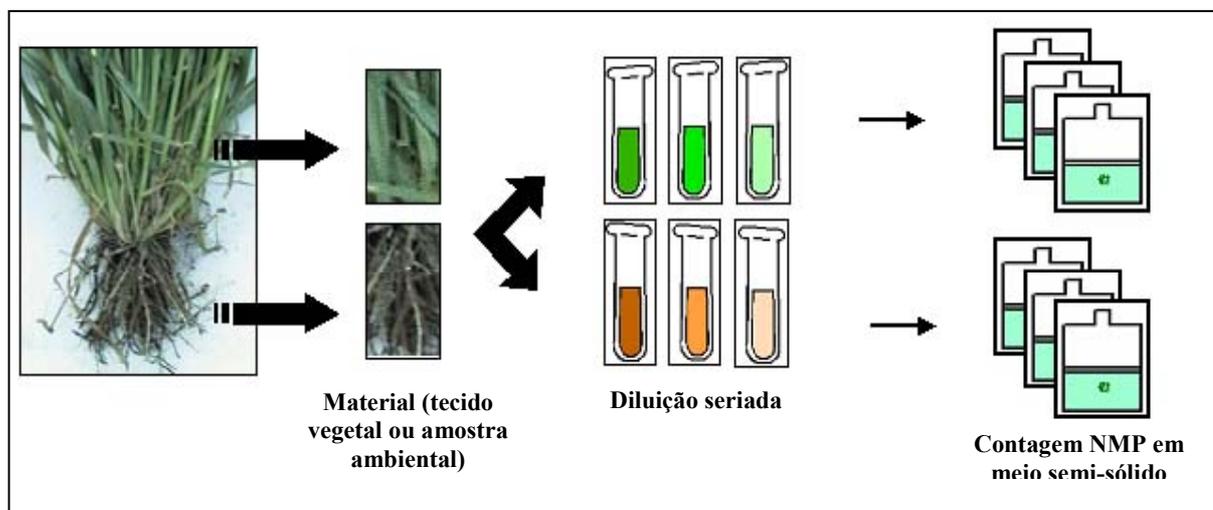


Metodologia para Isolamento e Posicionamento Taxonômico de Bactérias Diazotróficas Oriundas de Plantas Não-Leguminosas





*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

*ISSN 1517-8498
Agosto/2007*

Documentos 234

Metodologia para Isolamento e Posicionamento Taxonômico de Bactérias Diazotróficas Oriundas de Plantas Não-Leguminosas

Sandy Sampaio Videira
Jean Luiz Simões Araújo
Vera Lúcia Divan Baldani

*Seropédica – RJ
2007*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridas na:

Embrapa Agrobiologia

BR 465 – km 7

Caixa Postal 74505

23851-970 – Seropédica/RJ, Brasil

Telefone: (0xx21) 2682-1500

Fax: (0xx21) 2682-1230

Home page: www.cnpab.embrapa.br

e-mail: sac@cnpab.embrapa.br

Comitê Local de Publicações: Eduardo F. C. Campello (Presidente)
José Guilherme Marinho Guerra
Maria Cristina Prata Neves
Verônica Massena Reis
Robert Michael Boddey
Maria Elizabeth Fernandes Correia
Dorimar dos Santos Felix (Bibliotecária)

Expediente:

Revisores e/ou ad hoc: Veronica Massena Reis e Stefan Schwab

Normalização Bibliográfica: Dorimar dos Santos Félix

Editoração eletrônica: Marta Maria Gonçalves Bahia

1ª impressão (2007): 50 exemplares

V652m Videira, Sandy Sampaio

Metodologia para isolamento e posicionamento taxonômico de bactérias diazotróficas oriundas de plantas não-leguminosas / Jean Luiz Simões Araújo, Vera Lúcia Divan Baldani. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2007. 74 p. (Documentos / Embrapa Agrobiologia, ISSN 1517-8498, 234).

1. Bactéria diazotrófica. I. Simões-Araújo, J. L., colab. II. Baldani, V. L. D., colab. III. Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (Seropédica, RJ). IV. Título. V. Série.

CDD 579.3

Autores

Sandy Sampaio Videira

Mestranda em Agronomia - Ciência do Solo, UFRRJ.

BR 465, km 7, Caixa Postal 74505, Cep 23851-970, Seropédica/RJ

e-mail: sandyvideira@yahoo.com.br

Jean Luiz Simões Araújo

Engº Agrônomo, PhD em Genética de Plantas, Pesquisador da
Embrapa Agrobiologia

BR 465, km 7, Caixa Postal 74505, Cep 23851-970, Seropédica/RJ

e-mail: jean@cnpab.embrapa.br

Vera Lúcia Divan Baldani

Licenciada em Ciências Agrícolas, PhD em Ciência do Solo,
Pesquisadora da Embrapa Agrobiologia

BR 465, km 7, Caixa Postal 74505, Cep 23851-970, Seropédica/RJ

e-mail: vera@cnpab.embrapa.br

Apresentação

A preocupação crescente da sociedade com a preservação e a conservação ambiental tem resultado na busca pelo setor produtivo de tecnologias para a implantação de sistemas de produção agrícola com enfoques ecológicos, rentáveis e socialmente justos. O enfoque agroecológico do empreendimento agrícola se orienta para o uso responsável dos recursos naturais (solo, água, fauna, flora, energia e minerais).

Dentro desse cenário, a Embrapa Agrobiologia orienta sua programação de P&D para o avanço de conhecimento e desenvolvimento de soluções tecnológicas para uma agricultura sustentável.

O documento 234/2007 traz de forma sucinta as estratégias utilizadas pelos Laboratórios de Gramíneas e de Genética e Bioquímica da Embrapa Agrobiologia para isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas. A busca constante de bactérias fixadoras de nitrogênio tem resultado no isolamento de diversos microrganismos diazotróficos. Conseqüentemente, existe uma grande demanda para a identificação e classificação desses isolados, assim como da verificação da contribuição da fixação biológica de nitrogênio (FBN), para o seu hospedeiro. As associações entre bactérias diazotróficas e as raízes de plantas não-leguminosas, podem ser apontadas como uma alternativa sustentável e economicamente viável para a substituição total ou parcial das adubações nitrogenadas. Até recentemente, o Centro dispunha somente de técnicas básicas de microbiologia para classificação parcial dos diversos microrganismos isolados através do uso de diversos meios de cultivo aqui desenvolvidos. Atualmente, nossos laboratórios vêm utilizando metodologias moleculares que permitem a identificação rápida e precisa das espécies presentes nas plantas.

José Ivo Baldani
Chefe Geral da Embrapa Agrobiologia

SUMÁRIO

1. Introdução	7
2. Bactérias Diazotróficas	8
2.1. Gênero <i>Azospirillum</i>	9
2.2. Gênero <i>Gluconacetobacter</i>	10
2.3. Gênero <i>Herbaspirillum</i>	10
2.4. Gênero <i>Burkholderia</i>	11
2.5. Gênero <i>Azoarcus</i>	12
2.6. Gênero <i>Sphingomonas</i>	12
3. Taxonomia de Bactérias	13
3.1. Métodos fenotípicos.....	14
3.2. Métodos genotípicos.....	15
4. Metodologias Sugeridas	19
4.1. Contagem e Isolamento de bactérias diazotróficas	19
4.2. Caracterização Fenotípica.....	21
4.3. Caracterização Bioquímica e Fisiológica.....	25
4.4. Caracterização molecular	36
5. Considerações Finais	47
6. Referências Bibliográficas	48
7. Anexo	64
7.1. Meios de Cultivo.....	64
7.2. Soluções	70

Metodologia para Isolamento e Posicionamento Taxonômico de Bactérias Diazotróficas Oriundas de Plantas Não-Leguminosas

*Sandy Sampaio Videira
Jean Luís Simões Araújo
Vera Lúcia Divan Baldani*

1. Introdução

As bactérias compreendem o grupo mais diverso e abundante dentre os organismos na Terra (WHITMAN et al., 1998). Algumas estimativas indicam que o número de espécies bacterianas conhecidas esteja em torno de 12% do seu total (BULL et al., 2000). Entretanto, menos de 1% destes microrganismos podem ser observados sob microscopia, cultivados e caracterizados.

Por mais de 100 anos, bactérias têm sido descritas e identificadas por metodologias culturais, tradicionalmente, utilizando características fenotípicas através de métodos empíricos e sujeitos a grandes variações. Desse modo, pesquisas usando novas e eficientes ferramentas para identificar e caracterizar bactérias tem revolucionado esta área de pesquisa, especialmente com o advento dos métodos moleculares, envolvendo propriedades genômicas.

Atualmente, com a busca por práticas sustentáveis, as bactérias têm papel importante nos ciclos biogeoquímicos, processos de biorremediação, conversão de energia, síntese de produtos naturais, dentre outros; fazendo das bactérias uma fonte potencial para processos biológicos e industriais.

Este trabalho tem como objetivo difundir algumas técnicas utilizadas nos laboratórios de Gramíneas e de Genética e Bioquímica da Embrapa Agrobiologia que auxiliam no isolamento, identificação e caracterização de bactérias diazotróficas dos diversos ambientes. Estas avaliações se fazem necessárias já que para se obter informações precisas e fazer recomendações, é necessário se conhecer as espécies presentes, sua amplitude, propriedades biológicas e possível vulnerabilidade as condições ambientais adversas (WILSON, 1997).

2. Bactérias Diazotróficas

Bactérias constituem um grupo de microrganismos de ocorrência cosmopolita, possuem importância indiscutível na sustentabilidade da biosfera e têm um papel preponderante nos ciclos biogeoquímicos. O número de espécies descritas na literatura, cerca de 4.200, a maioria representada por organismos cultivados, está muito aquém do estimado, representando menos de 1% do total de espécies existentes na natureza (TORSVIK et al., 2002). As espécies bacterianas existentes estão presentes em todos os ambientes terrestres, ocupando e colonizando todos os nichos possíveis, incluindo as superfícies e interior de plantas, água doce e salgada, interior de rochas e geleiras.

Em particular, as plantas constituem um perfeito ecossistema microbiano. Nas plantas hospedeiras, os microrganismos são capazes de colonizar superfícies das raízes (rizoplasma) e folhas (filoplasma) ou o interior de diversos tecidos das plantas (endofíticas). Entre as bactérias associadas a espécies vegetais, as bactérias fixadoras de nitrogênio são consideradas como um dos grupos mais importantes na agricultura tropical pela sua associação com plantas leguminosas ou não.

O papel dos microrganismos na fixação biológica de nitrogênio (FBN) atmosférico foi descoberto por BUEGEL & WILFARTH em 1888 (Citado em manual prático de microbiologia). Esta associação é responsável por uma quantidade substancial do fluxo global de nitrogênio fixado nas formas de amônia, nitrato e compostos orgânicos. De acordo com REIS et al. (2006), a incorporação de N via FBN aos diferentes ecossistemas do planeta é bastante elevada, representando uma economia substancial de energia fóssil, normalmente empregada na produção de fertilizantes nitrogenados.

Embora a simbiose rizóbio-leguminosa seja a associação mais estudada, apresentando as maiores contribuições da FBN (STRALIOTTO & RUMJANEK, 1999), algumas plantas da família *Poaceae* têm mostrado potencial significativo da FBN, como é o caso da cana-de-açúcar, milho, arroz, trigo, dentre outras (REIS et al., 2006). Além destas plantas, várias bactérias diazotróficas têm sido isoladas de raízes e de partes aéreas de plantas de tubérculo, como batata-doce (PAULA, 1992) e mandioca (BALOTA, 1994), de cafeeiros

(JIMÉNEZ-SALGADO et al., 1998), bananeiras e abacaxizeiros (WEBER et al., 1999).

Sabe-se hoje que uma grande diversidade de bactérias diazotróficas ocupa nichos distintos em diferentes plantas da família *Poaceae*, sendo estas classificadas como de vida livre e endofíticas. As bactérias de vida livre são oriundas do solo e vivem harmonicamente com as plantas, utilizando para sua nutrição os exudados de suas raízes. Nesta associação não ocorre, aparentemente, a formação de uma estrutura especializada para a fixação do nitrogênio (como o nódulo, por exemplo). Os produtos da fotossíntese são liberados pela planta, sendo absorvidos pelas bactérias que habitam a rizosfera e estas, por sua vez, fixam o nitrogênio para seu metabolismo e liberam, após a morte das células, o NH_4^+ para as plantas. Dentro deste grupo de bactérias encontram-se os gêneros *Azospirillum*, *Beijerinckia*, *Derxia*, *Azotobacter*, entre outras.

Atualmente se considera que o tipo de relação das bactérias diazotróficas com plantas da família *poaceae* pode ser mais restrita, necessitando do vegetal para completar o seu ciclo de vida e manter-se viável no ambiente. Bactérias que fazem associações internas foram denominadas como endofíticas, sendo capazes de colonizar o interior dos tecidos vegetais sem causar nenhum sintoma de patogenicidade, promovendo o crescimento da planta hospedeira (KLOEPFER et al., 1997). Bactérias como *Gluconacetobacter* spp., *Herbaspirillum* spp., *Burkholderia* spp. e *Azoarcus* spp podem ser classificadas como bactérias diazotróficas endofíticas.

2.1. Gênero *Azospirillum*

Dentre os diversos gêneros de bactérias diazotróficas de vida livre, o gênero *Azospirillum* representa um grupo predominante nas associações com plantas monocotiledôneas, incluindo milho, arroz, cana-de-açúcar, sorgo e gramíneas forrageiras e plantas eudicotiledôneas como palmeiras e fruteiras (BALDANI et al., 2002).

PATRIQUIN et al. (1983) descobriram que este gênero tinha capacidade de fornecer quantidades substanciais de N através da FBN, e além disso, produzia hormônios que favoreciam o desenvolvimento das plantas (HASSAN et al., 1996). Este gênero está dividido atualmente em 11 espécies, sendo sete diazotróficas: A.

lipoferum, *A. brasilensis* (TARRAND et al., 1978), *A. amazonense* (MAGALHÃES et al., 1983), *A. doebereineriae* (ECKERT et al., 2001), *A. oryzae* (XIE & YOKOTA, 2005), *A. melinis* (PENG et al., 2006) e *A. canadense* (MEHNAZ et al., 2007).

2.2. Gênero *Gluconacetobacter*

Das 18 espécies do gênero, apenas quatro são capazes de fixar nitrogênio atmosférico: *G. diazotrophicus* (CAVALCANTE & DÖBEREINER, 1988), *G. azotocaptans*, *G. johannae* (FUENTES-RAMÍREZ et al., 2001) e *G. kombuchae* (DUTTA & GACHHUI, 2007).

Das espécies diazotróficas, *G. diazotrophicus* é a bactéria mais estudada em associação com cana-de-açúcar. Foi isolada inicialmente de raízes e parte aérea de cana-de-açúcar por CAVALCANTE & DÖBEREINER (1988) e ao longo dos anos, outros relatos mostraram a sua presença em alto número em plantas cana-de-açúcar em diversas regiões geográficas (PERIN, 2003).

Apresenta distribuição ampla e, além de fixar nitrogênio, produz hormônios de crescimento como AIA e giberelina (FUENTES-RAMÍREZ et al., 1993; BASTIÁN et al., 1998) e atua no controle biológico (PIÑON et al., 2001).

2.3. Gênero *Herbaspirillum*

O gênero *Herbaspirillum* foi inicialmente descrito com uma espécie, *H. seropedicae*, isolada de rizosfera, raízes lavadas e esterilizadas de plantas de arroz, sorgo e milho (BALDANI et al., 1986), forrageiras (BALDANI et al., 1997), cana-de-açúcar cultivada na Austrália (BODDEY et al., 1998) e em solo contaminado com metais pesados não desnudos (LANGE et al., 1998).

Atualmente este gênero apresenta 11 espécies, das quais somente *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans* (GILLIS et al., 1991, BALDANI et al., 1996), *H. frisingense* (KIRCHHOF et al., 2001), *H. lusitanum* (VALVERDE et al., 2003) e *H. hiltneri* (ROTHBALLER et al., 2006) apresentam-se como fixadoras de nitrogênio.

H. rubrisubalbicans têm sido encontrada em associação com cana-de-açúcar e raiz de *Digitaria insularis*, plantas invasoras comumente encontradas em plantações de cana-de-açúcar (OLIVARES et al.,

1996). Foi detectada também em capim elefante (REIS et al., 2000), abacaxizeiros e bananeiras (CRUZ et al., 2001). Tem ocorrência mais restrita, se comparada à espécie *H. seropedicae* e pode causar a doença chamada "estria mosqueada" na variedade de cana-de-açúcar B3462 (OLIVARES et al., 1993). Já *H. frisingense* foi isolada de amostras de tecido de raízes e colmos de capim elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) coletados no Brasil, e das gramíneas *Spartina pectinata*, *Miscanthus sinensis* e *M. sacchariflorus*, coletadas na Alemanha (KIRCHHOF et al., 2001).

2.4. Gênero *Burkholderia*

Bactérias do gênero *Burkholderia* foram isoladas primeiramente por OLIVEIRA (1992) a partir de raiz e colmo de plantas de arroz e recebeu o nome de "Bactéria E". O gênero vem sendo muito estudado devido sua ampla distribuição ecológica e metabolismo variado.

Tem sido encontrada em diversos ambientes como solo, água (PARKE & GURIAN-SHERMAN, 2001) rizosfera de plantas de arroz cultivadas no Vietnã (GILLIS et al., 1995), milho e café em diferentes regiões do México (ESTRADA DE LOS SANTOS et al., 2001), cereais como sorgo, milho e arroz (BALDANI et al., 1999), bananeiras e abacaxizeiros cultivados no Brasil (CRUZ et al., 2001) e plantas micropropagadas de cana-de-açúcar em solos de canaviais e plantas adultas na Austrália (REIS et al., 2004). Atualmente, este gênero abrange cerca de 52 espécies, entre descritas e *candidatus*, sendo somente oito classificadas como fixadoras de nitrogênio: *B. vietnamiensis* (GILLIS et al., 1995), *B. kururiensis* (ZHANG et al., 2000), *B. tuberum*, *B. phymatum* (VANDAMME et al., 2002a), *B. unname* (CABALLERO-MELLADO et al., 2004), *B. tropica* (REIS et al., 2004), *B. silvatlantica* (PERIN et al., 2006) e *B. nodosa* (CHEN et al., 2007).

As espécies *B. tuberum* e *B. phymatum* foram as primeiras isoladas de nódulos de plantas coletada na África do Sul e Guiana Francesa (VANDAMME et al., 2002b). Recentemente muitos trabalhos mostram o isolamento de bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia* em nódulos, principalmente em plantas da subfamília *Mimosoidea* (PERIN, 2007).

Estas bactérias têm a habilidade de colonizar diversos nichos ecológicos, incluindo tecidos de plantas, águas marinhas e doces, solos contaminados e seres humanos, sendo um importante componente da comunidade microbiana. Algumas espécies provocam doenças em plantas e animais, porém a maioria delas não são patogênicas, podendo promover o crescimento de plantas pela fixação biológica de nitrogênio e produção de fitormônios.

2.5. Gênero *Azoarcus*

O gênero *Azoarcus* spp. surgiu com a descrição das duas únicas espécies fixadoras de nitrogênio, *A. indigens* e *A. communis* isoladas de raízes e base do colmo de apenas uma espécie, *Kallar-grass*, cultivada no solo sódico do Paquistão (REINHOLD-HUREK et al., 1993), e foram detectadas também em raízes de arroz cultivado no Japão (REINHOLD-HUREK & HUREK, 1998).

Atualmente, o gênero engloba oito espécies descritas: *A. evansii* (ANDERS et al., 1995), *A. tolulyticus* (ZHOU et al., 1995), *A. anaerobius* (SPRINGER et al., 1998), *A. toluvorans*, *A. toluclasticus* (SONG et al., 1999) e *A. buckelii* (MECHICHI et al., 2002) que metabolizam compostos aromáticos.

2.6. Gênero *Sphingomonas*

O gênero *Sphingomonas* foi descrito em 1990 por YABUUCHI et al. Todas as espécies são produtoras de *sphingans*, ou seja, excretam pigmentos carotenóides amarelos solúveis em metanol, diferente dos pigmentos produzidos por *Xanthomonas campestris* (GIAVASIS et al., 2000).

Dentre as 49 espécies descritas, a literatura cita apenas três relacionadas a fixação biológica de nitrogênio. *S. paucimobilis* tem sido relatada na literatura como dotada de potencial diazotrófico (FERNANDES et al., 2001), sendo isolada da rizosfera (ENGELHARD et al., 2000) e sementes de arroz (MANO et al., 2006), milho e sorgo (HEBBAR et al., 1992). Em um estudo envolvendo bactérias fixadoras de nitrogênio do solo, ANDERSON (1955) descreveu um novo diazotrófico e lhe propôs o nome de "*Pseudomonas azotocolligans*". Posteriormente, esta bactéria foi reclassificada como membro do gênero *Sphingomonas*, recebendo o nome de *S. trueperi* e sua habilidade de fixar nitrogênio não foi ratificada (KAMPFER et al.,

1997). Entretanto, ADHIKARI et al. (2001) identificaram a presença de um gene homólogo ao *nifD* em um isolado de *S. trueperi*, mas não detectaram atividade da nitrogenase ao utilizar a ensaios de redução de acetileno (ARA). Embora um gene homólogo ao *nifD* tenha sido encontrado em um isolado de *S. trueperi*, e *S. paucimobilis* tenha apresentado potencial diazotrófico sob cultura pura, VIDEIRA et al. (2006) em estudos de identificação de *Sphingomonas* fixadoras de nitrogênio não conseguiram observar produtos de amplificação dos genes *nifD* e *nifD* para ambas espécies.

Em 2006, XIE & YOKOTA caracterizaram a nova espécie, *S. azotifigens*, como a primeira bactéria do gênero com capacidade de fixar nitrogênio biologicamente. Esta habilidade foi determinada através da atividade da nitrogenase, avaliada em cultura pura, pela técnica de Atividade de Redução de Acetileno (ARA). Além disso, um gene homólogo ao gene *nifH* foi identificado nas estirpes.

Conforme destacado nesta introdução, torna-se claro que o grupo de bactérias diazotróficas é bastante diverso e coloniza uma ampla faixa de hospedeiras. Devido à grande importância econômica deste grupo de microrganismos, os estudos de identificação de bactérias diazotróficas auxiliam na predição de características de interesse agrônomo e biotecnológico.

3. Taxonomia de Bactérias

Taxonomia é a ciência que estuda a classificação, ou seja, o arranjo em grupos taxonômicos com base em sua similaridade; nomenclatura, identificação das unidades definidas, e por fim a identificação de organismos (VANDAMME et al., 1996). Por mais de 100 anos os estudos taxonômicos em microbiologia tinham pouca importância em vista das grandes dificuldades de classificação imposta pelos métodos tradicionais baseados essencialmente em características fenotípicas, resultando na formação de grupos taxonômicos relativamente heterogêneos e muitas vezes artificiais (BUSSE et al., 1996). Atualmente, com a utilização de técnicas de biologia molecular associada a testes microbiológicos tradicionais, produziu-se um sistema estável e altamente informativo que tem colaborado para o

avanço de várias áreas abrangentes da microbiologia, como a genômica, ecologia e biotecnologia (GENOMICS... 2002).

Na identificação e definição de novas espécies bacterianas recomenda-se o uso da taxonomia polifásica, onde a princípio, todas as informações fenotípicas, genotípicas e filogenéticas podem ser incorporadas (VANDAMME et al., 1996). O termo taxonomia polifásica foi primeiramente utilizado por COLWELL (1970) constituindo um enorme avanço na moderna taxonomia bacteriana.

3.1. Métodos fenotípicos

A caracterização fenotípica é a primeira etapa do processo de identificação de um procaríoto na maioria dos laboratórios de microbiologia (BOONE & CASTENHOLZ, 2001). Estes métodos não envolvem manipulação ou análise direta de moléculas de DNA ou RNA, compreendem apenas características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, além de suas aplicações biotecnológicas (PONTES et al., 2007). Individualmente, muitas destas características têm se mostrado irrelevante na determinação precisa de bactérias, ainda que como um todo, estas forneçam informações importantes para o reconhecimento de alguns gêneros e espécies.

A morfologia inclui tanto as características celulares (forma, formação de endósporo, flagelos, tipo de parede celular, etc.) quanto de colônias (cor, dimensão, forma, etc.). As características fisiológicas e bioquímicas incluem informações de cultivo e adaptabilidade como o crescimento em diferentes temperaturas, valores de pH, concentrações de sal e açúcares, condições atmosféricas, crescimento na presença de vários substratos, atividades enzimáticas, metabolização de compostos variados, composição de lipídeos das células, etc. Muitas destas propriedades fenotípicas podem ser utilizadas, não só para determinação do taxa das bactérias, mas também para verificar uma provável adaptabilidade ecológica dos diferentes microrganismos às condições ambientais.

O conteúdo de ésteres metílicos de ácidos graxos celulares (FAME), por exemplo, é um parâmetro que tem sido estudado freqüentemente com propósito de classificação e identificação bacteriana. Bioquimicamente, a riqueza de informações contidas nos ácidos graxos pode ser tanto qualitativa (usualmente em nível de gênero),

quanto quantitativa (em nível de espécie). Como os caminhos bioquímicos para análise de ácidos graxos são conhecidos, várias relações podem ser estabelecidas entre diferentes organismos. KUNITSKY et al. (2007) afirmam que a composição de ácidos graxos é altamente conservada geneticamente, podendo um mesmo gênero ou espécie bacteriana de qualquer lugar do mundo apresentar similaridade bem elevada da composição de ácidos graxos quando em condições relativamente semelhantes.

Embora os testes fenotípicos forneçam inúmeras informações essenciais à identificação dos microrganismos, a combinação das informações fenotípicas e genômicas é necessária para uma descrição e classificação precisa das bactérias (ROSSELLÓ-MORA & AMANN, 2001).

3.2. Métodos genotípicos

Os métodos genotípicos são aqueles direcionados para moléculas de DNA ou RNA (VANDAMME et al., 1996). Atualmente, estes métodos dominam os estudos da taxonomia moderna de bactérias como uma consequência do progresso tecnológico. Dentre as metodologias utilizadas estão as tecnologias baseadas em reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas variações, seqüenciamento de genes conservados, determinação do grau de homologia de DNA genômico entre dois microrganismos, determinação da % G+C, hibridização com sondas de oligonucleotídeos, dentre outras (BULL et al., 1992).

3.2.1. Hibridização DNA-DNA

O uso da homologia de DNA através da técnica de hibridização DNA-DNA tem sido utilizada para caracterização genotípica por décadas, aumento a qualidade e quantidade de informações para identificação de espécies bacterianas (ROSSELLÓ-MORA & AMANN, 2001). Além disso, inúmeros estudos têm mostrado alto grau de correlação entre a similaridade do DNA com outros dados genômicos e fenotípicos (STRACKEBRANDT & GOEBEL, citado por STRALIOTTO & RUMJANEK, 1999). Esta técnica permite comparações e mensurações de similaridades genômicas entre o genoma total de duas espécies (PONTES et al., 2007). Um grupo de estirpes mostrando 70% ou mais de hibridização DNA-DNA é considerado como sendo a mesma espécie (HANAGE et al., 2005). PERIN (2007)

descreveu uma nova espécie do gênero *Burkholderia*, usando caracterizações polifásicas. Estes autores usaram hibridização DNA-DNA como um passo essencial para a diferenciação de estirpes isoladas de plantas de cana-de-açúcar.

Considerando que existe certa dificuldade para implementação desta técnica na rotina de laboratórios de microbiologia, novos e alternativos métodos, como fragmentos randômicos do genôma e microarranjos de DNA tem sido propostos para auxiliar ou suplementar esta técnica (MEHLEN et al., 2004; CHO & TIEDJE, 2001).

3.2.2. Determinação da % G+C no genôma

A determinação da porcentagem de moles de guanidina e citosina é uma dos métodos genotípicos clássicos, sendo considerado como parte essencial na descrição de um taxa bacteriano (VANDAMME et al., 1996). Geralmente, os níveis observados não são maiores que 3% dentro de espécies e de 10% entre os gêneros.

3.2.3. Estudos de genes do RNAr

O RNAr foi estabelecido como um dos melhores marcadores filogenéticos para bactérias, sendo impensável publicar a identificação e descrição de uma nova espécie sem a seqüência de nucleotídeos deste gene (YOUNG, 2000). De acordo com PEIXOTO et al. (2002), o 16S RNAr preenche todos os requisitos que definem um marcador filogenético universal, tendo este regiões altamente conservadas entre regiões variáveis; está presente e tem a mesma função em todas as espécies; não são afetados pelas mudanças ambientais; seu tamanho é suficientemente grande, permitindo comparações significativas; apresenta um grande número de seqüências disponíveis via base de dados pela internet, dentre outras características. A combinação destas propriedades faz deste gene essencial para estudos de evolução microbiana e filogenia (ACINAS et al., 2004). Outros estudos com esta região mostram que espaços intergênicos, especialmente aqueles localizados entre os genes 16S e 23S RNAr, tem mais variação genética do que outras regiões codificantes. De acordo com DAHLLÖF (2002), o polimorfismo destas regiões pode ser utilizado para diferenciação de gêneros e espécies de bactérias relacionadas geneticamente.

O gene 16S RNAr tem muitas características que favorecem a sua utilização para estudos moleculares, principalmente por apresentar facilidade em sua manipulação (ROSSELLÓ-MORA & AMANN, 2001). O seqüenciamento deste gene foi um grande avanço nos estudos filogenéticos de bactérias, resultando num aumento significativo de seqüências disponíveis que possibilitam a comparação entre diversas bactérias. Usualmente, similaridade de seqüências maiores que 97% em comparação com seqüências de outras bactérias depositadas no banco de dados podem ser identificadas como mesma espécie (PONTES et al., 2007). Embora o avanço desta técnica tenha aberto novas perspectivas para estudos filogenéticos, algumas limitações são encontradas. Alguns autores mostram que técnicas baseadas somente nas seqüências do gene 16S RNAr são insuficientes para classificar espécies de procaríotos e não mostram o verdadeiro relacionamento entre o genôma dos microrganismos (PEARCE et al., 2003).

3.2.4. Tipagem de DNA baseada em PCR

Os métodos de estudos do gene 16S, por exemplo, estão diretamente relacionados a tecnologia da reação em cadeia da polimerase (PCR), a qual tem tido um forte impacto e utilizada em muitas áreas da ciência. Algumas das técnicas combinam produtos de PCR com endonucleases de restrição no método chamado de análise de restrição de RNAr amplificado (ARDRA), por exemplo, onde fragmentos contendo os genes 16S ou 23S RNAr, com ou sem a região intergênica, é amplificado por PCR com iniciadores universais e então digerido com diversas enzimas de restrição. Este método em contraste com outros de análise de fragmentos gera padrões espécie-específicos (WU et al., 2005) considerando-se o caráter conservado dos genes de RNAr. Geralmente se utiliza nesta técnica produtos de amplificação da região 16S RNAr, entretanto, muitos trabalhos vem mostrando que a utilização da região intergênica 16S-23S RNAr apresenta grande variabilidade tanto em sua composição quanto no seu tamanho (REIS JUNIOR et al., 2004). Os mesmos autores analisaram os perfis de restrição da região intergênica 16-23S RNAr de *Azospirillum amazonense* e os resultados indicaram grande diversidade genética entre as estirpes.

Outra combinação de PCR e endonucleases de restrição é o polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição amplificados (AFLP), descrita por ZABEAN & VOS (1993), onde o processo de

amplificação final resulta num arranjo de fragmentos de DNA, alguns dos quais são grupo-específicos e outros estirpe-específicos (JASSEN et al., 1996). Desta forma, esta técnica vem sendo utilizada para avaliação da diversidade e identificação de bactérias. JASSEN et al. (1996) comprovaram a aplicabilidade da técnica de AFLP como ferramenta taxonômica, estudando estirpes de diversos gêneros de bactérias. Resultados semelhantes foram encontrados por VIDEIRA et al. (2007) em estudos sobre identificação e diversidade de *Sphingomonas* spp endofíticas de plantas de arroz. Os autores verificaram que de acordo com os padrões de bandas gerados pelas combinações de iniciadores utilizadas, os isolados apresentaram grande semelhança a espécie *S. azotifigens*, enquanto as espécies *S. trueperi* e *S. paucimobilis* foram bastante divergentes dos demais.

Dentre as técnicas descritas acima, outras metodologias baseadas em análises de perfis tem sido utilizadas na taxonomia bacteriana. Dentre estas podemos citar o DGGE, RFLP, FISH, clonagem e seqüenciamento, amplificação com iniciadores específicos, detecção de genes específicos, dentre outros (PONTES et al., 2007). Estas técnicas permitem uma rápida e eficaz detecção de diversidade de bactérias, podendo contribuir com informações adicionais na taxonomia bacteriana.

De modo geral, a taxonomia polifásica têm sido aplicada para muitos grupos de bactérias, sendo imprescindível a utilização das informações fenotípicas e genotípicas para o posicionamento taxonômico das mesmas (BULL et al., 1992). Além disso, as informações difundidas por este estudo pode ser extremamente útil na representação das condições e interações entre microrganismos.

Este trabalho justifica-se pela necessidade de identificar e resolver as relações filogenéticas e interações de bactérias envolvidas com a fixação biológica de nitrogênio obtidas de diferentes plantas não-leguminosas. Bactérias associadas com plantas podem suprir, pelo menos em parte, a necessidade de nitrogênio por parte da planta, sendo seu uso de grande interesse agrícola. A pesquisa com estas bactérias pode fornecer informações valiosas, bem como auxiliar na seleção de estirpes mais eficientes para inoculação das culturas agrícolas, obtendo-se desta maneira, o máximo de fornecimento de nitrogênio. O Objetivo geral deste estudo é difundir metodologias utilizadas pelos laboratórios de Gramíneas e Genética e Bioquímica da

Embrapa Agrobiologia para isolamento e identificação de bactérias diazotróficas obtidas de plantas não-leguminosas.

4. Metodologias Sugeridas

4.1. Contagem e Isolamento de bactérias diazotróficas

Para o isolamento de bactérias diazotróficas, as amostras são separadas em solo da rizosfera, raízes e parte aérea e processadas de acordo com a metodologia descrita por DÖBEREINER et al. (1995), para contagem da população de bactérias diazotróficas e posterior isolamento. Para tal, o solo presente na rizosfera das plantas é coletado, homogeneizado e pesado uma amostra composta de 10 g. Esta amostra é transferida para frascos contendo 90 ml de solução salina (anexo) permanecendo sob agitação constante de 150 rpm por 1 hora para fragmentação dos agregados. As raízes e parte aérea são lavadas com água corrente, fragmentadas em pedaços menores, homogeneizadas e amostras de 10 g são pesadas. Para o isolamento de bactérias endofíticas, as amostras são transferidas para frascos estéreis e esterilizadas superficialmente pela imersão em solução aquosa de Cloramina T a 1% (mais eficiente na esterilização de raízes). O tempo de imersão é variado conforme a idade do tecido, ou seja, para tecidos jovens, deve-se proceder a esterilização por 5 minutos, já em tecidos mais velhos este tempo deve ser superior a 10 minutos. Em seguida, as amostras são lavadas três vezes com água destilada estéril e mantidas por 2,5 min. em tampão fosfato 0,05 M, pH 7,0 (anexo), e novamente lavadas 5 vezes com água destilada estéril. Após esterilização, as amostras são trituradas por 1 a 2 min. com 90 ml de solução salina em liquidificador de uso doméstico e mantidas em repouso por 1 hora.

Depois de trituradas e agitadas em solução salina (diluição 10^{-1}) as amostras são diluídas seriadamente, acrescentando-se 1 ml da diluição original a tubos de ensaio contendo 9 ml de solução salina. De cada diluição, uma amostra de 0,1 ml é inoculada em frascos contendo 5 ml dos meios de cultura semi-sólidos (anexo) (figura 1). De acordo com DÖBEREINER et al. (1995) alguns meios de cultivo foram desenvolvidos como semi-específicos para determinados gêneros de bactérias diazotróficas (tabela 1). Os frascos inoculados são incubados a 30°C por um período de até 7 dias, para o

desenvolvimento de película na região superficial do meio. A contagem da população bacteriana é realizada através da técnica do número mais provável (NMP), utilizando a tabela de McCrady para três ou cinco repetições de cada diluição (DÖBEREINER et al., 1995).

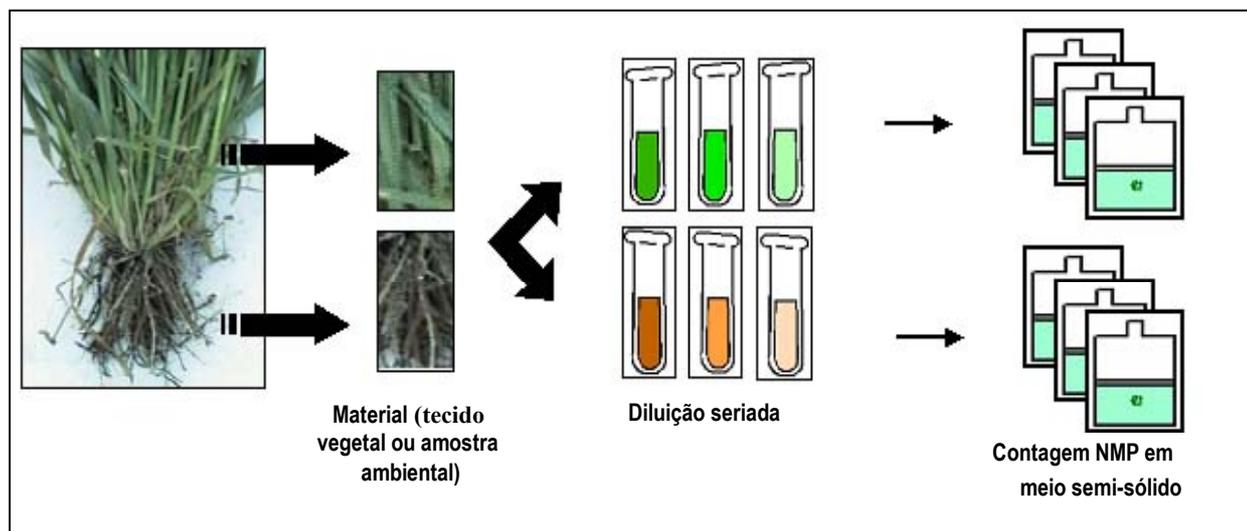


Figura 1. Representação esquemática do processo de isolamento de bactérias diazotróficas de material vegetal.

As amostras dos frascos das duas últimas diluições com crescimento positivo são utilizadas para isolamento de bactérias diazotróficas. Faz-se a reinoculação das culturas para novo meio semi-sólido, como recomenda a metodologia (DÖBEREINER et al., 1995). Posteriormente, as culturas são inoculadas em meio sólido, mantendo-se o sistema a 30°C por 5 dias para a visualização das colônias. As colônias formadas são repicadas para novo meio semi-sólido e após formação de película característica, as culturas são inoculadas novamente em placas de meio sólido Batata, Batata-P ou DYGS (anexo) para confirmação da pureza.

Tabela 1. Meios de cultivo semi-específicos para os gêneros de bactérias diazotróficas comumente encontradas em tecidos vegetais e amostras de solo.

Bactérias / Meio semi-seletivo	JMV	LGI	LGI-P	JNFb	NFb	79	LG +79	Batata	Batata-P
<i>Azoarcus</i> spp							X	X	
<i>Azospirillum</i> spp		X			X			X	
<i>Burkholderia</i> spp	X	X				X		X	
<i>Gluconacetobacter</i> spp			X						X
<i>Herbaspirillum</i> spp				X				X	
<i>Sphingomonas</i> spp		X		X				X	

4.2. Caracterização Fenotípica

4.2.1. Morfologia de Colônia

Algumas espécies de bactérias diazotróficas apresentam características culturais peculiares quando cultivadas sob determinadas condições, por isso, faz-se necessário o cultivo das mesmas em diferentes meios de cultivo clássicos.

As bactérias são cultivadas em diferentes meios como LGI, LGI – P, JNFb, NFb, JMV, Meio 79, Batata, Batata – P, NB e DYGS (Anexo). Nesta etapa são avaliadas características das colônias como: tempo para o aparecimento, coloração, consistência, diâmetro, produção de goma, elevação, forma, bordo, superfície e detalhe óptico. A morfologia das colônias nos diferentes meios de cultura é analisada até os 7 dias de crescimento. A figura 2 mostra representantes de alguns gêneros de bactérias diazotróficas comumente encontrados em plantas não-leguminosas crescidos em seus meios semi-específicos.

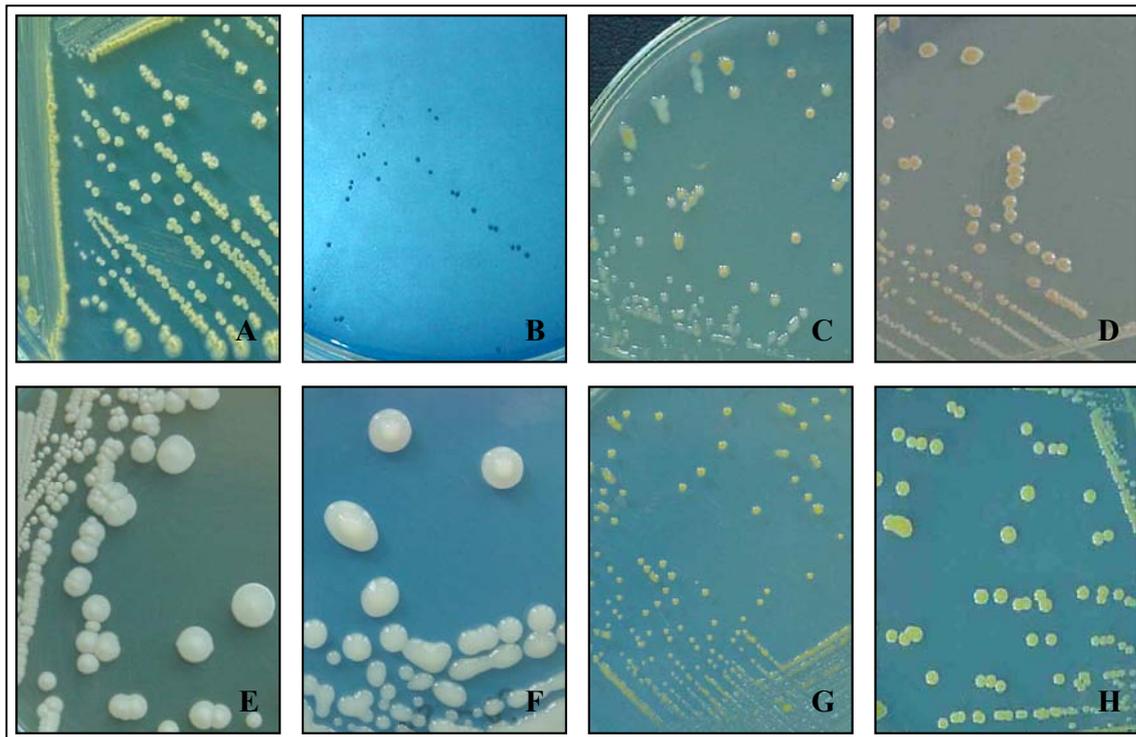


Figura 2. Característica morfológica de algumas bactérias diazotróficas cultivadas em meios sólidos semi-específicos. **A.** *Azospirillum amazonense* em meio LGI; **B.** *Herbaspirillum seropedicae* em meio NFB; **C.** *Burkholderia kururiensis* em meio JMV; **D.** *Burkholderia tropica* em meio JMV; **E.** *Derrxia* spp em meio LG; **F.** *Beijerinckia* spp em meio BJ; **G** *Gluconacetobacter diazotrophicus* em meio LGI-P; **H.** *Sphingomonas* spp em meio Batata.

4.2.2. Morfologia Celular

Microscopia Óptica

O exame microscópico é a primeira etapa do estudo e identificação de um microrganismo e permite observar e analisar a forma, tamanho, organização/agrupamento e mobilidade das células dos microrganismos. No exame com células vivas, a suspensão bacteriana em meio de cultura é posicionada entre a lâmina e a lamínula e observado ao microscópio óptico utilizando a objetiva de 40X e 100X (usando óleo de imersão) (figura 3).

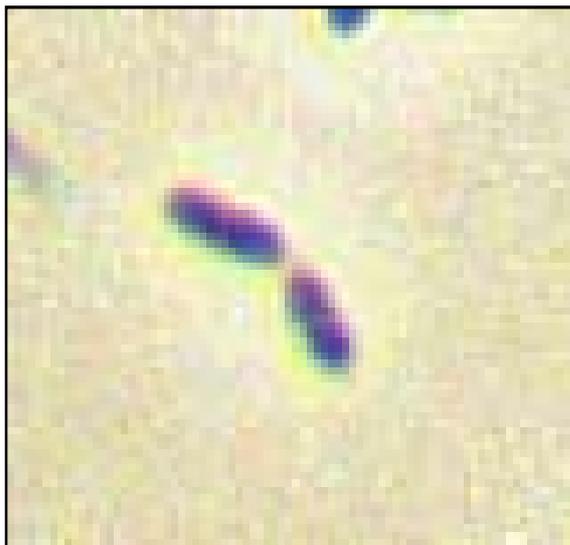


Figura 3. Fotomicrografia em microscópio óptico de células bacterianas cultivadas em meio líquido.

Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

O objetivo desta técnica é permitir que, através de procedimentos rápidos e simples, obtenha-se uma boa qualidade de imagens no que se refere a visualização de flagelos, formação de PHB, dentre outras características

As bactérias são crescidas em placas contendo meio sólido DYGS por 48 horas a 30°C. Posteriormente ao período de incubação, colônias isoladas de cada placa são selecionadas e isoladas utilizando bastões de vidro oco. No interior do bastão, 100 µl de água destilada estéril são adicionados e após 10 min. de imersão, uma gota da suspensão é depositada sobre uma placa de cera. Uma grade de cobre, previamente preparada com um filme de Formvar 0,4% em clorofórmio, é colocada sobre a suspensão bacteriana durante 2 min.. A grade é lavada por 2 min. em água destilada estéril e em seguida, contrasta-se as bactérias com uma solução de acetato de uranila 5% por 2 min.. Após a retirada do excesso do contrastante, a grade é seca sob papel de filtro por 2 horas, para posterior visualização ao microscópio eletrônico de transmissão (MET) (VIDEIRA et al., 2003) (figura 4).

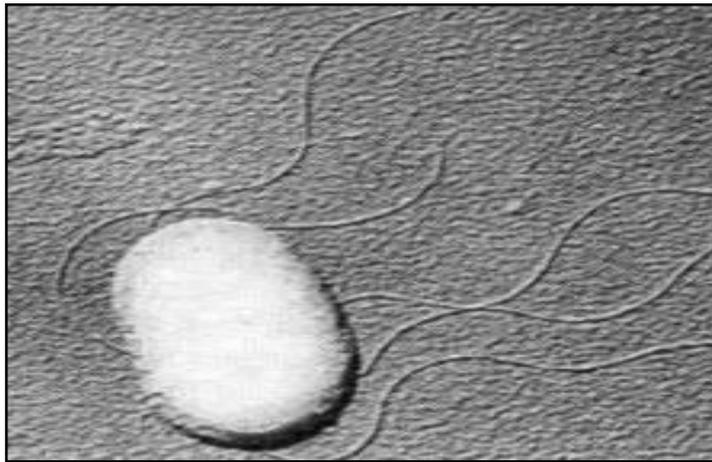


Figura 4. Fotomicrografia de *Gluconacetobacter diazotrophicus* por MET. Imagem disponível em <https://www.cnpab.embrapa.br/pesquisas/gp.html>

4.2.3. Presença de cápsulas

As cápsulas bacterianas desempenham funções na aderência, virulência, proteção, captura de nutrientes e reconhecimento intercelular. As cápsulas variam em espessura e podem atingir até 2 vezes o volume do organismo. Quando mais bem definidas são denominadas cápsulas e quando mais amorfas são chamadas de camadas limosas ou glicocálix. As cápsulas e as camadas limosas não são essenciais à viabilidade celular e algumas linhagens dentro de uma espécie produzem cápsulas enquanto que outras não. Cápsulas são frequentemente perdidas durante a cultura *in vitro*.

É possível visualizar a cápsula, pela coloração negativa com tinta-da-china por via húmida, dado que a cápsula rejeita as partículas de tinta-da-china. As células produtoras de cápsula vêm-se (com a objetiva de 40x), descoradas sobre fundo negro. Pode-se também observar a cápsula utilizando uma variante da coloração anterior em que se aplica fucsina diluída sobre um esfregaço seco das células, com tinta-da-china (YANO et al., 1991). As células produtoras de cápsula vêm-se (com a objetiva de 100x), coradas de rosa, rodeadas por halos incolores, sobre fundo negro (figura 5).

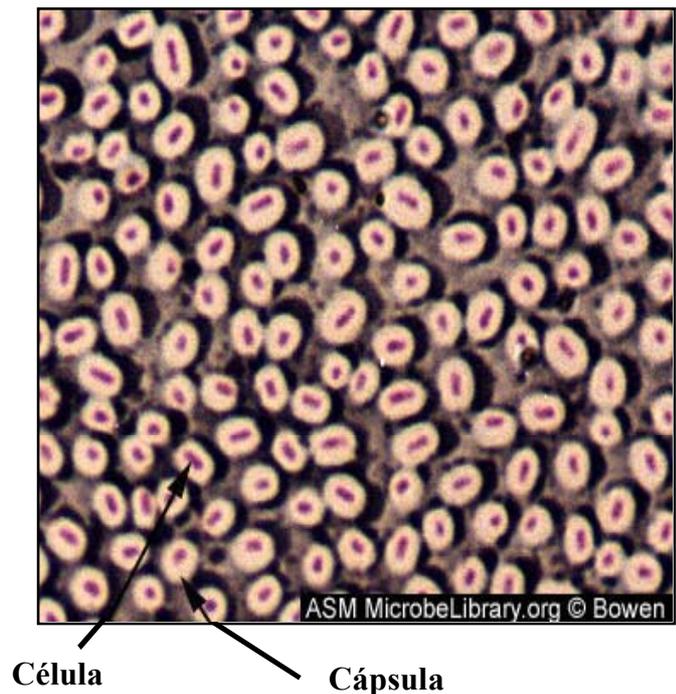


Figura 5. Células bacterianas visualizadas após coloração com tinta-da-china específica para coloração de cápsulas bacterianas. Imagem disponível em <http://pathmicro.med.sc.edu/fox/capsule.jpg>.

4.3. Caracterização Bioquímica e Fisiológica

4.3.1. Coloração de Gram

A coloração de Gram é uma técnica de preparações histológicas para observação ao microscópio óptico, utilizada para corar diferencialmente microrganismos com base na composição química e integridade da sua parede celular (GRAM, 1883). Consoante a cor que adquirem, são classificados em Gram positivos (roxo) ou Gram negativos (vermelho) (figura 6).

De acordo com o protocolo sugerido por YANO et al. (1991), esta técnica consiste em preparar um esfregaço em lâmina de vidro; secar ao ar e fixar em chama; cobrir a lâmina com cristal violeta por 30 segundos a 1 minuto; lavar em água corrente; cobrir a lâmina com lugol por 2 minutos; lavar com água corrente; descorar rapidamente com álcool-acetona; lavar a lâmina; cobrir com safranina ou fucsina diluída por 30 segundos; e por fim, lavar a lâmina com água, secar e avaliar.

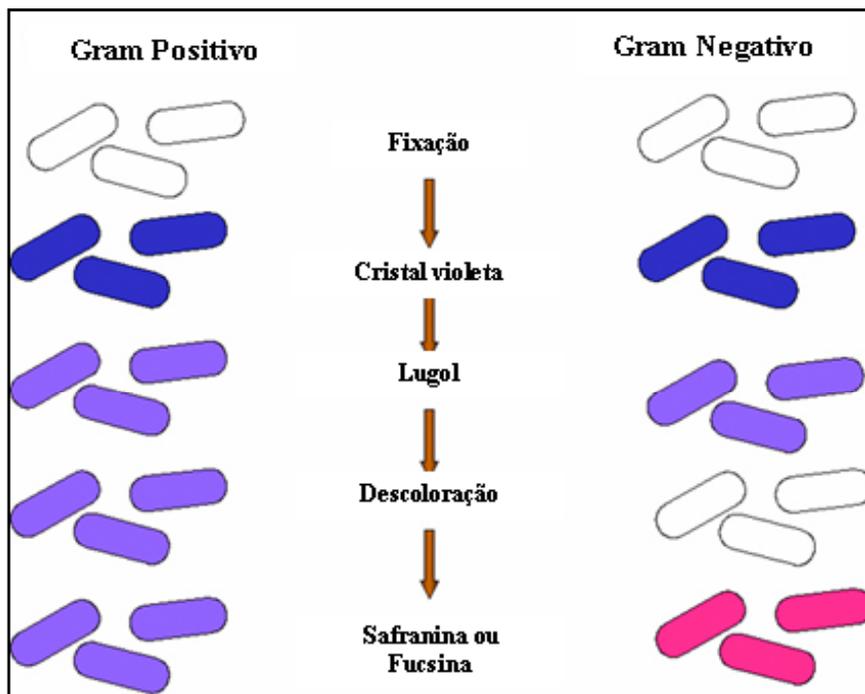


Figura 6. Representação esquemática da técnica de coloração de Gram. Imagem modificada de <http://pathmicro.med.sc.edu/fox/gramst.jpg>

4.3.2. Teste de oxidase

A oxidase é uma enzima encontrada em algumas bactérias que transferem elétrons ao oxigênio, que atua como aceptor final do elétron. A presença da oxidase pode ser detectada com o uso de uma solução de TEMED (KOVACS, 1956).

Uma alíquota de 50 µl de suspensão bacteriana é depositada em tiras de papel de filtro. Posteriormente, uma gota de solução aquosa de TEMED (1%) (N-N-dimetil-p-fenilenediamino) é depositada sob a cultura no papel de filtro. Se as bactérias oxidarem o reagente, aparecerá uma coloração roxa, indicando um teste positivo. Nenhuma mudança da cor indicará um teste negativo (figura 7).

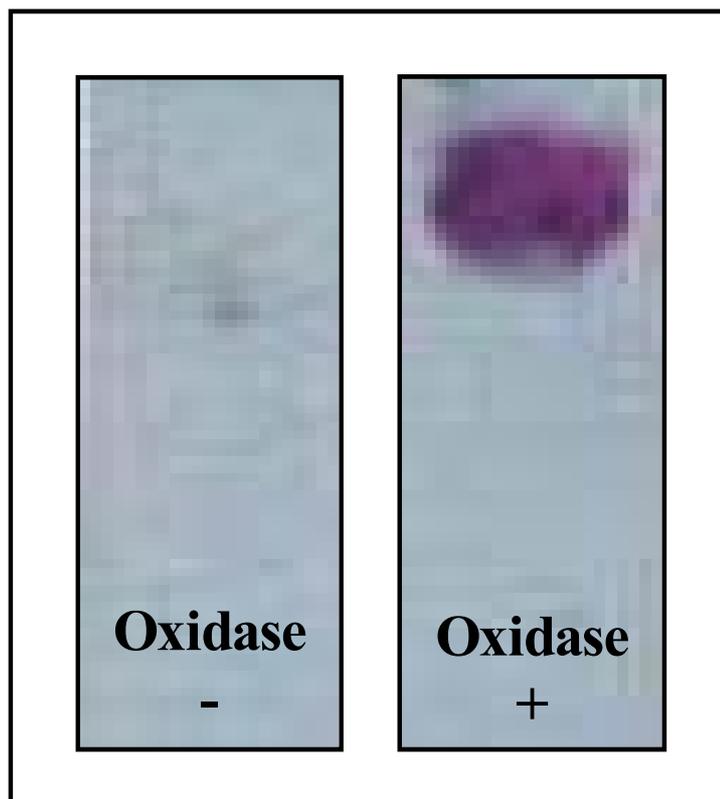


Figura 7. Representação do resultado do teste de oxidase. Imagem disponível em <http://medic.med.uth.tmc.edu/path/oxidase.htm>

4.3.3. Teste da catalase

O teste da catalase é usado na detecção de catalase em bactérias, servindo para a distinção de bactérias. Uma gota de peróxido de hidrogênio a 3% (v/v) é depositada sob uma amostra (uma gota de cultura líquida do microorganismo a ser testar ou cultura crescida em placa de petri) é então esfregada nesta gota (YANO et al., 1991). Se aparecem bolhas, o organismo é catalase-positivo, se não é catalase-negativo. As bolhas são formadas pelo oxigênio molecular libertado na reação da catalase (figura 8).



Figura 8. Representação do resultado do teste de catalase. Imagem disponível em <http://www.uma.pt/gcosta/docs/microbiology/prat4.pdf>

4.3.4. Hidrólise de Tween-80

Para a determinação da atividade esterásica é utilizado o meio de cultura descrito por SIERRA (1957), contendo (g L^{-1}): peptona 10, NaCl 5, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,1, ágar 18,0, pH 7.4. Após a esterilização do meio de cultura, adiciona-se Tween 80 (previamente esterilizado) numa concentração final de 1% (v/v). O meio é vertido sob placas de Petri esterilizadas e após solidificação, as bactérias previamente crescidas são inoculadas (YANO et al., 1991). A presença de halo transparente ao redor das colônias indica atividade positiva (figura 9).



Figura 9. Representação do resultado do teste de hidrólise de tween 80. Imagem disponível em <http://www.biodiesel.gov.br/docs>

4.3.5. Teste da gelatinase

A gelatinase é uma enzima proteolítica que permite que um organismo vivo hidrólise a gelatina em outras sub-unidades (polipeptídeos, peptídeos, e aminoácidos) que pode cruzar a membrana e ser usado pelo organismo.

Para este teste, as bactérias são crescidas em tubos de ensaio contendo 8 ml de meio preparado com extrato de levedura (3g L^{-1}), peptona (5g L^{-1}) e gelatina (B.D.H.) (120g L^{-1}). Após incubação por 24 horas, os tubos são transferidos para geladeira por 2 horas e depois para nova incubação, a operação é repetida durante 5 dias (YANO et al., 1991). A presença das enzimas proteolíticas extracelulares é indicada pela liquefação do meio de cultura após refrigeração (figura 10).

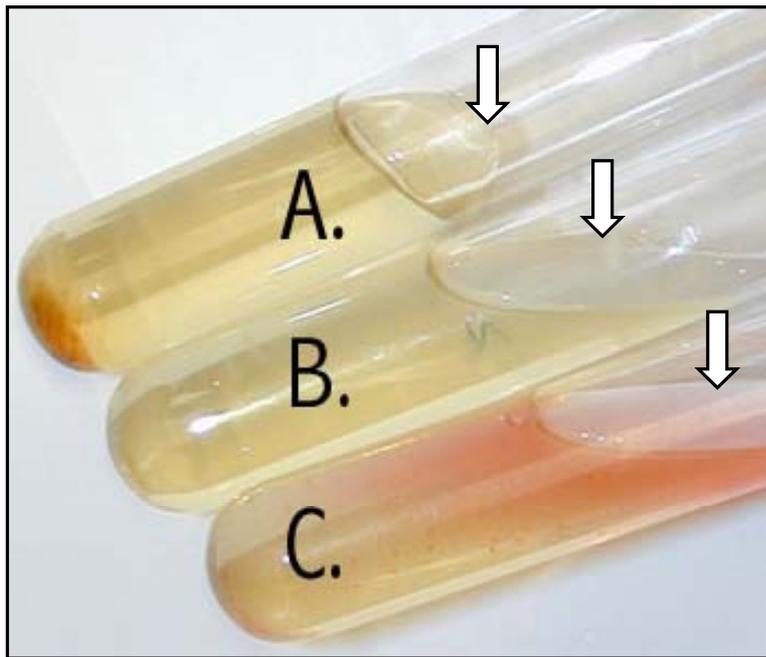


Figura 10. O tubo A descreve reação da gelatinase negativa (meio semi-sólido), já os tubos B e C a reação de hidrólise foi positivas (meios líquidos). Imagem disponível em <http://homepages.wmich.edu/~rossbach/bios312>

4.3.6. pH ótimo para crescimento

Um nível adequado de acidez é muito importante para o desenvolvimento de bactérias. A maioria de procariotos podem crescer sobre uma escala de 3 unidades de pH. Para a maioria das bactérias há um aumento na taxa de crescimento entre o pH mínimo e o ótimo e uma diminuição correspondente na taxa de crescimento entre o pH ótimo e o máximo, refletindo o efeito geral da mudança nas taxas da reação enzimática. Os Microrganismos que crescem em um pH ótimo abaixo da neutralidade são chamados acidófilos (1.0 – 5.5), aqueles que crescem melhor no pH neutro são chamados os neutrofilos (5.5 – 8.0) e aqueles que crescem melhor sob circunstâncias alcalinas são chamados alcalifilos (8.0 – 11.5).

No uso de meios de cultura, deve-se sempre considerar o pH ótimo para o crescimento de um organismo e incorporar tampões a fim de manter o pH no equilíbrio mesmo após excreção de substâncias pelos organismos.

A influência do pH para o desenvolvimento de bactérias diazotróficas deve ser avaliada em frascos contendo meio de cultura semi-sólido

sem nitrogênio e sob condições ótimas de crescimento, em tubos contendo meio líquido. Os frascos e tubos com os diferentes pH's (4,0; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 9,0) são inoculados com 30 µl de suspensão bacteriana. Os frascos são incubados durante 10 dias a 30°C e os tubos, mantidos à temperatura de 30°C, sob agitação de 150 rpm por 48 horas.

4.3.7. Temperatura ótima para crescimento

Os microrganismos são encontrados crescendo em todos os ambientes onde há água líquida, não obstante sua temperatura (BROCK & BROCK, 1966). Considerando a extensão total da temperatura onde a água líquida existe, os procariotos podem ser subdivididos em diversas subclasses de crescimento. Aqueles que crescem melhor em temperaturas medianas neste espectro são denominados mesófilos, as quais incluem todos os patógenos e oportunistas humanos; os que crescem melhor em temperaturas mais baixas ou mais altas são respectivamente denominados psicrófilos e termófilos. Alguns autores ainda consideram as bactérias hipertermófilas, que conseguem crescer em ambientes com temperatura de até 120°C.

A temperatura ótima para o crescimento das bactérias diazotróficas é avaliada sob condições de fixação de nitrogênio, em frascos contendo 5 ml de meio de cultura semi-sólido sem nitrogênio. Os frascos são inoculados com 30 µl de suspensão bacteriana e incubados durante 10 dias a temperaturas de 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44 e 46°C.

4.3.8. Tolerância a NaCl e Sacarose

Alguns microrganismos colonizam ambientes com elevados teores salinos, como solos e lagos salinos, sendo a salinidade facultada pelo NaCl. Possuem para tal, mecanismo de osmo Adaptação que consistem em evitar a desidratação da célula. (<http://students.fct.unl.pt/~fsp13109/microbiologia/monografia.doc>).

Para esta avaliação as bactérias são crescidas em meio líquido por 24 horas a 30°C. Após este período, uma alíquota de 1 ml de cultura é transferida para um microtubo de 2 ml e este submetido a centrifugação a 8.000 rpm a 25°C por 4 min. O sobrenadante é descartado e as células ressuspendidas em 1 ml de tampão fosfato

0,05M estéril (anexo). O processo de lavagem das células é repetido três vezes. Em seguida, alíquotas de 100 µl são inoculadas em placas de Petri contendo meio DYGS sólido com diferentes concentrações de NaCl (0, 10, 20, 30, 50, 80 e 100 g L⁻¹) e espalhados com alça de Drigalsky. Na avaliação de tolerância a salinidade, é observada a presença ou ausência e intensidade de crescimento no meio de cultura, após 6 dias de incubação a 30°C.

Para avaliar a tolerância a sacarose, diferentes concentrações de sacarose (2%, 5%, 10% e 20%), esterilizadas em filtro milipore 0,22 µm, são adicionadas a frascos contendo 5 ml de meio semi-sólido semi-específico pH 6,0, sem a fonte de carbono comumente utilizada. Os frascos são incubados a 30 °C e avaliados durante 7 dias quanto a formação de película.

4.3.9. Metabolismo de Carbono

BIOLOG

O teste Biolog MicroPlates avalia a habilidade de um organismo em utilizar ou oxidar 95 diferentes fontes de carbono. Este método é considerado um teste muito distintivo e repetitivo para cada organismo – sendo denominado pela literatura como *Fingerprinting Metabolic*.

As bactérias são crescidas em meio líquido a 30°C por 24 horas sob agitação de 150 rpm, riscadas, 2 vezes consecutivas, em meio DYGS sólido e incubados por 48 horas a 30°C. Em seguida são riscadas em meio sólido BUG (Kit BIOLOG) e incubadas por 24-48 horas a 30°C. Após este período, as colônias são retiradas cuidadosamente das placas com o auxílio de um cotonete estéreis (*swab*) e suspensas em um fluido inoculante (Kit BIOLOG) ajustando a concentração das células para 52% de transmitância (\pm 3%) com o auxílio de um espectrofotômetro com filtro de 590 nm.

Com o uso de um pipetador multicanal, 150 µl desta suspensão é adicionado em cada um dos 96 poços das microplacas BIOLOG GN2 (Kit BIOLOG) (figura 11). As placas são tampadas e incubadas a 30°C, sendo as avaliações realizadas as 4 e 24 horas após incubação. A cor púrpura resultante da utilização das diferentes fontes de carbono é caracterizada como crescimento positivo.

O Biolog Microlog® é um sistema de identificação bacteriano que consiste em três bases de dados combinadas para as bactérias gram-positivas e gram-negativas. Este sistema pode ser inteiramente automatizado, com um leitor da placa, ou os resultados das placas podem ser incorporados manualmente dentro da base de dados.

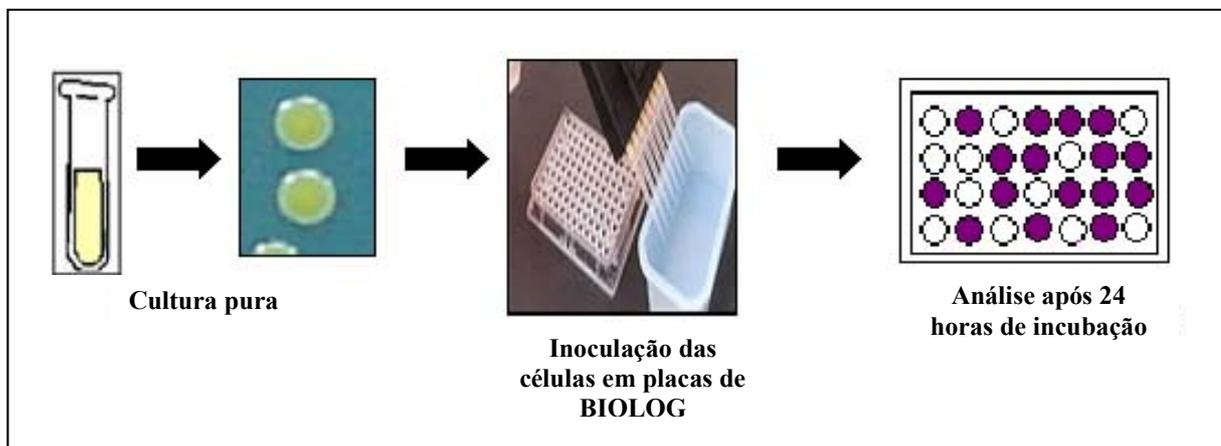


Figura 11. Representação esquemática de técnica de BIOLOG.

Fontes de carbono semi-específicas

Para avaliar o crescimento sob condições de fixação biológica de nitrogênio e estabelecer uma comparação com os padrões de bactérias diazotróficas já descritas, são comumente utilizados os meios semi-sólidos semi-específicos livres de nitrogênio. O inoculo é obtido a partir do cultivo das bactérias em meio líquido, por 24 h a 30°C sob agitação de 150 rpm. Em seguida, 30 µl são inoculados em frascos contendo 5 ml de meio de cultivo semi-sólido e estes incubados a 30°C. As avaliações são feitas até ~ 7 dias após inoculação, sendo considerado como crescimento positivo, aqueles frascos onde houve formação de película na superfície do meio de cultivo.

Fontes de carbono variadas

Para esta avaliação deve-se utilizar um meio semi-sólido como base, com pH 6,0, substituindo-se a fonte de carbono utilizada por outras fontes como sacarose, meso-inositol, adonitol, myo-inositol, raffinosa, manitol, meso-erytritol, malato, glucose, maltose, entre outras. Todas as fontes de carbono são dissolvidas em solução tampão fosfato 3mM pH 6, esterilizadas em filtro milipore e preparadas para uma

concentração final no meio de cultura de 0,5%. A obtenção do inóculo e as avaliações são feitas conforme o item anterior.

Quantificação da redução de acetileno

A quantificação da atividade de reduzir nitrogênio, realizada pelo complexo nitrogenase, pode ser medida pela atividade de redução do acetileno, inibidor competitivo da enzima nitrogenase. A técnica da atividade de redução de acetileno (ARA) foi descrita por BODDEY et al. (1990) e a atividade específica é quantificada dividindo-se a atividade total de ARA pela proteína celular acumulada pela cultura e determinada pelo método de proteínas totais descrito por LOWRY et al. (1951).

Os isolados são cultivados em meio líquido, e uma alíquota de 20 μ l da cultura crescida inoculada em frascos, com capacidade de 10 ml, contendo 5 ml de meio de cultura semi-sólido semi-específico. Posteriormente procede-se a incubação dos frascos a 30°C por 48 h. Após a formação da película na superfície do meio de cultura, os frascos são fechados com rolhas de borracha perfurável (tipo *sub seal*) e 10% da fase gasosa (0,5 ml) do frasco é injetada com acetileno com o auxílio de uma seringa. Após a injeção nas amostras e no branco, contendo apenas o meio de cultura sem bactérias, os frascos são incubados por 1 hora a 30°C. A seguir procede-se a quantificação do etileno produzido através da injeção de 0,5 ml da fase gasosa das amostras em cromatógrafo de gás com ionização de chama.

Após leitura de ARA, as amostras são homogeneizadas para que haja uma difusão da película no meio e realizada a determinação de proteínas totais, seguindo a metodologia descrita por LOWRY et al. (1951) e modificada por RODRIGUES (2004). Em tubos de ensaio, são adicionados 0,1 ml de amostra, 0,4 ml de água destilada estéril, para diluir a amostra e não saturar o método e, 0,5 ml de NaOH 1M. As amostras são homogeneizadas em vortex e acomodadas em banho-maria a 100°C por cinco min. para lisar as células e desnaturar o agar. Após atingir temperatura ambiente, adiciona-se aos tubos 0,25 ml de reagente de Lowry, agita-se no vortex e incuba-se por 10 min. no escuro a temperatura ambiente. Em seguida é adicionado aos tubos 0,5 ml da solução do Reativo Fenol Ciocalteau, diluído em um volume de reagente para dois volumes de água destilada estéril, agita-se e incuba-se os tubos no escuro por 30 min. Após incubação, efetua-se a

leitura de absorbância em espectrofotômetro com filtro de 750 nm (figura 12).

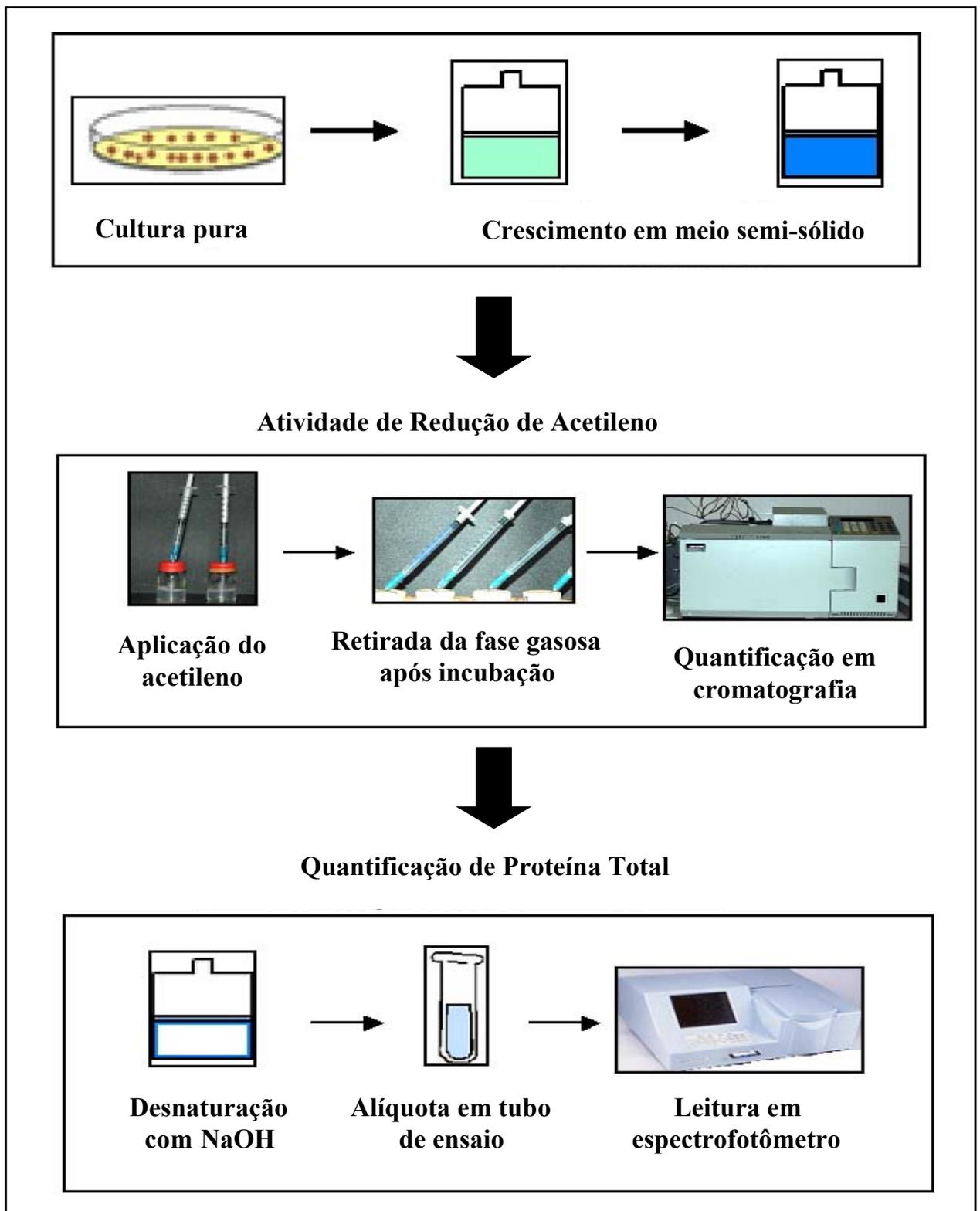


Figura 12. Representação esquemática da determinação da FBN para bactérias em cultura pura.

Os valores de absorvância das amostras são multiplicados por 10 (correção pelo uso de 100 µl de amostras, para obter o resultado em ml) e a concentração de proteínas é determinada através de uma curva padrão obtida pelos valores de absorvância de amostras com quantidades conhecidas da proteína albumina bovina. O valor da concentração de proteína é multiplicado pela quantidade de meio de cultura em que a bactéria estava crescendo.

A atividade de redução de acetileno é dada por nmol de etileno produzido por hora de incubação (geralmente uma hora) e dividido pelo valor de absorvância obtido pela análise de proteínas totais, resultando em nmol de etileno por mg de proteínas totais, quantificando desta maneira a atividade da nitrogenase dos isolados.

4.4. Caracterização molecular

4.4.1. Extração de DNA

O primeiro passo para a utilização de técnicas moleculares é a obtenção de DNA de qualidade. Vários autores descrevem problemas no isolamento e purificação de DNA de espécies bacterianas, sendo estes resultantes principalmente do co-isolamento de polissacarídeos e compostos secundários. O método mais utilizado com sucesso para diferentes espécies é o baseado no uso do detergente CTAB. Esse detergente solubiliza as membranas, formando com o DNA um complexo que facilita uma posterior precipitação (WEISING et al., 1995). A maioria dos protocolos descritos na literatura utiliza o protocolo CTAB padrão, com algumas modificações, com vistas a resolver problemas específicos da espécie em estudo. Outros protocolos freqüentemente empregados são variações do descrito por DELLAPORTA et al. (1983). Esses métodos se fundamentam na precipitação simultânea de proteínas e polissacarídeos na presença de SDS e altas concentrações de acetato de potássio.

Além destes métodos, alguns métodos bem simples podem ser utilizados com sucesso, como é o caso da extração do DNA pelo método da fervura-centrifugação (figura 13) e a lise alcalina, procedimento empregado durante a extração de DNA visando à destruição da bactéria por lisozimas. Atualmente muitas empresas têm disponibilizado Kits com procedimentos rápidos e eficientes na

extração de DNA com alta pureza como, por exemplo, o Kit QUIamp[®] DNA (QIAGEN[®]).

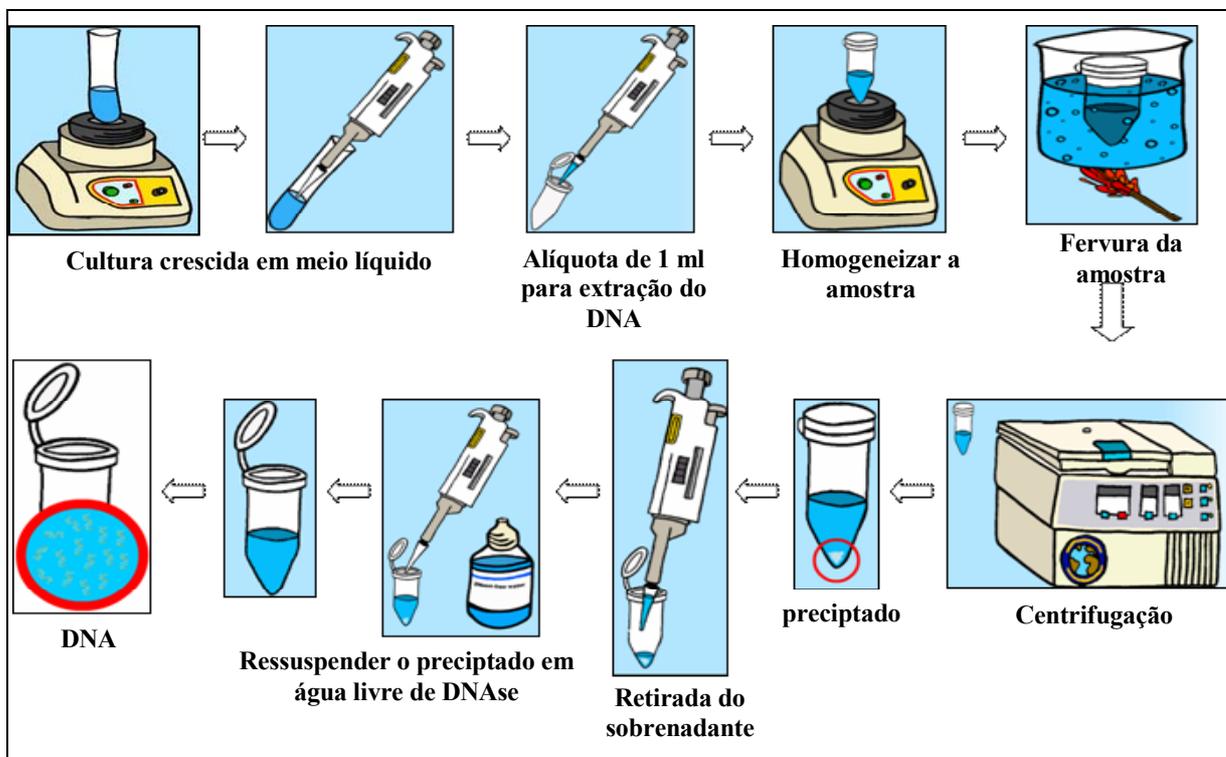


Figura 13. Representação esquemática da extração de DNA bacteriano pelo método da fervura-centrifugação. Imagens modificadas de <http://pcrfilme.vilabol.uol.com.br/>

4.4.2. Análise do gene 16S RNAr

Amplificação do gene 16S RNAr

O gene 16S RNAr pode ser amplificado através de diversas combinações de iniciadores específicos. A combinação de iniciadores utilizada universalmente é a descrita por YOUNG et al. (1991). Onde Y1 (5'-TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC-3') e Y3 (5'-CTAGACCCCACTTCAGCATTGTTCCAT-3') são utilizados para amplificar a região 16S RNAr. Em nossas condições de trabalho, a reação, com volume final de 50 μ l, consistiu na mistura de 10% do volume final, de tampão de PCR 10 X; 2 mM de $MgCl_2$; 200 μ M de dNTP; 0,12 μ M de cada iniciador, 1 U da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen[®]) e de 50 ng de DNA. Em seguida o material preparado é colocado num termociclador e submetido ao programa de amplificação cujos ciclos determinados para nossas condições de trabalho são: um ciclo de desnaturação (93°C por dois min.), seguido de 35 ciclos

intermediários (93°C por 45 segundos, 62°C por 45 segundos e 72°C por 2 min.), e um ciclo final de extensão (72°C por cinco min.) seguido por resfriamento (4° C por 24 horas).

Após o término do programa, os produtos destas ampliações são separados por eletroforese em gel de agarose 1,0%, fundido em tampão TAE 1 X (anexo). O gel fica submerso em tampão de corrida TAE 1X e em cada poço do gel aplica-se 2-5 µl de amostra juntamente com 2 µl de tampão de amostra (anexo), e submetido a voltagem de 100 volts por 60 min. para promover a migração das amostras. Em seguida, o gel é corado em solução de brometo de etídeo e visualizado com luz ultravioleta.

Restrição dos fragmentos amplificados por PCR

Os produtos de amplificação das regiões 16S RNAr das bactérias são digeridos com endonucleases de restrição em reações separadas. A digestão ocorre de maneira diferenciada para cada enzima utilizada. De modo geral, a reação dura em média 2 horas em uma temperatura de 37°C em um volume de reação de 10 µl contendo 0,5 µl de enzima, 1 µl de tampão 10X, 5 µl do produto de PCR e água para completar o volume de reação.

Todo volume da reação é submetido a eletroforese em gel de agarose a 2-3% com tampão TAE 1X a 50V por 4 h. Os produtos de cada reação são visualizados após coloração com brometo de etídeo sob iluminação ultravioleta (figura 14).

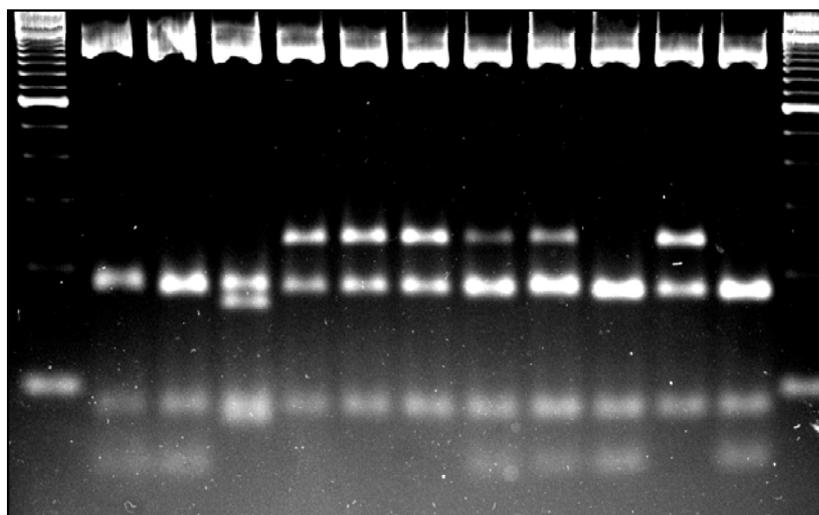


Figura 14. Exemplo de perfil de restrição dos fragmentos amplificados da região 16S RNAr de *Sphingomonas* spp após digestão com a enzima *MboI* (VIDEIRA et al., 2007).

Seqüenciamento do gene 16S RNAr

◆ Purificação do DNA

Os produtos de amplificação do gene 16S RNAr são purificados com uma reação de 8 µl de NaCl 5M, 40 µl de polietilínoglicol 8000 22% e 32 µl do material amplificado. A mistura é incubada a 4°C durante a noite, e após incubação é centrifugada a 14000 rpm por 30 min., o sobrenadante é descartado e o precipitado lavado com 500 µl de etanol 70%. Posteriormente a lavagem, a mistura é centrifugada a 4°C por 15 min., seca ao ar e ressuspendida em 20 µl de água milli-Q esterilizada. O material é submetido à eletroforese em gel de agarose 1% visando verificar a qualidade do material purificado e estimar a concentração para posterior reação de seqüenciamento.

◆ Reação de seqüenciamento

Para o seqüenciamento do gene 16S DNAr são utilizados, em média, 200-300 ng do produto de PCR purificado, 1,0 µl de oligonucleotídeos (5,0 µM) arrolados na tabela 4, TE Dynamics Kit (Amersham Biosciences) e água ultrapura (ultraPURE™, Invitrogen Co.) para o volume final de 20 µl. As condições de reação utilizadas para nossas condições de trabalho são: 30 ciclos a 95°C por 20 seg., 50°C por 15 seg.; 60°C por 1 min.. Após a reação de seqüenciamento, as amostras são precipitadas adicionando 1,0 µl de acetado de amônio 7,5M e 27,5 µl de etanol 70% e permanecem a 4°C durante a noite. Posteriormente a incubação, as mesmas são centrifugadas a 14.000 rpm por 30 min. a 4°C, o sobrenadante é descartado e o precipitado lavado com 150 µl de etanol 70% e centrifugado 14000 rpm por 5 min. a 4°C. As amostras são secas ao ar, e ressuspendidas em 7,5 µl de tampão de amostra e analisadas em seqüenciador automático.

Tabela 3. Iniciadores utilizados para amplificação e seqüenciamento do gene 16S DNAr de bactérias diazotróficas no laboratório de genôma da Embrapa Agrobiologia.

Iniciadores	Seqüência (5'-3')	Referência
Y1	TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC	YOUNG et al., 1991
Y2	ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG	YOUNG et al., 1991
Y3	CTGACCCCACTTCAGCTTGTTCAT	CRUZ et al., 2001
16S362f	CTCCTACGGGAGGCAGTGGGG	SOARES-RAMOS et al., 2003
16S786f	CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG	SOARES-RAMOS et al., 2003
16S1203f	GAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTC	SOARES-RAMOS et al., 2003
16S1110r	TGCGCTCGTTGCGGGACTTAACC	SOARES-RAMOS et al., 2003
16S805r	GACTACCAGGGTATCTAATCCTG	SOARES-RAMOS et al., 2003

4.4.3. Identificação com iniciadores específicos

Na literatura é possível encontrar alguns pares de iniciadores gênero ou espécie-específico para as bactérias diazotróficas encontradas em tecidos vegetais e amostras ambientais.

Como exemplo, na utilização do par de iniciadores gênero-específico para *Sphingomonas* spp (VIDEIRA et al., 2007)., o DNA genômico é submetido à amplificação em PCR com volume final de 50 µl, contendo 50 ng de DNA molde, 0,2 µM dos iniciadores 108f (5-GCGTAACGCGTGGGAATCTG-3 e 420r (5-TTACAACCCTAAGGCCTTC-3; 200 µM de cada dCTP, dGTP, dATP e dTTP (InvitrogenTM); 3,75 mM de MgCl₂ e 2 U de Taq DNA polimerase (InvitrogenTM). A mistura é colocada em termociclador PTC-100 (MJ Reserch, Inc. USA), programado para gerar uma desnaturação inicial de 4 minutos a 94°C e 30 ciclos de 94°C, 1 minuto; 56°C, um minuto; 72°C, 2 minutos; seguidos de uma fase final de 10 minutos a 72°C.

O produto da reação é separado por eletroforese em tampão TAE 1X, utilizando gel de agarose a 1%, contendo 5 µg ml⁻¹ de brometo de etídio. A corrida é realizada a 100 V, sendo aplicados 5 µl do produto de reação com 2 µl de tampão de carregamento por poço do gel. O marcador de peso molecular *DNA Ladder* de 1 kb (InvitrogenTM) deve sempre ser utilizado como padrão. A visualização das bandas é realizada sob luz ultravioleta (figura 15).

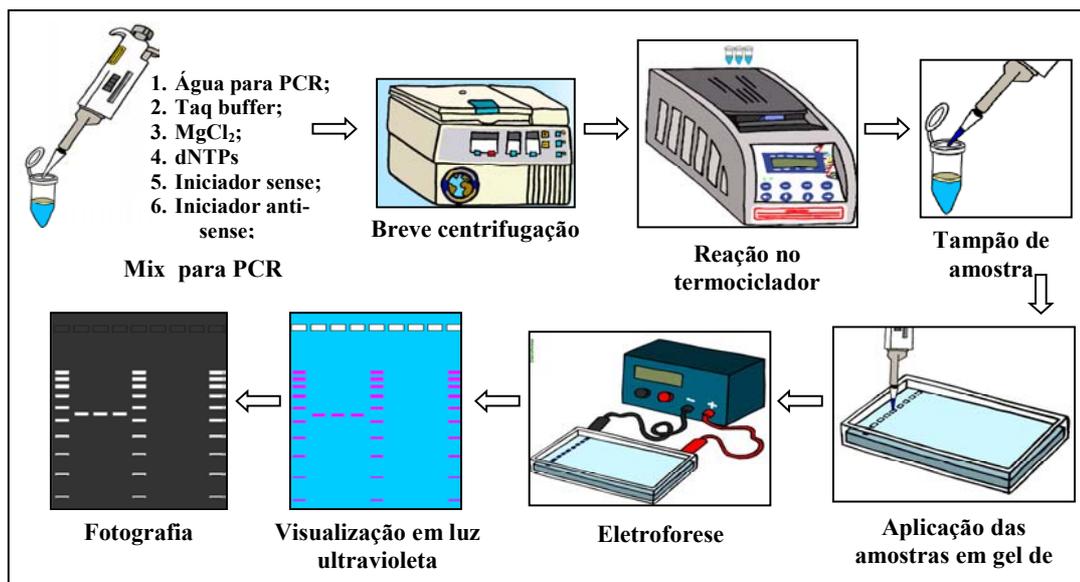


Figura 15. Representação esquemática da técnica de PCR e eletroforese em gel de agarose. Imagens modificadas de <http://pcrfilme.vilabol.uol.com.br/>

4.4.4. Hibridização DNA:DNA

Nesta técnica são analisadas as bactérias previamente selecionadas contra as espécies mais próximas observada pelo seqüenciamento da região 16S RNAr e outros parâmetros analisados.

A reação inicial de digestão do DNA genômico é feita com 8 µg de DNA, tampão 10X e enzima de restrição. As amostras são incubadas durante a noite a 37°C e a digestão visualizada em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo. Após digestão completa, 3 µg de DNA é separado em gel de agarose 1%, submetido à voltagem de 20 V por 24 horas em tampão TAE 1X. O gel é preparado para transferência, após lavagens sucessivas nas soluções de **depuração**: lavagem de 7 min. sob leve agitação com uma solução de HCl 0.25 N, seguida de três lavagens com água destilada; **desnaturação**: duas lavagens consecutivas de 45 min. com solução de NaOH 0.5N + NaCl 1.5M e posterior lavagem com água destilada; e **neutralização**: duas lavagens finais com solução de SSC6X de 60 min. e posterior lavagem com água destilada.

O processo de transferência do DNA para a membrana de nitrocelulose ocorre por capilaridade em solução de SSC10X durante a noite. O DNA é fixado na membrana através da incubação da membrana a 80°C durante 2 horas.

Como sonda para a hibridização é utilizado 100 ng de DNA da espécie mais próxima eluídos em 20µl de água destilada. O DNA passa por um processo de desnaturação durante 5 min. a 95°C e em seguida é marcado com P³². A membrana é tratada com sonda marcada e o processo de hibridização ocorre durante a noite. A membrana sofre lavagens sucessivas com solução SSC3x SDS 10% durante 30 min., solução SSC1X durante 30 min. e solução SSC 0.1X até eliminar o excesso de radioatividade presente.

A membrana é acomodada em cassete e exposto a um filme de raio X a – 80°C por 2 dias. O filme de raio X é revelado pela imersão em solução reveladora Kodak D 79 (anexo), lavagem em água e para finalizar solução fixadora (anexo) para filme (figura 16).

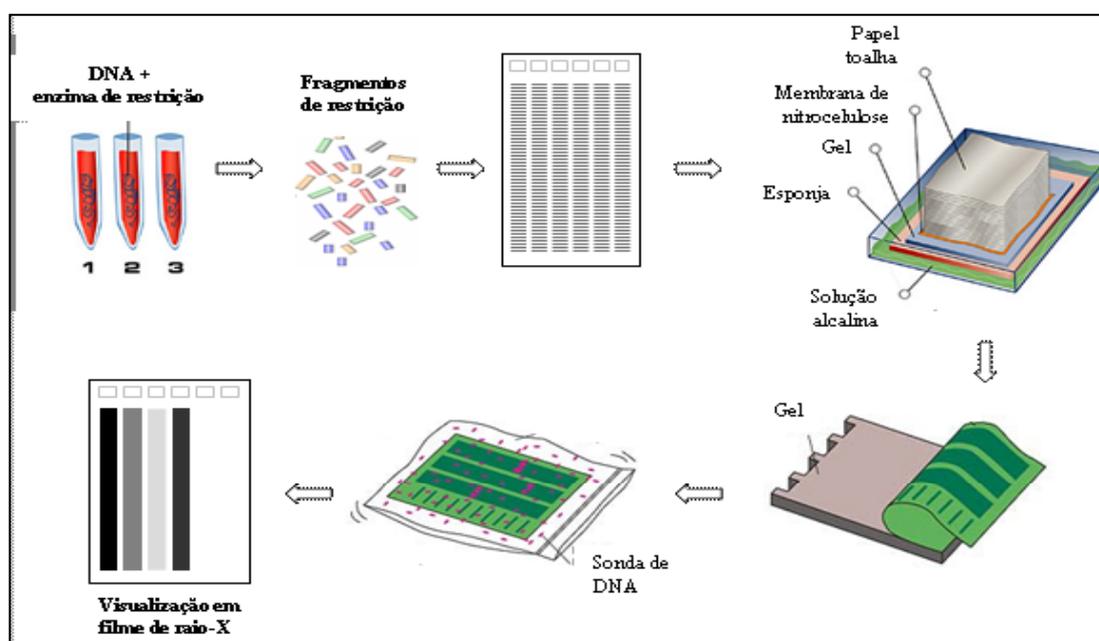


Figura 16. Representação esquemática da técnica de hibridização DNA:DNA. Imagens modificadas de <http://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/dna/southernblot.jpg> e http://www.learner.org/channel/courses/biology/images/archive/detail/1866_d.jpg.

4.4.5. Polimorfismo do Tamanho de Fragmentos Amplificados (AFLP)

Digestão com enzimas de restrição e ligação dos adaptadores

Para os trabalhos de AFLP no laboratório de genética e bioquímica da Embrapa Agrobiologia é utilizado o kit AFLP – Core Reagent Kit[®]

(Invitrogen). O DNA das amostras é digerido com endonucleases de restrição e ligado aos adaptadores seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Em microtubo de 1,5 ml, são adicionados 500 ng de amostra de DNA, 5 μ l de tampão 5 X, 2 μ l das enzimas *EcoRI* / *MseI* e água destilada para completar volume de 25 μ l. Esta mistura é agitada, centrifugada rapidamente e incubada por 2 horas a 37°C em banho-maria. Em seguida, as amostras permanecem 15 min. a 70°C para inativação das endonucleases, e imediatamente acomodadas em gelo. A esta mistura são adicionados 24 μ l de solução de ligação dos adaptadores e 1 μ l de T4 DNA ligase (figura 17). O tubo é agitado gentilmente, incubado a 20°C por 2 horas e estocados a – 20°C.

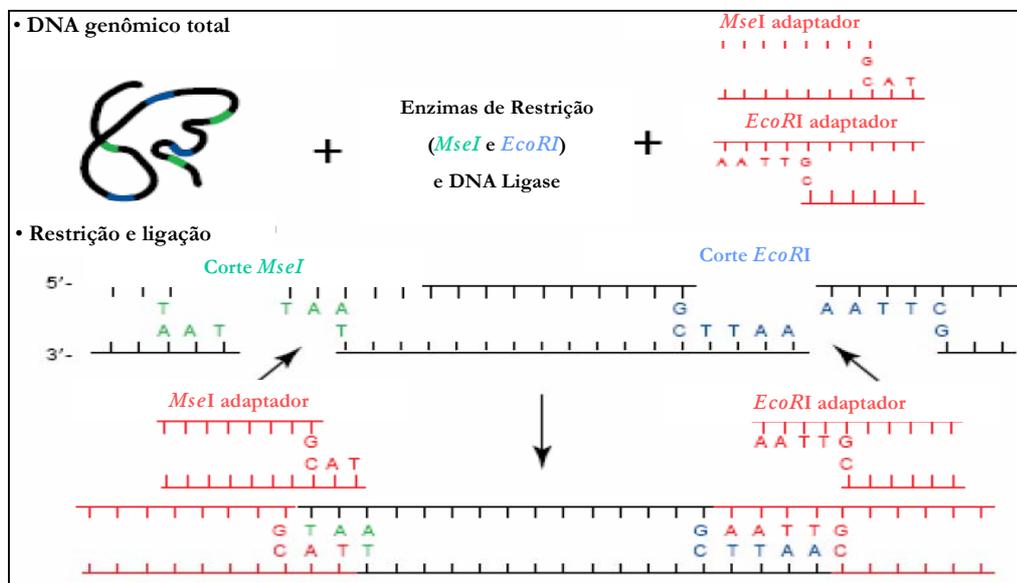


Figura 17. Representação esquemática das etapas de restrição dos fragmentos e ligação dos adaptadores na técnica de AFLP. Imagem modificada de <http://chuma.cas.usf.edu/~karl/molecol/Mueller.pdf>

Reação de pré-amplificação

Os fragmentos ligados aos adaptadores são pré-amplificados pela reação constituída por 5 μ l de DNA ligado; 1 μ l de iniciador AFLP *EcoRI*/*MseI* (geralmente iniciadores sem bases seletivas, *EcoRI* + 0 e *MseI*+ 0) e 15 μ l de Core Mix AFLP (Invitrogen®). O programa de amplificação utilizado foi 72°C por 2 minutos, seguido de 20 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos. O produto da reação é separado por eletroforese em tampão TAE 1X, utilizando gel de agarose a 1%, contendo 5 μ g ml⁻¹ de brometo de

etídio. A corrida é realizada a 100 V, sendo aplicados 5 µl do produto de reação com 2 µl de tampão de carregamento por poço do gel. O marcador de peso molecular *DNA Ladder* de 1 kb (Invitrogen™) deve sempre ser utilizado como padrão. A visualização das bandas é realizada sob luz ultravioleta.

Marcação radioativa dos iniciadores específicos

Se o método de revelação do gel for a auto-radiografia é necessário a marcação dos iniciadores, dirigidos aos adaptadores das enzimas de core raro, com o radioisótopo [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP. A marcação é feita com tampão 10X, 0,2 U da enzima polinucleotídeo kinase, 10 ng do iniciador e 600 ci/mmol do radioisótopo [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP. A reação é incubada a 37°C por 1 hora, seguido de 10 min. a 80° C para inativação da enzima.

Reação de amplificação seletiva

Nesta segunda fase, são usados iniciadores com nucleotídeo adicional na sua extremidade 3', desta forma, apenas os fragmentos que possuem nucleotídeos complementares aos nucleotídeos seletivos são amplificados. Esta amplificação seletiva visa diminuir o número de fragmentos gerados pela digestão, reduzindo artefatos da técnica. As amostras pré-amplificadas com os iniciadores sem base seletiva, são amplificadas com os mesmos iniciadores, porém com bases seletivas. As reações ocorrerem com a mistura de tampão de PCR 10 X; 2 mmol de MgCl_2 ; 0,05 mmol de dNTP; 1 mmol de cada iniciador; 2 unidades de Taq DNA polimerase e 5 µl da pré-amplificação diluída cinco vezes e volume final completado para 25 µl.

As condições de reação são: 94°C por um minuto, um ciclo de 94°C por 30 segundos, 65°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, repetido por 9 vezes com diminuição de 0,7°C da temperatura de anelamento por ciclo, sendo a ultima etapa da reação, onde a temperatura de anelamento atinge 56° C, repetida 22 vezes.

Preparação do gel e Migração das amostras

Para separação e identificação dos produtos de amplificação por AFLP, utiliza-se a eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante. O gel é preparado pela mistura de 100 ml de solução para gel (anexo),

500 μ l de persulfato de amônio 10% e 100 μ l de TEMED (N, N, N', N' – tetra metiletilenodiamina), misturados nesta ordem.

O preparo das amostras para aplicação no gel, consiste na adição de 20 μ l de corante à reação de PCR seletiva, seguido de desnaturação por 5 min. a 95° C e acomodação imediata no gelo. Após polimerização do gel, as placas são acomodadas em cuba para eletroforese, submersas em tampão TBE 1 X (anexo) a 50°C e 60 mA por 30 min. para pré- corrida. Após a pré-corrida, são aplicados 10 μ l de cada amostra nos poços do gel, que migram por 1 hora e 30 min. sob as mesmas condições.

Ao término da migração das amostras, o gel é transferido para um papel de filtro e acomodado em uma secadora de gel (Bio Rad), por 2 horas a 80°C. O papel, com o gel aderido, é acomodado em cassete e exposto a um filme de raio-X a – 80°C por 1-2 dias. O filme de raio-X é revelado pela imersão em solução reveladora Kodak D 79, lavagem em água e para finalizar solução fixadora para filme (figura 18).

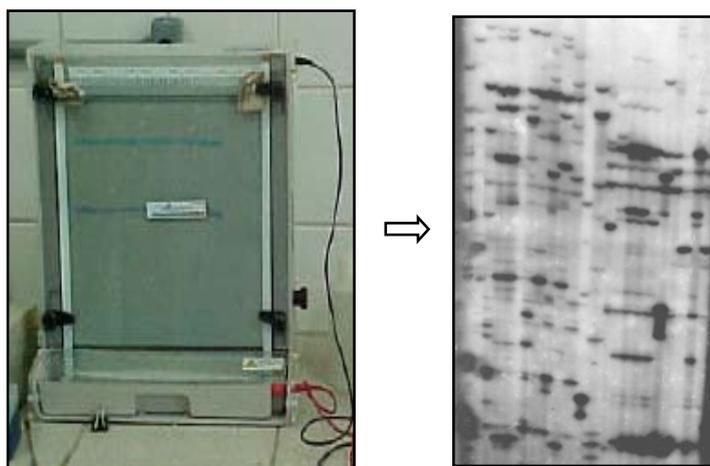


Figura 18. Representação esquemática da migração das amostras em cuba vertical de eletroforese e o filme de raio-X após revelação.

Análise das bandas geradas por AFLP

Para análise dos fragmentos polimórficos amplificados, são construídas matrizes binárias, analisando-se a presença e ausência de cada banda codificada por 1 ou 0, respectivamente. A partir desta matriz é determinado o índice de similaridade de Jaccard entre indivíduos e, posteriormente, realizado o agrupamento do tipo UPGMA (método das médias das distancias). A análise de dados e a construção do dendrograma podem ser feitas com auxílio de programa, como GELCOMPAR II.

4.4.6. Análises dos genes *nifH* e *nifD*

Amplificação dos genes *nifH* e *nifD*

Na literatura existem alguns pares de iniciadores para amplificação de genes *nifH* e *nifD*. Usualmente, a amplificação do gene *nifH* é feita utilizando iniciadores degenerados que amplificam uma região de aproximadamente 390 pb descritos por UEDA et al. (1995). A reação, com volume final de 50 μ l, consisti na mistura de 10% do volume final de tampão de PCR 10 X; 2 mM de $MgCl_2$; 200 μ M de dNTP; 0,12 μ M de cada iniciador 19F (5'-GCIWTYTAYGGIAARGGIGG-3') e 407R (5'-AAICCRCCRCAIACIACRTC-3') (onde I= inosina, R= A ou G, W= A ou T e Y= C ou T), 1 U da enzima Taq DNA polimerase e de 50 ng de DNA. Em seguida o material preparado é colocado num termociclador e submetido ao programa de amplificação cujos ciclos determinados são: 1 ciclo inicial por 4 min a 94°C, seguido por 35 ciclos intermediários (94°C por 1 min, 50°C por 1 min.; 72°C por 1 min.) e 1 ciclo terminal (72°C por 4 min.).

Para o gene *nifD* utiliza-se iniciadores que amplificam uma região de aproximadamente 390 pb descritos por STOLTZFUS et al. (1997). A reação, com volume final de 50 μ l, consisti na mistura de 10% do volume final de tampão de PCR 10 X; 2 mM de $MgCl_2$; 200 μ M de dNTP; 0,12 μ M de cada iniciador FdB261 (5'-TGGGGICCI RTIAARGAYATG-3') e FdB260 (5'-TCRTTIGCIATRTGRTGNCC-3'), (onde I= inosina, R= A ou G, W= A ou T e Y= C ou T), 1 U da enzima Taq DNA polimerase e de 50 ng de DNA. Em seguida o material preparado é colocado num termociclador e submetido ao programa de amplificação cujos ciclos determinados são: 1 ciclo inicial de 4 min a 94°C seguido por 35 ciclos intermediários (94°C por 1 min, 55°C por 1 min.; 72°C por 1 min) e 1 ciclo terminal (4 min. a 72°C).

Após o término dos programas, os produtos das amplificações são separados por eletroforese em gel de agarose 1,0%. O gel fica submerso em tampão de corrida TAE 1X e em cada orifício do gel é aplicado 2,5 μ l de amostra juntamente com 2 μ l de tampão de amostra, e submetido a uma voltagem de 100 volts por 60 min. para a migração das amostras. Em seguida, o gel é corado em solução de brometo de etídeo e visualizado com luz ultravioleta (figura 19).

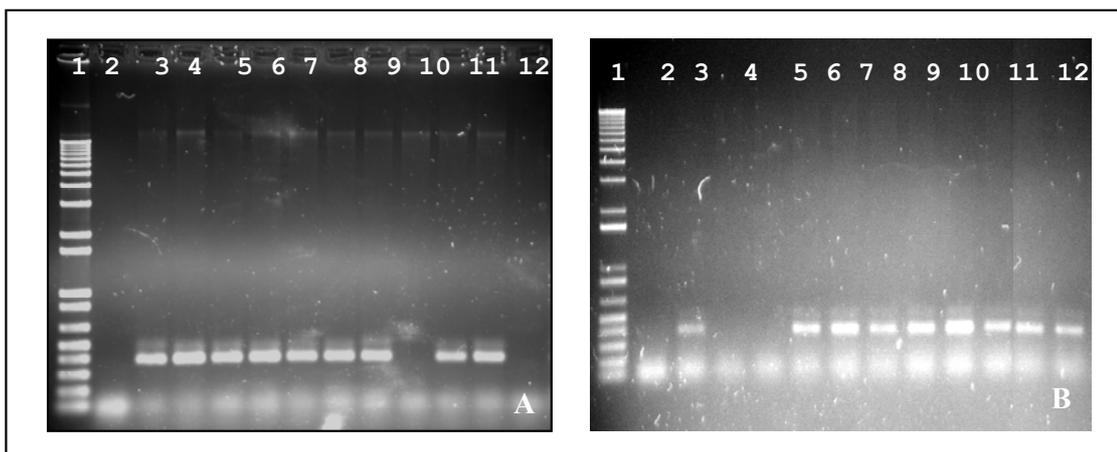


Figura 19. Perfil eletroforético do produto de amplificação das regiões flanqueadas pelos pares de oligonucleotídeos FdB260 + FbB261 (A) e nifHf + nifHr e (B).

Seqüenciamento do gene *nifH*

O gene *nifH* é amplificado por PCR conforme especificado no item 2.4.6.1 e a purificação feita semelhantemente ao produto de PCR da 16S RNAr. Para o seqüenciamento do gene *nifH* das bactérias diazotróficas são utilizados ~300 ng dos produtos de PCR purificados, 1,0 µl dos iniciadores (5,0 µM) utilizados para amplificação do gene *nifH*, Dynamics Kit (Amersham Biosciences) e água ultrapura (ultraPURE™, Invitrogen Co.) para o volume final de 20 µl (reação preparada conforme especificado pelo fabricante do Kit para seqüenciamento). Em seguida o material preparado é colocado num termociclador e submetido ao programa de amplificação cujos ciclos determinados são: 30 ciclos com 95°C por 20 seg., 50°C por 15 seg.; 60°C por 1 min.. Após a reação de seqüenciamento, as amostras são precipitadas adicionando 1,0 µl de acetado de amônio 7,5 M e 27,5 µl de etanol 70% que são incubadas a 4°C *overnight*, após a incubação, centrifugadas a 14.000rpm por 30 min. a 4°C, o sobrenadante é descartado e o precipitado lavado com 150 µl de etanol 70% e centrifugado 14.000 rpm por 5 min. a 4°C. As amostras são secas ao ar, e ressuspendidas em 7,5 µl de tampão de amostra e analisadas em seqüenciador automático.

5. Considerações Finais

As bactérias diazotróficas desempenham importante papel na sustentabilidade dos ecossistemas agrícolas, contribuindo para o desenvolvimento das plantas por meio da fixação biológica do

nitrogênio, produção e liberação de substâncias reguladoras do crescimento vegetal. Apesar de ter havido avanços significativos, até hoje, pouco se conhece sobre a identidade, diversidade e níveis populacionais destes microrganismos em diferentes plantas.

Com base nos diversos pontos discutidos neste documento podemos destacar que o conhecimento da população de diazotróficos é essencial à compreensão e aproveitamento desta importante interação entre planta e microrganismos. Diversas metodologias sugeridas neste trabalho, dentre outras relatadas na literatura, tem sido utilizadas para isolamento e posicionamento taxonômico de diazotróficos, o que tem ampliado a possibilidade de exploração biotecnológica destes organismos.

Os vários métodos de tipagem bacteriana existentes variam ao nível da simplicidade/dificuldade, rapidez, custos associados e necessidade de equipamento e mão-de-obra especializados. Entretanto, apesar das dificuldades para taxonomia de alguns grupos de diazotróficos, que podem apresentar o inconveniente de envolver inúmeras espécies, dificultando, assim, a etapa da identificação, as abordagens moleculares auxiliadas por um agrupamento fenotípico preliminar, mais abrangente, vêm sendo frequentemente utilizadas para entendimento sobre a diversidade, filogenia, ecologia, evolução e taxonomia dos principais grupos de bactérias diazotróficas associadas a grandes culturas agrícolas no Brasil.

6. Referências Bibliográficas

ACINAS, S. G.; MARCELINO, L. A.; KLEPAC-CERAJ, V.; POLZ, M. F. Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple *rrn* operons. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 186, p. 2629–2635, 2004.

ADHIKARI, T. B.; JOSEPH, C. M.; YANG, G.; PHILLIPS, D. A.; NELSON, L. M. Evaluation of bacteria isolated from rice for plant growth promotion and biological control of seedling disease of rice. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 47, n. 10, p. 916-924, 2001.

ANDERS, H. J.; KAETZKE, A.; KAMPFER, P.; LUDWIG, W.; FUCHS, G. Taxonomic position of aromatic-degrading denitrifying pseudomonad strains K 172 and KB 740 and their description as new members of the genera *Thauera*, as *Thauera aromatica* sp. nov., and *Azoarcus*, as *Azoarcus evansii* sp. nov., respectively, members of the beta subclass of the Proteobacteria. **International Journal of Systematics Bacteriology**, Washington, v. 45, n. 2, p. 327-333, 1995.

ANDERSON, G. R. Nitrogen fixation by *Pseudomonas*-like soil bacteria. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 70, p. 129-133, 1955.

BALDANI, J. I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M.; DÖBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*; Inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. Nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **International Journal of Systematics Bacteriology**, Washington, v. 46, n. 3, p. 802-810, 1996.

BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; TEIXEIRA, K. R. dos S.; BALDANI, V. L. D. Potencial biotecnológico de bactérias diazotróficas associativas e endofíticas. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: EDUCS, 2002. p. 195-232.

BALDANI, J. I.; AZEVEDO, M. S.; REIS, V. M.; TEIXEIRA, K. R. dos S.; OLIVARES, F. L.; GOI, S. R.; BALDANI, V. L. D.; DÖBEREINER, J. Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas: avanços e aplicações. In: SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S.; LOPES, A. S.; GUILHERME, L. R. G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A. E.; CARVALHO, J. G. **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Viçosa: SBCS; Lavras: UFLA/DCS, 1999. p. 621-666.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematics Bacteriology**, Washington, v. 36, n. 1, p. 86-93, 1986.

BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 29, n. 5/6, p. 911-922, 1997.

BALDANI, V. L. D. **Efeito da Inoculação de *Herbaspirillum* spp. no processo de colonização e infecção de plantas de arroz, e ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica.** 1996. 238 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, RJ.

BALDANI, V. L. D.; DÖBEREINER, J. Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 12, n. 4, p. 433-439, 1980.

BALOTA, E. L. **Interação de bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos vesículo-arbusculares na cultura da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz).** 1994. 281 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, RJ.

BASTIÁN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V.; BARALDI, R.; BOTTINI, R. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 e A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plant Growth Regulation; an International Journal on Natural and Synthetic Regulators**, Dordrecht, v. 24, p. 7-11, 1998.

BODDEY, L. H.; DART, P.; GOI, S. R.; BALDANI, J. I. Ocorrência de bactérias diazotróficas endofíticas na cultivar Q151 de cana-de-açúcar cultivada na Austrália. 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, MG. **Resumos...** Lavras: UFLA / SBCS / SBM, 1998. p. 809.

BODDEY, R. M.; BODDEY, L. H.; URQUIAGA, S. **A técnica de redução de acetileno na medição da fixação biológica de nitrogênio.** Itaguaí: Editora Universidade Rural, 1990. 37 p. (EMBRAPA-CNPBS. Documentos, 6).

BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2. ed. New York: Springer Verlag, 2001. V. 1.

BROCK, T. D.; BROCK, M. L. Temperature optima for algal development in Yellowstone and Iceland hot springs. **Nature**, London, v. 209, p. 733-734, 1966.

BULL, A.T.; GOODFELLOW, M.; SLATER, J.H. Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.46, p.219-252, 1992.

BULL, A. T.; WARD, A. C.; GOODFELLOW, M. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 64, n. 3, p. 573-606, 2000.

BUSSE, H.; DENNER, E. B. M.; LUBITZ, W. Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematic. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 47, p. 33–38, 1996.

CABALLERO-MELLADO, J.; MARTINEZ-AGUILAR, L.; PAREDES-VALDEZ, G.; ESTRADA DE LOS SANTOS, P. *Burkholderia unamae* sp. nov., in N₂-fixing rhizospheric and endophyte species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 1165-1172, 2004.

CAVALCANTE, V. A.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil**, The Hague, v. 108, p. 23-31, 1988.

CHEN, W. M.; FARIA, S. M. de; JAMES, E. K.; ELLIOTT, G. N.; LIN, K. Y.; CHOU, J. H.; SHEU, S. Y.; CNOCKAERT, M.; SPRENT, J. I.; VANDAMME, P. *Burkholderia nodosa* sp. nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 57, p. 1055-1059, 2007.

CHO, J.; TIEDJE, J. M. Bacterial species determination from DNA-DNA hybridization by using genome fragments and DNA microarrays. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 3677–3682, 2001.

COLWELL, R. R. Polyphasic taxonomy of the genus *Vibrio*: numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 104, p. 410-433, 1970.

CRUZ, L. M.; SOUZA, E. M.; WEBER, O. B.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F. O. 16S ribossomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacterial isolated from banana (*Musa* spp.) e abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merrill). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 2375-2379, 2001.

DAHLLÖF, I. Molecular community analysis of microbial diversity. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 13, p. 213–217, 2002.

DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J.; HICKS, J. B. A plant DNA minipreparation: version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 1, p. 19-21, 1983.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI, 1995. 60 p.

DUTTA, D.; GACHHUI, R. Nitrogen-fixing and cellulose-producing *Gluconacetobacter kombuchae* sp. nov., isolated from Kombucha tea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 57, p. 353-357, 2007.

ECKERT, B.; WEBER, O. B.; KIRCHHOF, G.; HALBRITTER, A.; STOFFELS, M.; HARTMANN, A. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*, **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 51, p. 17-26, 2001.

ENGELHARD, M.; HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B. Preferential occurrence of diazotrophic endophytes, *Azoarcus* spp., in wild rice species and land races of *Oriza sativa* in comparasion with modern races. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 2, p. 131-141, 2000.

ESTRADA DE LOS SANTOS, P.; BUSTILLOS-CRISTALES, R.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia* a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 2790-2798, 2001.

FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. P. M.; RODRIGUES, L. da S. Bactérias diazotróficas associadas a coqueiros na região de baixada litorânea em Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 36, n. 12, p. 1509-1517, 2001.

FRED, E. B.; WAKSMAN, S. A. **Laboratory manual of general microbiology**. New York: McGraw Hill, 1928. 145 p.

FUENTES-RAMÍREZ, L. E.; BUSTILLOS-CRISTALES, R.; TAPIA-HERNÁNDEZ, A.; JIMÉNEZ-SALGADO, T.; WANG, E. T.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; CABALLERO-MELLADO, J. Novel nitrogen-fixing acetic acid bacteria, *Gluconacetobacter johannae* sp. nov. and *Gluconacetobacter azotocaptans* sp. nov. associated with coffee plants. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 51, p. 1305-1314, 2001.

FUENTES-RAMÍREZ, L. E.; JIMENEZ-SALGADO, T.; ABARCA-OCAMPO, I. R.; CABALERO-MELLADO, J. *Acetobacter diazotrophicus* a endolacetic producing bacterium isolated from sugar cane cultivars of Mexico. **Plant and Soil**, The Hague, v. 154, p. 145-150, 1993.

GENOMICS and taxonomy for all. **Nature**, London, v. 417, n. 6889, p. 573, 2002.

GIAVASIS, I.; HARVEY, L. M.; MCNEIL, B. Gellan gum. **CRC Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v. 20, p. 177-211, 2000.

GILLIS, M.; DÖBEREINER, J.; POT, B.; GOOR, M.; FALSEN, E.; HOSTE, B.; REINHOLD, B.; KERSTERS, K. Taxonomic relationships between (*Pseudomonas*) *rubrisubalbicans*, some clinical isolates (EF group 1), *Herbaspirillum seropedicae* and (*Aquaspirillum*) *autrophicum*. In: POLSINELLI, M.; MATERASSI, R.; VINCENZINI, M. **Nitrogen fixation**. Dordrecht: Kluwer, 1991. p. 292-294. (Developments in Plant and Soil Sciences, v. 48).

GILLIS, M.; TRAN, V. van; BARDIN, R.; GOOR, M.; HERBBAR, P.; WILLEMS, A.; SEGERS, P.; KERSTERS, K.; HEULIN, T.; FERNANDEZ, M. P. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp.: nov. for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 45, n. 2, p. 274-289, 1995.

HANAGE, W. P.; FRASER, C.; SPRATT, B. G. Fuzzy species among recombinogenic bacteria. **BMC Biology**, London, v. 3, n. 6, p. 1-7, 2005.

HASSAN, U.; MIRZA, M. S.; MEHNAZ, S.; RASUL, G.; MALIK, K. A. Physiological, biochemical and molecular characterization of *Azospirillum* spp. isolated from cereal crops. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NITROGEN FIXATION WITH NON-LEGUMES, 7., 1996, Faisalabad, Pakistan. **Abstracts...** Pakistan: National Institute for Biotechnology and Genetic Engineering (NIBGE), 1996. p. 159-160.

HEBBAR, K. P.; GUENIOT, B.; HEYRAUD, A.; COLIN-MOREL, P.; HEULIN, T.; BALANDREAU, J.; RINAUDO, M. Characterization of exopolysaccharides produced by rhizobacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 38, p. 248-253, 1992.

KAMPFER, P.; DENNER, E. B. M.; MEYER, S.; MOORE, E. R. B.; BUSSE, H. J. Classification "*Pseudomonas azotocolligans*" Anderson 1955, 132, in the genus *Sphingomonas* as *Sphingomonas trueperi* sp. nov. **International Journal of Systematics Bacteriology**, Washington, v. 47, p. 577-583, 1997.

KIRCHHOF, G.; ECKERT, B.; STOFFELS, M.; BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; HARTMANN, A. *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C₄-fibre plants. **International Journal of Systematics Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 51, p. 157-168, 2001.

KLOEPPER, J. W.; TUZUN, S.; ZEHNDER, G. W.; WEI, G. Multiple disease protection by rhizobacteria that induce systemic resistance - historical precedence. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 87, p. 136-137, 1997.

KOVACS, N. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. **Nature**, London, v. 178, p. 703, 1956.

KUNITSKY, C. OSTERHOUT, G., SASSER, M. **Identification of microorganisms using fatty acid methyl ester (FAME) analysis and the midi sherlock microbial identification system**. Disponível em: https://store.pda.org/bookstore/TableOfContents/ERMM_V3_Ch01.pdf. Acesso em: 23 Jun. 2007.

LANGE, A.; KLAUBERG, O.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Diversidade de diazotróficos associativos em amostras de raiz e de solo contaminado com metais pesados. 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. **Resumos...** Lavras: UFLA / SBCS / SBM, 1998. p. 250. FERTBIO98.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

MAGALHÃES, F. M.; BALDANI, J. I.; SOUTO, S. M.; KUYKENDALL, J. R.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 55, p. 417-430, 1983.

MECHICHI, T.; STACKEBRANDT, E.; GAD'ON, N.; FUCHS, G. Phylogenetic and metabolic diversity of bacteria degrading aromatic compounds under denitrifying conditions, and description of *Thauera phenylacetica* sp. nov., *Thauera aminoaromatica* sp. nov., and *Azoarcus buckelii* sp. nov. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 178, p. 26-35, 2002.

MEHLEN, A.; GOELDNER, M.; RIED, S.; STINDL, S.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. Development of a fast DNA-DNA hybridization method based on melting proWles in microplates. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 27, p. 689–695, 2004.

MEHNAZ, S.; WESELOWSKI, B.; LAZAROVITS, G. *Azospirillum canadense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from corn rhizosphere. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 57, p. 620-624, 2007.

OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 21, p. 197-200, 1996.

OLIVARES, F. L.; JAMES, E. K.; REIS, V. M.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Colonização do tecido vascular por *Herbaspirillum* spp. em sorgo e cana-de-açúcar. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 18, Supl., p. 313, 1993.

OLIVEIRA, E. **Estudo da associação entre bactérias diazotróficas e arroz**. 1992. 96 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, RJ.

PARKE, J. L.; GURIAN-SHERMAN, D. Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 39, p. 225-258, 2001.

PATRIQUIN, D. G.; DÖBEREINER, J.; JAIN, D. K. Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 29, n. 8, p. 900-915, 1983.

PAULA, M. A. **Interação micorrizas vesículo-arbusculares e bactérias diazotróficas em batata-doce (*Ipomoea batatas* (L) Lam)**. 1992. 168 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, RJ.

PEARCE, D. A.; VAN DER GAST, C. J.; LAWLEY, B.; ELLIS-EVANS, J. C. Bacterioplankton community diversity in a maritime Antarctic lake, determined by culture-dependent and culture-independent techniques. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 45, p. 59–70, 2003.

PEIXOTO, R. S.; ROSADO, A. S.; COUTINHO, H. L.; RUMJANEK, N. G. Use of the rpoB and 16S rDNA gene to analyse the bacterial diversity from native tropical soil by PCR/DGGE. **Letters in Applied Microbiology**, London, v. 35, p. 316-320, 2002.

PENG, G.; WANG, H.; ZHANG, G.; HOU, W.; LIU, Y.; WANG, E. T.; TAN, Z. *Azospirillum melinis* sp. nov., a group of diazotrophs isolated from tropical molasses grass. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 56, p. 1263-1271, 2006.

PERIN, L. **Ecologia e diversidade de isolados de *Gluconacetobacter diazotrophicus* associados à cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)**. 2003. 68 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

PERIN, L. **Estudo da Comunidade de Bactérias Diazotróficas do Gênero *Burkholderia* em Associação com Cana-de-açúcar e Descrição de *Burkholderia silvatlantica***. 2007. 120 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

PERIN, L.; MARTINEZ-AGUILAR, L.; PAREDES-VALDEZ, G.; BALDANI, J. I.; ESTRADA de LOS SANTOS, P.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia silvatlantica* sp nov., a novel diazotrophic bacterium associated with sugarcane and maize. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 56, p. 1931-1937, 2006.

PIÑON, D.; CASAS, M.; BLANCH, M.; FONTANIELLA, B.; BLANCO, Y.; VICENTE, C.; SOLAS, M. T.; LEGAZ, M. E. *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a sugar cane endosymbiont produces a bacteriocin against *Xantomonas albilineans*, a sugar cane pathogen. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 153, p. 345-351, 2001.

PONTES, D. S.; LIMA-BITTENCOURT, C. I.; CHARTONE-SOUZA E.; NASCIMENTO, A. M. A. Molecular approaches: advantages and artifacts in assessing bacterial diversity. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Berlin, v. 34, p. 463-473, 2007.

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Interactions of gramineous plants with *Azoarcus* spp. And other diazotrophs: identification, localization, and perspectives to study their function. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 17, n. 1, p. 29-54, 1998.

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T.; GILLIS, M.; HOSTE, B.; VANCANNEYT, M.; KERSTERS, K.; DE LEY, J. *Azoarcus* gen. nov., nitrogen-fixing Proteobacteria associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth), and description of two species, *Azoarcus indigens* sp. nov. and *Azoarcus communis* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 43, n. 3, p. 574-584, 1993.

REIS JÚNIOR, F. B.; SILVA, M. F. ; TEIXEIRA, K. R. dos S. ; URQUIAGA, S. ; REIS, V. M. Intra-specific diversity study of the nitrogen fixing bacterium *Azospirillum amazonense* isolated from different *Bracchiaria* species. **Symbiosis**, Balabam, v. 36, p. 41-56, 2004.

REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; DÖBEREINER, J. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. **CRC Critical Reviews in Plant Science**, Boca Raton, v. 19, p. 227-247, 2000.

REIS, V. M.; ESTRADA DE LOS SANTOS, P.; TENORIO-SALGADO, S.; VOLGEL, J.; STROFFELS, M.; GUYON, S.; MAVINGUI, P.; BALDANI, V. L. D.; SCHMID, M.; BALDANI, J. I.; BALANDREAU, J.; HARTMANN A.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 2155-2162, 2004.

REIS, V. M.; OLIVEIRA, A. L. M.; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I. Fixação biológica de nitrogênio simbiótica e associativa. In: FERNANDES, M. S. (Ed.). **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p. 153-174.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JÚNIOR, V. A.; VICTOR, O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. citri tipo B. **Summa Phytopathologica**, Campinas, v. 12, n. 1-2, p. 16, 1986.

RODRIGUES, E. P. **Caracterização fisiológica de estirpes de *Azospirillum amazonense* e avaliação dos efeitos da inoculação em plantas de arroz inundado.** 2004. 66 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

ROSSELLÓ-MORA R.; AMANN R. The species concept for prokaryotes. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 25, p. 39–67, 2001.

ROTHBALLER, M.; SCHMID, M.; KLEIN, I.; GATTINGER, A.; GRUNDMANN, S.; HARTMANN, A. *Herbaspirillum hiltneri* sp. nov., isolated from surface-sterilized wheat roots. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 56, p. 1341-1348, 2006.

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

SIERRA, S. A. Simple method for detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. **Antonie van Leeuwenhoek; International Journal of General and Molecular Microbiology**, Dordrecht, v. 23, p. 15-22, 1957.

SOARES-RAMOS, J. R. L.; RAMOS, H. J. O.; CRUZ, L. M.; CHUBATSU, L. S. Comparative molecular analyses of *Herbaspirillum* strains by RAPD, RFLP, and 16S rDNA sequencing. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 26, p. 537-543, 2003.

SONG, B.; HAGGBLOM, M. M.; ZHOU, J.; TIEDJE, J. M.; PALLERONI, N. J. Taxonomic characterization of denitrifying bacteria that degrade aromatic compounds and description of *Azoarcus toluvorans* sp. nov. and *Azoarcus toluclasticus* sp. nov. **International Journal of Systematics Bacteriology**, Washington, v. 49, p. 1129-1140, 1999.

SPRINGER, N.; LUDWIG, W.; PHILIPP, B.; SCHINK, B. *Azoarcus anaerobius* sp. nov., a resorcinol-degrading, strictly anaerobic, denitrifying bacterium. **International Journal of Systematics Bacteriology**, Washington, v. 48, p. 953-956, 1998.

STOLTZFUS, J. R.; SO, R.; MALARVITHI, P. P.; LADHA, J. K.; BRUIJN, F. J. Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen. In: LADHA, J. K.; BRUIJN, F. J. de; MALIK, K. A. (Ed.). **Opportunities for biological nitrogen fixation in rice and other non-legumes**. Dordrecht: Kluwer, 1997. (Developments in Plant and Soil Sciences, v. 75). Reprinted from **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 194, n. 1-2, p. 25-36, 1997.

STRALIOTTO, R.; RUMJANEK, N. G. **Aplicação e evolução dos métodos moleculares para o estudo da biodiversidade do rizóbio**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1999. 58 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 93).

TARRAND, J. J.; KRIEG, N. R.; DÖBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. Nov. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 24, p. 967-980, 1978.

TORSVIK, V.; OVREAS, L.; THINGSTAD, T. F. Prokaryotic diversity - magnitude, dynamics, and controlling factors. **Science**, Washington, v. 296, p. 1064-1066, 2002.

UEDA, T.; SUGA, Y.; YAHIRO, N.; MATSUGUCHI, T. Remarkable n₂-fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of *nifH* gene sequences. **Journal of Bacteriology**, v.177, p.1414-1417, 1995.

VALVERDE, A.; VELÁZQUEZ, E.; GUTIÉRREZ, C.; CERVANTES, E.; VENTOSA, A.; IGUAL, J. M. *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 53, p. 1979-1983, 2003.

VANDAMME, P.; GORIS, J.; CHEN, W. M.; VOS, DE P.; WILLEMS, A. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 25, p. 507-512, 2002a.

VANDAMME, P.; HENRY, D.; COENYE, T.; NZULA, S.; VANCANNEYT, M.; LI PUMA, J. J. *Burkholderia anthina* sp. nov. and *Burkholderia pyrrocinia*, two additional *Burkholderia cepacia* complex bacteria, may confound test results of new molecular diagnostic tools. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 33, p. 143-149, 2002b.

VANDAMME, P.; POT, B.; GILLS, M.; DEVOS, P.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiology Reviews**, Washington, v. 60, n. 2, p. 407-437, 1996.

VIDEIRA, S. S.; CRUZ, G. B. da; BALDANI, V. L. D. **Gota d'água:** método rápido para visualização de flagelos em bactérias. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2003. 4 p. (Embrapa Agrobiologia. Comunicado Técnico, 62).

VIDEIRA, S. S.; GALISA, P. S.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. Identificação e análise da diversidade de *Sphingomonas* spp. endofítica de arroz. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 31, 2007, Gramado. **Anais...** Gramado: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. 1CD-ROM.

VIDEIRA, S. S.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. Identificação de *Sphingomonas* sp. fixadoras de nitrogênio isoladas de arroz (*Oryza sativa* L.). In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 27., REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 11., SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 9., REUNIÃO BRASILEIRA DE BIOLOGIA DO SOLO, 6., 2006, Bonito, MS. **A busca das raízes. anais...** Bonito: SBM; Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2006. 1 CD ROM. FERTBIO 2006. (Embrapa Agropecuária Oeste. Documentos, 82).

WEBER, O. B.; BALDANI, V. L. D.; TEIXEIRA, K. R. dos S.; KIRCHHOF, G.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 210, p. 103-113, 1999.

WEISING, K.; NYBOM, H.; WOLF, K.; MEYER, W. **DNA fingerprinting in plants and fungi**. Boca Raton: CRC, 1995. 322 p.

WHITMAN, W. B.; COLEMAN, D. C.; WIEBE, W. J. Procariotes: the unseen majority. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, p. 6578-6583, 1998.

WILSON, E. O. A situação atual da diversidade biológica. In: WILSON, E. O.; PETER, F. M. (Ed.). **Biodiversidade**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997. p. 3-35.

WU, X.; WALKER, M. J.; HORNITZKY, M.; CHIN, J. Development of a group-specific PCR combined with ARDRA for the identification of *Bacillus* species of environmental significance. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 64, p. 107-119, 2005.

XIE, C. H.; YOKOTA, A. *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 55, p. 1435-1438, 2005.

XIE, C. H.; YOKOTA, A. *Sphingomonas azotifigens* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of *Oryza sativa*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 56, p. 889-893, 2006.

YABUUCHI, E.; YANO, I.; OYAZU, H.; HASHIMOTO, Y.; EZAKI, T.; YAMAMOTO, H. Proposals of *Sphingomonas paucimobilis* gen. nov. and comb. nov., *Sphingomonas parapaucimobilis* sp. nov., *Sphingomonas yanoikuyae* sp. nov., *Sphingomonas adhesiva* sp. nov., *Sphingomonas capsulata* comb. nov., and two genospecies of the genus *Sphingomonas*. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v. 34, p. 99-119, 1990.

YANO, D. M. Y.; ATTILI, D. S.; GATTI, M. S. V.; EGUCHI, S. Y.; OLIVEIRA, U. M. **Técnicas de microbiologia em controle de qualidade**. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello", 1991.

YOUNG, J. P. W. Taxonomy and evolution of diazotrophs. In: PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M.; YATES, G.; NEWTON, W. E. (Ed.). **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity**. Dordrecht: Kluwer, 2000. p. 153-154. (Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture, v. 38).

YOUNG, J. P. W.; DOWNER, H. L.; EARDLY, B. D. Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTAi1 by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, p. 2271-2277, 1991.

ZABEAN, M.; VOS, P. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. **European Patent Office**, publication 0534858 A1. 1993.

ZHANG, H.; HANADA, S.; SHIGEMATSU, T.; SHIBUYA, K.; KAMAGATA, Y.; KANAGAWA, T.; KURANE, R. *Burkholderia kururiensis* sp. nov., a trichloroethylene (TCE)-degrading bacterium isolated from aquifer polluted with TCE. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 50, p. 743-749, 2000.

ZHOU, J.; FRIES, M. R.; CHEE-SANFORD, J. C.; TIEDJE, J. M. Phylogenetic analyses of a new group of denitrifiers capable of anaerobic growth on toluene and description of *Azoarcus tolulyticus* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 45, p. 500-506, 1995.

7. Anexo

7.1. Meios de Cultivo

◆ Meio JMV (BALDANI, 1996)

Manitol		5g
K ₂ HPO ₄	sol. 10%	6 mL
KH ₂ PO ₄	sol. 10%	18 mL
MgSO ₄ .7H ₂ O	sol. 10%	2 mL
NaCl	sol. 10%	1 mL
CaCl ₂ . 2H ₂ O	sol. 1%	2 mL
Azul de bromotimol	sol. 0,5% em 0,2 N de KOH	2 mL
FeEDTA	sol. 1,64%	4 mL
Sol. de micronutrientes para meio de cultura		2 mL
Vitamina para meio de cultura		1 mL
Extrato de levedura		100 mg

Ajustar o pH para 5,0 – 5,4.

Completar para 1000 mL com água destilada.

Adicionar 1,6 g L⁻¹ de agar para semi-sólido e 25 g L⁻¹ para sólido.

Para meio líquido adicionar 10 mM de glutamato de sódio (1,87g/l) (indicador opcional).

◆ Meio LGI (MAGALHÃES et al., 1983)

Açúcar cristal (sacarose)		5g
K ₂ HPO ₄	sol. 10%	2 mL

KH ₂ PO ₄	sol. 10%	6 mL
MgSO ₄ .7H ₂ O	sol. 10%	2 mL
CaCl ₂ . 2H ₂ O	sol. 1%	2 mL
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	sol. 0.1%	2 mL
FeCl ₃ .6H ₂ O	sol. 1%	1 mL
Azul de bromotimol	sol. 0,5% em 0,2 N de KOH	5 mL
FeEDTA	sol. 1,64%	4 mL
Vitamina para meio de cultura		1 mL

Ajustar o pH para 6,0 – 6,2 com solução de H₂SO₄ a 5%

Completar para 1000 ml com H₂O destilada.

Adicionar 1,4 g L⁻¹ de agar para semi-sólido e 15 g L⁻¹ para sólido.

◆ Meio DYGS (RODRIGUEZ NETO, 1986)

Glicose	2 g
Ácido málico	2 g
Peptona bacteriológica	1,5 g
Extrato de levedura	2 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
Acido glutâmico	1,5 g

Ajustar o pH com solução de KOH a 10%:

pH 6,0 para *Herbaspirillum*.

pH 6,0 para *Gluconacetobacter* (menos ácido málico).

pH 6,8 para *Azospirillum*.

Completar para 1000 ml com H₂O destilada.

Adicionar 15g L⁻¹ de agar para meio sólido.

◆ Meio 79 (FRED & WAKSMAN, 1928)

Manitol		10 g
K ₂ HPO ₄	Sol. 10%	1 mL
KH ₂ PO ₄	Sol. 10%	4 mL
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sol. 10%	2 mL
NaCl	Sol. 10%	1 mL
Extrato de levedura		0,4 g
Azul de bromotimol	Sol. 0,5% em 0,2 N de KOH	5 mL
FeEDTA	Sol. 1,64%	4 mL
Vitamina para meio de cultura		1 mL

Ajustar pH para 6,8 – 7,0 com solução de KOH a10%

Completar para 1000 ml com H₂O destilada.

Adicionar 1,0 g L⁻¹ de agar para semi-sólido e 15 g L⁻¹ para sólido.

◆ Meio LGI-P (DÖBEREINER et al., 1995)

Açúcar Cristal (sacarose)		100 g
K ₂ HPO ₄	sol. 10%	2 mL
KH ₂ PO ₄	sol. 10%	6 mL

MgSO ₄ .7H ₂ O	sol. 10%	2 mL
CaCl ₂ . 2H ₂ O	sol. 1%	2 mL
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	sol. 0.1%	2 mL
FeCl ₃ .6H ₂ O	sol. 1%	1 mL
Azul de bromotimol	sol. 0,5% em 0,2 N de KOH	5 mL
Vitamina para meio de cultura		1 mL

Ajustar o pH para 5,5 com solução de ácido acético a 1%.

Completar para 1000mL com água destilada.

Adicionar 1,3 g L⁻¹ de agar para semi-sólido e 25 g L⁻¹ para sólido.

◆ Meio JNFb (BALDANI, 1996)

Ácido málico		5 g
K ₂ HPO ₄	sol. 10%	6 mL
KH ₂ PO ₄	sol. 10%	18 mL
MgSO ₄ .7H ₂ O	sol. 10%	2 mL
NaCl	sol. 10%	1 mL
CaCl ₂ . 2H ₂ O	sol. 1%	2 mL
Azul de bromotimol	sol. 0,5% em 0,2 N de KOH	2 mL
FeEDTA	sol. 1,64%	4 mL
Sol. de micronutrientes para meio de cultura		2 mL
Vitamina para meio de cultura		1 mL
KOH		4,5 g
Extrato de levedura (somente para meio sólido)		20 mg

Ajustar o pH para 5,8 com solução de KOH a 1%.

Completar para 1000mL com água destilada.

Adicionar 1,7 g L⁻¹ de agar para semi-sólido e 17 g L⁻¹ para sólido.

◆ Meio NFb (BALDANI & DÖBEREINER, 1980)

Ácido málico		5 g
K ₂ HPO ₄	sol. 10%	5 mL
MgSO ₄ .7H ₂ O	sol. 10%	2 mL
NaCl	sol. 10%	1 mL
CaCl ₂ . 2H ₂ O	sol. 1%	2 mL
Azul de bromotimol	sol. 0,5% em 0,2 N de KOH	2 mL
FeEDTA	sol. 1,64%	4 mL
Sol. de micronutrientes para meio de cultura		2 mL
Vitamina para meio de cultura		1 mL
KOH		4,5 g
Extrato de levedura (somente para meio sólido)		50 mg

Ajustar o pH para 6,5 com solução de KOH a 1%.

Completar para 1000mL com água destilada.

Adicionar 1,3 g L⁻¹ de agar para semi-sólido e 15g L⁻¹ para sólido.

◆ Meio LG (DÖBEREINER et al., 1995)

Açúcar Cristal (sacarose)		20 g
K ₂ HPO ₄	sol. 10%	0,5 mL

KH ₂ PO ₄	sol. 10%	1,5 mL
MgSO ₄ .7H ₂ O	sol. 10%	2 mL
CaCl ₂ . 2H ₂ O	sol. 1%	2 mL
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	sol. 0.1%	2 mL
FeCl ₃ .6H ₂ O	sol. 1%	1 mL
Azul de bromotimol	sol. 0,5% em 0,2 N de KOH	5 mL

Ajustar o pH para 6,6 – 7,0.

Completar para 1000mL com água destilada.

Adicionar 15 g L⁻¹ de agar para sólido.

◆ Meio Batata (BALDANI & DÖBEREINER, 1980)

Batata cozida	200 g
Ácido málico	2,5 g
Açúcar cristal	2,5 g
Solução de micronutrientes	2 mL
Solução de vitaminas	1 mL

Pesar os 200 g de batata e cozinhar em água destilada durante 30 minutos. Paralelamente, adicionar o ácido málico em 50 mL de água destilada com 2 gotas de azul de bromotimol sol. 0,5% em 0,2 N de KOH. Adicionar o açúcar cristal, o micronutriente e a vitamina e ajustar o pH com KOH ate atingir pH 6,8 – 7,0.

Filtrar a batata em algodão e juntar a solução preparada anteriormente ao filtrado. Completar o volume para 1000 mL.

Adicionar 1,84 g L⁻¹ de agar para semi-sólido e 15 g L⁻¹ de agar para sólido.

◆ Meio Batata-P (DÖBEREINER et al., 1995)

Batata cozida	200 g
Açúcar cristal	100 g
Solução de micronutrientes	2 mL
Solução de vitaminas	1 mL

Pesar os 200 g de batata e cozinhar em água destilada durante 30 minutos. Paralelamente o açúcar cristal, o micronutriente e a vitamina em 50 mL de água destilada com 2 gotas de azul de bromotimol sol. 0,5% em 0,2 N de KOH. Filtrar a batata em algodão e juntar a solução preparada anteriormente ao filtrado. Completar o volume para 1000 mL. Adicionar e ajustar o pH com ácido acético até atingir pH 5,5.

Adicionar 25g L⁻¹ de ágar para sólido.

7.2. Soluções

◆ Solução salina para diluição seriada (BALDANI, 1980)

K ₂ HPO ₄	sol. 10%	1 mL
MgSO ₄	sol. 10%	0,5 mL
NaCl	sol. 10%	0,2 mL
CaCl ₂ .2H ₂ O	sol. 10%	0,5 mL
FeEDTA	sol. 1.64%	1 mL
Sol. de micronutrientes para meio de cultura		0,5 mL

Ajustar o pH para 6,5 com solução de H₂SO₄ a 5 %;

Completar com água destilada para 1000 mL.

◆ **Solução de micronutrientes para meio de cultura (DÖBEREINER et al., 1995)**

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,200g
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,235g
H_3BO_3	0,280g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,008g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,024g

Completar o volume para 200 mL com água destilada.

◆ **Solução de vitaminas (DÖBEREINER et al., 1995)**

Biotina	10 mg
Piridoxol – HCl	20 mg

Dissolver em banho-maria e completar o volume para 100 mL com água destilada;

Manter a solução em geladeira.

◆ **Reagente de Lowry (LOWRY et al., 1951)**

Solução A: 50 g de Na_2CO_3 em 1 L de água destilada, 0,47 M

Solução B: 1 g de tartarato duplo de sódio e potássio e 1 L de água, $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,08 M,

Solução C: 1 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ em 1L de água destilada, 0,04 M

Juntar 50 mL da solução A, mais 1 mL da solução C e 1 mL da solução B, nesta ordem.

◆ Tampão fosfato – 0,5M

K_2HPO_4	170 g	2 L H_2O
KH_2PO_4	68 g	1 L H_2O

Promover a mistura das duas soluções e ajustar o pH para 7,0.

Guardar em geladeira e diluir em água destilada na hora do uso.

◆ Tampão PBS

NaCl	8 g
KCL	0,2 g
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	1,4 g
KH_2PO_4	0,2 g

Completar para 1000 mL de água destilada.

◆ TAE 50 X (SAMBROOK & RUSSELL, 2001)

Tris base	242 g
Ácido acético glacial	57,1 mL
EDTA 0,5 M pH 8,0	100 mL

Ajustar o pH para 8,18 – 8,29.

Completar para 1000 mL de água destilada

◆ TAE 1 X

Acrescentar 20 mL de TAE 50 X a 980 mL de água destilada.

◆ TBE 10 X

Tris base	121 g
Ácido bórico	55,6 g
EDTA	9,3 g

Ajustar o pH para 8,13 – 8,23.

Completar para 1000 mL de água destilada

◆ Tampão de amostra

Tris base 0,25 % de azul de bromofenol

40% de sacarose em água

A solução deve ser esterilizada e mantida em geladeira.

◆ SSC 20 X

NaCl Tris base	175,3 g
Citrato de sódio	88,2 g

Completar para 1000 mL de água destilada.

◆ Revelador kodak D79

Metol	3,5 g
Sulfito de sódio	60 g
Hidroquinona	9 g
Carbonato de sódio	40 g
Brometo de potássio	3 g

Aquecer 700 mL de água a 50° C, colocar os reagentes na seqüência e completar para 1000 mL com água destilada.

◆ Solução para gel - acrilamida/bisacrilamida

Solução A

Acrilamida 190 g

Bisacrilamida 10 g

Completar para 500 mL com água destilada

Aquecer até no máximo 60°C e filtrar em papel de filtro

Solução B

Uréia 450 g

Solução acrilamida – bisacrilamida 112,5 mL

Colocar no máximo 850 mL de água destilada e aquecer, sob agitação, no máximo a 60 °C.

TBE 10 X 100 mL

EDTA (0,5 M, pH 8) 4 mL

Completar para 1000 mL com água destilada e filtrar com papel de filtro.



Agrobiologia

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

