUIETA, A.; GIORDANO, W. EPSII-dependent autoaggregation of *Sinorhizobium meliloti* planktonic cells. **Springer Science Business**, v.61, p.465-470, 2010.
- SPAINK, H. P. Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.54, p.257-288, 2000.
- STADING, M. **Gel structure and rheology in theory and practice**. 1998. Tese (PhD) - Department of Food Science, Chalmers University of Technology, Sweden, 1988.
- STAEHELIN, C.; FORSBERG, L.S.; D'HAENZE, W.; GAO, M.; CARLSON, R.W.; XIE, Z.; PELLOCK, B.J.; JONES, K.M.; WALKER, G.C.; STREIT, W.R.; BROUGHTON, W.J. Exo-Oligosaccharides of *Rhizobium* sp. Strain NGR234 Are Required for Symbiosis with Various Legumes. **Journal of Bacteriology**, v.188, p.6168–6178, 2006.
- STAM H, VAN VERSEVELD HW, DE VRIES W, STOUHAMER AH. Utilization of poly-3 hydroxybutyrate in free-living cultures of *Rhizobium* ORS571. **FEMS Microbiol Lett**, v.35, p.215–220, 1986.
- STEFFE, J. F. **Rheological Methods in Food Process Engineering**. Michigan: Ed. Freeman Press, 1996. p.428.
- STRALIOTTO, R. **A importância da inoculação com rizóbio na cultura do feijoeiro**. 2002. Disponível em: <http://www.cnpab.embrapa.br/publicacoes/artigos/fbni_inocula_feijoeiro.html>. Acesso em: 27 fev. 2011.
- STREIT, W. R.; SCHMITZ, R. A.; PERRET, X.; STAEHELIN, C.; DEAKIN, W.J.; RAASCH, C.; LIESEGANG, H.; BROUGHTON, W.J. An evolutionary hot spot: the pNGR234b replicon of *Rhizobium* sp. strain NGR234. **Journal of Bacteriology**. v.186, p.535-542, 2004.
- SUTHERLAND, I. W. Microbial polysaccharides from gram-negative. **International Dairy Journal**, Barking, n.11, p.663-674, 2001.
- SUTHERLAND, I. W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Tibtech**, v. 16, p. 41-46, 1998.
- TAVERNIER, P.; PORTAIS, J. C.; SAUCEDO, J. E. N.; COURTOIS, J.; COURTOIS, B.; BARBOTIN, J. N. Exopolysaccharide and poly-beta-hydroxybutyrate coproduction in two *Rhizobium meliloti* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63: 21-26, 1997.

- TOMBOLINI R, POVOLO S, BUSON A, SQUARTINI A, NUTI MP. Poly-3-hydroxybutyrate (PHB) biosynthetic genes in *Rhizobium meliloti* 41. **Microbiology** v.141, p.2553–2559, 1995.
- TONELI, J. T.C. L.; MURR, F. E. X.; PARK, K. J. Estudo da reologia de polissacarídeos utilizados na indústria de alimentos. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.7, p.181-204, 2005.
- TOSIN, F.F.S. **Polissacarídeos da goma de exsudato e da polpa dos frutos de *Prunus persica***: Caracterização estrutural e análises reológicas. 2008. 228f. Tese (Doutorado). Programa de pós-graduação em Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- TRAINER, M. A.; CHARLES, T. C. The role of PHB metabolism in the symbiosis of rhizobia with legumes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71: 377-386. 2006.
- TULLY, R.E. New culture media to suppress exopolysaccharides production by *Rhizobium japonicum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 21: 252–254. 1985.
- VERMANI, M. V.; KELKAR, S. M.; KAMAT, M Y. Production and optimization of certain growth parameters for an exopolysaccharide from *Azotobacter vinelandii* MTCC 2460 isolated from a plant rhizosphere. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, Osaka, v.80, n.6, p.599-602, 1995.
- VICARI, M. V. Caracterização biológica de quatro estirpes de *Bradyrhizobium* spp. 1992. 93f Dissertação (Mestrado em Melhoramento Genético Vegetal). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1992.
- VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root nodule bacteria**. ICB HandBook, 15, Oxford: Blackwell Scientific, 1970. p.200
- VRIESMANN, L. C., Polysaccharides from the pulp of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*): structural characterization of a pectic fraction. *Carbohydrate Polymers*, p. 2-4, 2008.
- WANG, C.X.; SHENG, X.Y.; EQUI, R.C.; TRAINER, M.A.; CHARLES, T.C.; SOBRAL, B.W.S. Influence of the poly-3-hydroxybutyrate (PHB) granule-associated proteins (PhaP1 and PhaP2) on PHB accumulation and symbiotic nitrogen fixation in *Sinorhizobium meliloti* Rm1021. **Journal of Bacteriology**, v. 189: 9050-9056. 2007.

- WANG, P.; ZHONG, Z.; ZHOU, J.; CAI, T.; ZHU, J. Exopolysaccharide biosynthesis is important for *Mesorhizobium tianshanense*: plant host interaction. **Archives of Microbiology**, v. 189: 525–530. 2008.
- WANG, Y.; XU, J.; CHEN, A.; WANG, Y.; ZHU, J.; YU, G.; XU, L.; LUO, L. GGDEF and EAL proteins play different roles in the control of *Sinorhizobium meliloti* growth, motility, exopolysaccharide production, and competitive nodulation on host alfalfa. **ABBS Acta Biochim Biophys Sin**, v.42, p.410-417, 2010.
- WHITFIELD, C. Bacterial extracellular polysaccharides. **Can. J. Microbiol.** v. 34, p. 415-420, 1988.
- WHITFIELD, C.; ROBERTS, I. S. Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, Salem, n.31, p.1307-1319, 1999.
- WILLIS, L.B.; WALKER, G.C. The *phbC* (poly-3-hydroxybutyrate synthase) gene of *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti* and characterization of *phbC* mutants. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 44:554–564. 1998.
- WOOD, P.J. Wood, Specificity in the interaction of direct dyes with polysaccharides, **Carbohydrate Research** v.85 (2), p.271–287, 1980.
- xantana**. 2005. 95f. Dissertação (Mestrado) Departamento de ciências agrárias – Programa de mestrado em Engenharia de Alimentos. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguiaia e das Missões – URI, Campus de Erechim.
- ZHAN H.; LEIGH J.A. Two genes that regulate exopolysaccharide production in *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol*, v.172, p.5254-5259, 1990.
- ZOHURIAAM, M. J.; SHOKROLAHI, F. Thermal studies on natural and modified gums. *Polymer Testing*. v. 23, p. 575-579, 2004.

ANEXO

Esquema simplificado da metodologia adotada para a execução deste trabalho:

