



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA



MAÍRA MERCÊS BARRETO

FORMAÇÃO DE BIOFILME POR RIZOBACTÉRIAS ISOLADAS DE
PLANTAS DO SEMI-ÁRIDO BAIANO

Feira de Santana, BA

2009

MAÍRA MERCÊS BARRETO

**FORMAÇÃO DE BIOFILME POR RIZOBACTÉRIAS ISOLADAS DE
PLANTAS DO SEMI-ÁRIDO BAIANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Feira de Santana, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Gross.

Co-orientador: Prof. Dr. Milton Ricardo de Abreu Roque.

Feira de Santana, BA

2009

MAÍRA MERCÊS BARRETO

Formação de biofilme por rizobactérias isoladas de plantas do Semi-árido baiano.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Feira de Santana, como requisito para obtenção do título de mestre em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Drº. Jorge Teodoro de Souza

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Professor Adjunto I do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Cruz das Almas - BA.

Prof. Drº. João Carlos Teixeira Dias

Universidade Estadual de Santa Cruz, Professor Adjunto do Departamento de Ciências Biológicas.

Prof. Dr. Eduardo Gross

Universidade Estadual de Santa Cruz, Professor Titular do Departamento de Ciências Biológicas.

“O solo é uma sepultura no seu mais amplo sentido, e ainda assim ele é a verdadeira mola mestra de nova vida. Se algum objeto pode demonstrar a possibilidade de ressurreição, esse objeto é o solo sobre o qual caminhamos. Igualmente fascinante é que ele não é uma massa inerte, apenas pela ação química, mas pelos organismos vivos.”

(J. Wrightson & J.C Newsham, 1919)

AGRADECIMENTOS

A história desse mestrado, desde a decisão de fazê-lo, passando pela escolha do tema, construção das metodologias, obtenção dos resultados, até a difícil finalização da dissertação, completou-se como a construção de um mosaico: cada peça foi colocada com cuidado, vezes ao acaso, outras, com esforço; aos poucos, peça por peça, até finalizar. Muitas foram as pessoas que participaram dessa construção. Agradeço a todas. As marcas da colaboração ficarão guardadas no coração e no próprio trabalho finalizado.

Deus é Pai/Mãe e sempre está ao lado da filha!

Aos meus pais, Elói e Áurea, pelo amor incondicional, dedicação, proteção e companheirismo; os maiores incentivadores da realização de meus objetivos e sonhos; aos meus irmãos, Bartira e Anoã; às minhas sobrinhas Rafaela e Amanda; a Marlene e a toda minha família pelo carinho, torcida e amparo afetivo.

Ao meu orientador, prof. Dr. Eduardo Gross, pela dedicada e competente orientação. Acolher-me desconhecida, apostar num possível potencial, ouvir incondicionalmente idéias e sugestões “alternativas”, com atenção, sem descartá-las antes de analisá-las; outrossim, pelo otimismo e positividade, assegurando-me não esmorecer; pelo companheirismo, sabedoria, serenidade e respeito em lidar com as diferenças.

Ao co-orientador, prof. Dr. Milton Roque por abrir-me portas, partilhando experiências, pelas sugestões de caminhos em busca dos meus objetivos acadêmicos.

A Irailde Santos, irrestrita amiga do peito, perspicaz a ponto de perceber os momentos que precisei de ajuda, generosa me estendeu a mão prontamente; pelo seu ombro amigo, companheirismo e resenhas, gratíssima.

À família Cruz, em especial Ninha e Washington, bem como, à família Nobre pelo acolhimento em suas residências.

Aos “estagiários” Pat, Matheus e Pedro pelo apoio moral, braçal e paciência.

Ao grupo de pesquisa do LAMASP/UEFS: Suikinai, amiga/irmã, uma ajuda incondicional em vários momentos; Deborah; Lidiane; Sidnei; Marcel; Amauri; Brena; Murilo; Dani; Gegê; Elinalva e prof^a. Suzi, pelo apoio e companheirismo.

Aos cientistas mais “loucos” que eu, amigos e colegas do Laboratório de Química e Fertilidade do Solo (UESC): Miguel, parceiro de devaneios, comentários “houseanos” e trabalhos em biologia molecular; Helen M., pelos trabalhos em biologia molecular; Carol, pelos momentos de descontração; James, pelas sementes de alface, dicas nos cultivos das plantas e nos cálculos estatísticos; Hellen L; Thales; Daniel; Marcela; Raimundo; Marcos; Éverton e Lucas, pelo acolhimento, apoio, companheirismo, amizade e troca de conhecimentos.

Aos professores Carlos Priminho, Fátima, Márcio e João pela oportunidade, disponibilidade, acolhida e sugestões preciosas.

A todos os professores, funcionários e colegas do Centro de Biotecnologia e Genética (UESC), pelo pronto apoio na execução do meu trabalho.

Aos colegas dos laboratórios de Cultura de Tecidos e de Microbiologia Ambiental (UESC), pela partilha nas tarefas, das incontáveis autoclavações, pelas trocas de experiências e ensinamentos, pela disponibilização dos espaços e dos materiais, em especial a Lucina, Amanda, Laís, Éverson, Denise, Milena, Ana Cássia.

Aos colegas Alone e Bruno do Laboratório de Cultura de Tecidos, (Horto / UEFS) pelas plântulas de sempre vivas e treinamentos em propagação.

Aos colegas Gisele e Ricardo da Microscopia Eletrônica (UEFS); Marcel e Valéria da Microscopia eletrônica (UESC) pela disponibilidade dos materiais e ensinamentos, também pela paciência e dedicação no fazer das micrografias.

Aos funcionários da manutenção e dos serviços gerais da UESC, D. Carmem e Raimundo, sempre prontos a ajudar na transformação e adaptação dos espaços para a montagem de alguns experimentos.

Ao secretário da PPGBIOTEC, Helton, pela atenção profissional.

Ao prof. Dr. Aristóteles Góes Neto coordenador do LAPEM (UEFS).

À Universidade Estadual de Feira de Santana, por meio do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pela oportunidade da realização do trabalho e do aperfeiçoamento técnico-científico.

A todos, enfim, que estiveram presentes em algum momento no decorrer desta conquista, meus sinceros agradecimentos.

FORMAÇÃO DE BIOFILME POR RIZOBACTÉRIAS ISOLADAS DE PLANTAS DO SEMI-ÁRIDO BAIANO

Orientada: Maíra Mercês Barreto

Orientador: Eduardo Gross

RESUMO

As bactérias estão presentes e ocupam inúmeros nichos no ambiente, dentre os quais a rizosfera das plantas colonizando as raízes e formando biofilmes. Os biofilmes são micro-ecossistemas compostos por células microbianas envoltas por uma matriz exopolissacarídica (EPS). A natureza e concentração dos nutrientes disponíveis às bactérias influenciam na estrutura do biofilme e, nas características e quantidades do EPS produzido. Os gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Alcaligenes*, frequentemente encontrados no solo rizosférico, associam-se à raiz de plantas, e a maioria delas forma biofilmes estabelecendo interações comensais, mutualísticas ou patogênicas. Neste estudo, foi avaliada a produção de biofilme sob diferentes condições de crescimento por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas isoladas do solo rizosférico de plantas de Campo Rupestre do Semi-Árido baiano, observando a formação do biofilme e o efeito dessas rizobactérias em plantas de alface e tomateiro. Foram caracterizadas morfológicamente as colônias dos isolados, estes identificados molecularmente, analisando o gene 16S rRNA. O biofilme foi caracterizado micromorfológicamente e quantitativamente em relação a diferentes concentrações e tipos de açúcares. O biofilme dos isolados apresentou topografias diversas, quando as bactérias foram cultivadas na presença de diferentes concentrações e tipos de açúcares, sendo que cada isolado apresentou maior produção de EPS em um tipo e em uma concentração do monossacarídeo. O isolado Gram-positivo Rizo 35, em meio suplementado com galactose a 6%, e o isolado Gram-negativo, Slim 04, crescido em meio com glicose a 6% apresentaram os maiores valores para produção de EPS. Nenhum dos isolados promoveu o crescimento das plantas de tomateiro e de alface nas condições axênicas dos experimentos.

Palavras-chave: Exopolissacarídeos, Metabolismo microbiano, Micromorfologia,

ABSTRACT

BIOFILM PRODUCTION BY RHIZOBACTERIA ISOLATED FROM PLANTS OF THE SEMI-ARID REGION OF BAHIA STATE

Orientada: Máira Mercês Barreto

Orientador: Eduardo Gross

ABSTRACT

Bacteria occupy several niches in the environment, among them plant rhizosphere. Biofilms are microenvironments composed of microbial cells surrounded by an exopolysaccharide matrix (EPS). The nature and concentration of the nutrients available to bacteria influence biofilm structure, general characteristics and quantity of the produced EPS. The genera *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Alcaligenes* are frequently found in soil and associated to plant roots. Where many species form biofilms establishing comensal, mutualistic or pathogenic interactions with the plants. In our studies, biofilm production under different growth conditions by Gram positive and Gram negative bacteria isolated from the rhizosphere of Rupestrian Field plants of Bahia Semi-Arid region and their effects on tomato and lettuce plants. Were evaluated morphology of the colonies and molecular identification by 16S rRNA gene. Sequencing were performed. Biofilm was characterized micromorphologically and quantified in relation to different sugar types and concentrations. The biofilm produced showed diverse characteristics when bacteria were cultivated in different sugar trees ad concentrations. Isolates produced different amounts of EPS independent on the type and concentration of the monosaccharides used for growth. The Gram-positive isolate Rizo 35 cultivated on galactose at 6%, and the Gram-negative isolate Slim 04 grown o 6% glucose presented higher EPS production. None of the isolates promoted growth of tomato and lettuce in our experiments.

Palavras-chave: Exopolissacarides, Microbial metabolism, Micro-morphology.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	11
Microrganismos do Solo	12
Rizosfera	12
Rizobactérias	13
Biofilme	13
OBJETIVOS	
GERAL	17
ESPECÍFICOS	17
REFERENCIAS	18
CAPITULO 1:	21
Produção e micromorfologia de exopolissacarídeos de rizobactérias Gram-negativas do Semi-Árido baiano	
RESUMO	21
Palavra chave	21
1. INTRODUÇÃO	22
2. MATERIAIS E MÉTODOS	25
2.1. Identificação e manutenção das bactérias	25
2.2. Experimentos <i>in vitro</i> e <i>in planta</i>	27
2.2.1. Caracterização morfológica dos isolados	27
2.2.2. Caracterização micromorfológica do biofilme dos isolados	28
2.2.3. Avaliação da produção de exopolissacarídeos (EPS) dos isolados	29
2.2.4. Avaliação da colonização dos isolados em raízes de plantas	30
3. RESULTADOS	32
3.1 Isolados Bacterianos	32
3.2. Experimentos <i>in vitro</i> e <i>in planta</i>	32
3.2.1. Caracterização morfológica dos isolados	32
3.2.2. Caracterização micromorfológica do biofilme dos isolados	35
3.2.3. Avaliação da produção de exopolissacarídeos (EPS) pelos isolados	39
3.2.4. Avaliação da colonização dos isolados em raízes de plantas	43

4. DISCUSSÃO	46
5. REFERÊNCIAS	49
CAPITULO 02:	53
Produção e micromorfologia de exopolissacarídeos de rizobactérias Gram-positivas do Semi-Árido baiano	
RESUMO	53
Palavra chave	53
1. INTRODUÇÃO	54
2. MATERIAIS E MÉTODOS	57
2.1. Identificação e manutenção das bactérias	57
2.2. Experimentos <i>in vitro</i> e <i>in planta</i>	58
2.2.1. Caracterização morfológica dos isolados	58
2.2.2. Caracterização micromorfológica do biofilme dos isolados	59
2.2.3. Avaliação da produção de exopolissacarídeos (EPS) dos isolados	59
2.2.4. Avaliação da colonização dos isolados em raízes de plantas	59
3. RESULTADOS	61
3.1. Identificação e manutenção das bactérias	61
3.2. Experimentos <i>in vitro</i> e <i>in planta</i>	61
3.2.1. Caracterização morfológica dos isolados	61
3.2.2. Caracterização micromorfológica do biofilme dos isolados	64
3.2.3. Avaliação da produção de exopolissacarídeos (EPS) dos isolados	68
3.2.4. Avaliação da colonização dos isolados em raízes de plantas	71
4. DISCUSSÃO	74
5. REFERÊNCIAS	77
CONSIDERAÇÕES FINAIS	81
ANEXO	83
APÊNDICE	105

INTRODUÇÃO GERAL

O Semi-Árido brasileiro possui características geográficas e condições extremas de fatores físico-ambientais que garantem uma variedade de ecossistemas. Essa diversidade engloba também as comunidades microbianas existentes no solo dessa região (GUSMÃO e MAIA, 2006). Pesquisa recente concluiu que o conhecimento da diversidade de microrganismos no Brasil é limitado a poucos grupos taxonômicos (MANFIO, 2006)

O conhecimento de comunidades microbianas associadas às raízes de plantas nos diferentes ecossistemas, apesar de ainda limitado, pode resultar em aplicações como a do uso desses microrganismos em diversos processos de interesse para o homem (SILVEIRA e FREITAS, 2007). Nesse sentido, a bioprospecção utilizando rizobactérias busca a produção de biofilmes com potencial aplicação biotecnológica. Isolar as linhagens bacterianas existentes na rizosfera é o primeiro passo para entender quais as condições necessárias para a formação do biofilme e dos exopolissacarídeos em condições controladas de crescimento *in vitro* (meios de cultura) e *in vivo*.

Em virtude da vasta gama de recursos genéticos ainda não explorados no Brasil, se faz necessário conhecer a dinâmica de sobrevivência de microrganismos associados às plantas de diversos ecossistemas e suas potencialidades. A carência de informações científicas sobre muitos desses recursos reforça a necessidade de pesquisas na área, inclusive sobre a formação de biofilme por rizobactérias dos Campos Rupestres baianos.

São apresentados e discutidos aqui os resultados obtidos a partir das seguintes questões: Quais são as condições para a produção de biofilme por diferentes linhagens de rizobactérias isoladas de plantas endêmicas do Semi-Árido baiano, e qual a relação desse biofilme e dos microrganismos com a planta? Respondidas, total ou parcialmente, essas questões trouxeram informações sobre as condições de cultivo para maior produção do biofilme dessas bactérias, bem como, evidências sobre o papel do biofilme na interação com a planta denotando a potencial aplicabilidade biotecnológica desse biofilme e das bactérias estudadas.

Microrganismos do Solo

A microbiota residente no solo pode ser compreendida como uma comunidade complexa e rica, difícil de ser estudada e caracterizada (STALEY, 1998; MAZZOLA, 2004). Os microrganismos, entretanto, são essenciais à manutenção e funcionamento do solo, tanto nos ambientes naturais quanto nos agrícolas, vez que influenciam em processos determinantes, como a estruturação e o pH do solo, a decomposição de matéria orgânica, a biorremediação, os ciclos biogeoquímicos dos elementos e o controle de fitopatógenos. Constituem ainda fonte e dreno de nutrientes em todos os ecossistemas, além de promoverem as mais diversas alterações nos atributos do solo que influenciam o crescimento vegetal (TATE e KLEIN, 1985; GARBEVA et al, 2004; MELLONI et al, 2008).

Os microrganismos são capazes de crescer utilizando distintas fontes de energia e carbono e, de ocupar uma variedade de nichos ecológicos. Essa adaptabilidade é especialmente observada nos microrganismos do Domínio Bactéria, e um exemplo bem estudado de diversidade metabólica é *Escherichia coli*. Essa gamaproteobactéria possui diversas citocromos oxidases em sua cadeia transportadora de elétrons, enzimas estas que são expressas dependendo do estímulo ambiental e especialmente da fonte de carbono utilizada pela bactéria (RICHARDSON, 2000). Essa adaptabilidade bacteriana está intimamente ligada ao reconhecimento das sinalizações do ambiente, o que não somente garante o crescimento da população bacteriana como resulta em diferentes interações ecológicas da microbiota (MORETTI, 2007). Fatores químicos e físicos, tais como temperatura, pressão osmótica, viscosidade, radiação, pH, gases, potenciais de oxido-redução, compostos orgânicos e inorgânicos influenciam na dinâmica de crescimento bacteriano tanto em condições controladas quanto em condições naturais (LYNCH, 1986).

Rizosfera

A rizosfera pode ser definida como a interface raiz-solo, ou seja, a fina camada do solo influenciado pelas raízes (KLOEPPER, 1996). Nesta região existem comunidades de microrganismos em atividade, que utilizam como substrato o carbono, os gases, os íons, os aminoácidos e as vitaminas obtidos por rizodeposição (CARDOSO e NOGUEIRA, 2007).

O sinergismo existente na rizosfera garante à planta uma dinâmica favorável à sua nutrição. Assim, ocorrem os processos de mineralização, nitrificação e amonificação, além das simbioses envolvidas no aumento da aquisição de nutrientes como as micorrizas, os rizóbios e as rizobactérias. Os efeitos significativos das raízes no solo contribuem para alterar os aspectos físicos, químicos, microbiológicos e edáficos (MELO et al., 2002; MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Na rizosfera, portanto, são encontradas bactérias (também chamadas de rizobactérias) que atuam produzindo metabólitos como auxinas, antibióticos, ácidos, enzimas extracelulares, polissacarídeos que podem influenciar o microhabitat e as plantas associadas (VON DER WEID et al., 2005). Algumas rizobactérias são fitopatógenas, outras são potentes agentes de controle de doenças que atacam o sistema radicular, outras ainda são promotoras de crescimento de plantas. Estas últimas são relativamente bem estudadas devido a sua aplicabilidade na agricultura e por alguns gêneros serem facilmente isolados e cultivados em laboratório através de técnicas e meios de cultura convencionais, *Pseudomonas* e *Bacillus*, por exemplo (SELDIN et al., 1984; MELO et al., 2002; TIAN et al, 2007, SALEEM et al, 2007).

Rizobactérias

As rizobactérias interagem com plantas colonizando suas raízes (WELLER e THOMASHOW, 1994) estabelecendo interações que podem ser consideradas neutras, benéficas ou patogênicas (LAMBET et al., 1987, NEHL et al., 1997).

Segundo Moreira e Siqueira (2006), as populações microbianas podem variar em função da diversidade de substratos, e, na rizosfera, os compostos liberados pela raiz podem selecionar linhagens de rizobactérias adaptadas àqueles compostos exsudados (CARDOSO e NOGUEIRA, 2007).

As bactérias que colonizam raízes revelam grande versatilidade metabólica (BURR e CAESAR, 1985). Ao longo do processo evolutivo, as rizobactérias desenvolveram mecanismos especializados para degradar compostos naturais complexos (biomacromoléculas), como a lignina, a celulose, a quitina, as substâncias húmicas e utilizar as subunidades como fonte de carbono (MELO et al., 2002).

Por apresentarem estratégias de sobrevivência nas mais diversas condições do meio, algumas espécies de rizobactérias demonstram grande potencial como inoculante, já que são capazes de colonizar sementes e o rizoplano das plantas e, de competir com a microbiota nativa (MELO et al., 2002).

Schroth e Hancock (1981) adotaram o termo Rizobactérias Promotoras de Crescimento em Plantas (RPCP) para descrever bactérias benéficas e adaptadas às condições do nicho radicular. Os gêneros mais comuns de RPCP já isolados e estudados são: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Alcaligenes*, *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Arthrobacter*, *Enterobacter* e *Azotobacter* (SALEEM, 2007; RUDRAPPA et al., 2008)

As rizobactérias executam diferentes papéis na rizosfera, como atuação no controle biológico de doenças, na produção de antibióticos e na indução da resistência sistêmica, destacadamente as dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* (VON DER WEID et al., 2005). Bactérias dos gêneros *Agrobacterium*, *Serratia*, *Enterobacter* e *Rhizobium* atuam na redução da população de nematóides, interferindo no desenvolvimento dos juvenis e no reconhecimento nematóide-planta (TIAN et al, 2007). Diversas linhagens de *Corynebacterium paurometabolus* apresentam antagonismo com outros microrganismos através da produção de toxinas, enzimas e outros produtos metabólicos, enquanto que várias espécies de *Pseudomonas* fluorescentes apresentam atuação na detoxificação de xenobióticos e na degradação de poluentes (YEE et al., 1998).

Diversas espécies bacterianas pertencentes aos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* são relatadas e denominadas na literatura como sendo rizobactérias promotoras de crescimento de plantas, em virtude das atividades benéficas ao desenvolvimento vegetal que propiciam. As RPCP agem por meio de vários mecanismos, dentre os quais se destacam: solubilização e suprimentos de nutrientes (N, P, Mn e Fe); produção de fitormônios (citocininas, giberilinas e

auxinas); produção de sideróforos (substâncias que quelam o ferro na rizosfera); mineralização da matéria orgânica (fosfato orgânico, por exemplo), supressão dos microrganismos fitopatogênicos (NEILANDS, 1995; RODRÍGUEZ e FRAGA, 1999; BERTRAND *et al.*, 2001; MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Vários membros do gênero *Bacillus* (*B. cereus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*) e *Pseudomonas* spp., isolados de solo rizosférico de regiões semi-áridas, sintetizam metabólitos naturais antifúngicos, que agem como agentes de biocontrole de fungos fitopatógenos (KISHORE e PANDE, 2007).

A introdução de RPCP no solo ou em sementes pode trazer benefícios diretos para a agricultura, sendo uma alternativa de manejo que possibilita menor uso de insumos agrícolas. Esses benefícios já foram observados em diversas culturas, dentre as quais se destacam alface e tomate, espécies frequentemente utilizadas em experimentos com RPCP (WELLER e THOMASHOW, 1994, FREITAS *et al.*, 2003, MAYAK *et al.* 2004). Cabe salientar, entretanto, que a ação das RPCP pode ser limitada pela dificuldade da colonização das raízes (WELLER, 1998), e um importante fator que permite essa colonização é a formação de biofilme na superfície desses órgãos (RUDRAPPA *et al.*, 2008).

Biofilme

A maior parte da atividade bacteriana na natureza ocorre com as bactérias organizadas em comunidades sob a forma de um biofilme. A alta densidade da população fornece elementos para apresentar certos processos, que células únicas não poderiam realizar com eficácia. A formação do biofilme é um modo de manter uma massa celular em local específico por períodos suficientes para iniciar interações benéficas e/ou antagônicas (DANHORN e FUQUA, 2007).

Os biofilmes podem ser constituídos por uma comunidade de células microbianas aderida à superfície inerte ou viva e envolvido por uma matriz de exopolissacarídeos (EPS). Este é um polímero de elevado peso molecular composto de resíduos de açúcares e que é secretado pelo microrganismo produtor para o ambiente circundante (O'TOOLE *et al.*, 2000). O complexo rizobactéria-matriz

constitui uma estratégia de proteção que a bactéria utiliza para o seu desenvolvimento, enquanto permite a sobrevivência em ambientes adversos, além de favorecer as relações simbióticas (RUDRAPPA et.al, 2008).

Nas interações que estabelece com o ambiente, a vida em biofilme apresenta vantagens para a comunidade bacteriana, como por exemplo, o aumento da resistência aos estresses ambientais, a tolerância antimicrobiana, a proteção a ataque de protozoários, o metabolismo em conjunto, a oportunidade para transferência horizontal de gene, dentre outros (RUDRAPPA et al., 2008).

O padrão de desenvolvimento de um biofilme envolve várias etapas: a adesão inicial à superfície, seguida da formação de microcolônias e, na maioria dos casos, a diferenciação das micro em macrocolônias envolvidas numa matriz de exopolissacarídeo formando os biofilmes maduros (O'TOOLE et al, 2000). Dos mecanismos desenvolvidos pelas bactérias para aderência e colonização, alguns podem ser altamente específicos à espécie de planta, como também às condições das superfícies (DANHORN e FUQUA, 2007).

Segundo O'Toole et al.(2000), a formação de biofilme pode ser desencadeada por sinais ambientais muito distintos, por exemplo, em *P. aeruginosa* acontece em um ambiente rico em nutrientes e em *Bacillus* ocorre em ambiente escasso em nutrientes.

OBJETIVOS

GERAL

Avaliar a formação de biofilme produzido por bactérias isoladas do solo rizosférico de plantas de Campo Rupestre do Semi-Árido baiano sob diferentes condições de crescimento e observar a formação do biofilme e o efeito dessas rizobactérias na planta.

ESPECÍFICOS

Estabelecer parâmetros de pH, temperatura e nutricionais de cultivo das rizobactérias e formação do biofilme;

Caracterizar morfologicamente os isolados bacterianos crescidos em diferentes meios de cultura, açúcares e concentração desses açúcares;

Avaliar a produção de EPS desses isolados submetidos a diferentes fontes de carbono em diferentes concentrações;

Analisar a micromorfologia do biofilme produzido pelas rizobactérias crescidas em diferentes meios de cultura;

Observar a colonização e produção de biofilme dessas rizobactérias nas raízes de tomate e alface.

Avaliar o crescimento dessas plantas inoculadas com os diferentes isolados bacterianos.

REFERÊNCIAS

- BERTRAND, H.; NALIN, R.; BALLI, R.; CLEYET-MAREL, J.C. Isolation and identification of the most efficient plant growth promoting bacteria associated with canola (*Brassica napus*). *Biology and fertility soils*. v.33, p.142-156, 2001.
- BURR, T.J.; CAESAR, A. Beneficial plant bacteria. *CRC Critical Reviews in Plant Sciences*. v.2, n.1, p.1-20, 1985.
- CARDOSO, E.J.B.N.; NOGUEIRA, M.A. A. Rizosfera e seus Efeitos na Comunidade Microbiana e na Nutrição de Plantas. *In: Microbiota do solo e qualidade ambiental* Campinas: Instituto Agronômico. p.79 – 96, 2007.
- DANHORN, T.; FUQUA, C., Biofilm Formation by Plant-Associated Bacteria, *Annu. Rev. Microbiol.* V.61, p.401–22, 2007.
- FREITAS, S.S.; DE MELO, A.M.T.; DONZELI, V.P. Promoção de crescimento de alface por rizobactérias. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, v. 27, n. 1, p. 61-70, 2003.
- GARBEVA, P.; VAN VEEN, J.A.; VAN ELSAS, J.D.. Microbial diversity in soil: Selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annual Review of Phytopathology*. v.42, p.243- 270, 2004.
- GUSMÃO, L.F.P.; MAIA, L.C. Diversidade e caracterização dos fungos do Semi-árido brasileiro, Recife, Associação plantas do nordeste, v.II, 2006.
- KLOEPPER, J.W.; SCHER, F.M.; LALIBERTE, M.; TIPPING, B. Emergence-promoting rhizobacteria: description and implications for agriculture. *In: Iron, Siderophores and Plant Disease* ed. Swinburne, T.R. Plenum, NY: CRC Press Inc. FL, USA: Boca Raton. p.155–164, 1986.
- KISHORE, G.K.; PANDE, S.. Chitin-supplemented foliar application of chitinolytic *Bacillus cereus* reduces severity of *Botrytis* gray mold disease in chickpea under controlled conditions. *Letters in Applied Microbiology*. v.44, n.1, p.98-105, 2007.
- Kloepper, J. W.. Host specificity in microbe-microbe interactions. *BioScience*, v.46, p.406-409, 1996.
- LAMBET et al. Rhizobacteria of Maize and Their Antifungal Activities. *Applied and Environmental Microbiology*. Augst, p.1866-1871, 1987.
- LYNCH, J. M. Biotecnologia do Solo: fatores microbiológicos na produtividade agrícola, Ed. Manole, São Paulo, 209p., 1986.
- MANFIO, G.P. *In: Avaliação do estado de conhecimento da biodiversidade brasileira*. Org.Lewinsohn, T.M. Brasília: MMA. v.1, 520p., 2006.

MAYAK, S.; TIROSH, T.; GLICK, B.R. Plant growth–promoting bacteria that confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, v.42, p.565–572, 2004a.

MAZZOLA, M. Assessment and management of soil microbial community structure for disease suppression. *Annual revision of Phytopatology*. v.42, p.35-59, 2004.

MELLONI, R.; MELLONI, E. G. P.; ALVARENGA, M. I. N. Indicadores da qualidade do solo. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte. v. 29, n. 244, p. 17-29, 2008.

MELO, I.S. Recursos genéticos microbianos. In: MELO, I.S.; VALADARE – INGLIS, M.C.; NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C. *Recursos Genéticos e Melhoramento – Microrganismos*. Jaguariúna, EMBRAPA Meio Ambiente, 743p. 2002.

MOREIRA, F. M. S; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e bioquímica do solo. 2. ed. Lavras, Ed. UFLA, 729p. 2006.

MORETTI, P.E. 2007, Microbiologia, Saúde e Ambiente. Disponível em: <http://www.fam.br/microrganismos/bacteriologia_crescimento>. Acesso em: 26 janeiro 2008.

NEHL, D.B.; ALLEN, S.J.; BROWN, J.F. Deleterious rhizosphere bacteria: an integrating perspective. *Applied Soil Ecology*, v.5, n.1, p.1-20, 1997.

NEILANDS, J.B. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 270, p. 26 723-26 726, 1995.

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H.B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* v.54, p.49–79, 2000.

RICHARDSON, A. E. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Australian Journal of Plant Physiology*, Canberra, v. 28, n. 9, p. 897-906, 2000.

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, v. 17, p. 319-339, 1999.

RUDRAPPA, T.; BIEDRZYCKI, M.L.; BAIS, H.P. Causes and consequences of plant-associated biofilms. *FEMS Microbiol Ecol.* v. 64, p.153–166, 2008.

SALEEM, M.; ARSHAD, M.; HUSSAIN, S.; BHATTI, A.S. Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2007

SCHROTH, M.N.; HANCOCK, J.G. Selected topics in biological control. *Annual Review of Microbiology*, Palo Alto, v.35, p. 453 – 476, 1981.

SELDIN, L.; VAN ELSAS, J.D.; PENIDO, E.G.C. *Bacillus azotofixans* sp. nov., a nitrogen-fixing species from Brazilian soils and grass roots. *International Journal of Systematic Bacteriology*. v.34, p.451-456, 1984.

SILVEIRA, A.P.D., FREITAS, S.S., *Microbiota do solo e qualidade ambiental*. Campinas: Instituto Agronômico, 312 p. 2007.

STALEY, J. 1998. *Microbial Diversity and the Biosphere*. Disponível em : <http://www.bdt.org.br/oea/sib/staley>> (Acesso em 13 janeiro 2009).

TATE III, R.L.; KLEIN, D.A. (ed.). *Soil Reclamation Processes: microbiological analyses and applications*. New York: Marcel Dekker. 33p., 1985.

TIAN, B.; YANG, J.; ZHANG, K.Q. Bacteria used in the biological control of plant-parasitic nematodes: populations, mechanism of action, and future prospects. *FEMS Microbiology Ecology*. v. 61, p. 197-213, 2007.

VON DER WEID, I. et al. Antifungal and root surface colonization properties of GFP-tagged *Paenibacillus brasilensis* PB177. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 21, p. 1591-1597, 2005.

WELLER, D. M.; THOMASHOW, L. S. Current challenges in introducing beneficial Microorganisms in to the Rhizosphere. *In: O.gara, F.; Dowling, D. N.; Boesten, B. Molecular Ecology of Rhizosphere Microorganisms*. VCH Publishers, Weinheim, Alemanha. 1994.

WELLER, D.M. Biological control of soil borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology*. v.26, p.379- 407, 1998.

YEE, D.C.; MAYNARD, J.A.; WOOD, T.K. Rhizoremediation of trichloroethylene by a recombinant, root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain expressing toluene *ortho*-monooxygenase constitutively. *Applied and Environmental Microbiology*. v.64, n.1, p.112-118, 1998.

CAPÍTULO 1

Produção e micromorfologia de exopolissacarídeos de rizobactérias Gram-negativas do Semi-Árido baiano

RESUMO

Os biofilmes são micro-ecossistemas constituídos por células microbianas e por uma matriz exopolissacarídica (EPS). A formação do biofilme pode estar relacionada aos nutrientes presentes no ambiente circundante. Diferentes tipos e concentrações de carboidratos influenciam na forma e quantidade do EPS interferindo na estruturação do biofilme. As bactérias Gram-negativas são comuns em solo rizosférico, associadas a raízes de plantas e a maioria delas forma biofilme na superfície desses órgãos. Nesse estudo, a produção de biofilme por rizobactérias isoladas em Campo Rupestre do Semi-Árido baiano, foi avaliada em laboratório, crescidas em diferentes concentrações e tipos de açúcares, e observada a micromorfologia do biofilme em meio cultura e na raiz de tomate e alface, relatando a influência dos isolados no crescimento das plantas. O biofilme dos isolados apresentou diferentes topografias quando cultivado em presença de diferentes concentrações e tipos de açúcares. O isolado Slim 04 crescido em meio mínimo mineral com adição de 6% de glicose apresentou maior produção de EPS do que os outros isolados em outras concentrações de monossacarídeos. Os isolados não promoveram o crescimento das plantas de alface e tomateiro nas condições axênicas dos experimentos, e também não apresentaram sinais de patogenicidade nas plantas.

Palavras-chave: Biofilme, *Pseudomonas*, metabolismo microbiano.

1. INTRODUÇÃO

Algumas bactérias do solo têm a capacidade de colonizar a superfície de raízes de plantas e estabelecer uma relação, benéfica ou não, entre os parceiros. Quando se estabelece a simbiose mutualística, ocorre uma troca mútua de benefícios, como por exemplo, determinadas rizobactérias que têm função de promover o crescimento de plantas (DANHORN et al., 2007)

A colonização de raízes pelas rizobactérias é influenciada por fatores físicos e químicos como o pH, o potencial redox e a umidade do meio (WELLER, 1998). O substrato utilizado para o crescimento da bactéria é proveniente dos exudatos e das células lisadas ou descamadas das raízes (BAIS et al, 2004).

No processo de colonização as rizobactérias formam biofilmes que auxiliam na fixação das colônias, formando microambientes na raiz (RUDRAPPA et al, 2008). Biofilmes são micro-ecossistemas compostos por agregados de células microbianas embebidas em uma matriz extracelular geralmente exopolissacarídica (EPS), viscosa, produzida pela própria comunidade de microrganismos, que se desenvolve em sucessão, sofrendo alterações ao longo do tempo (SUTHERLAND, 2001).

Os EPS bacterianos são constituídos essencialmente por polissacarídeos e, em menor fração, por proteínas, lipídeos e ácido nucléicos. Cerca de 50 a 90% da sua estrutura é constituída de carbono orgânico, que pode ser considerado como matriz primária do biofilme (WIMPENNY et al., 2000; SUTHERLAND, 2001; PULCINI, 2001). Os EPS podem ser compostos de homo e heteropolissacarídeos de glicose, galactose, frutose, piruvato e ácido manurônico ou ácido glicurônico (BRISOU, 1995). Alguns polissacarídeos do EPS são neutros ou polianiônicos, o que se aplica no caso de EPS de bactérias Gram-negativas. A presença de ácidos urônicos (tais como D-glicurônico, D-Galacturônico e ácido manurônico) ou a ligação cetal – piruvato conferem propriedades aniônicas ao EPS (SUTHERLAND, 1990)

O crescimento de qualquer biofilme é limitado pela disponibilidade de nutrientes no ambiente circundante. Diferentes tipos de carboidratos influenciam na formação da matriz polimérica, na estruturação do biofilme e a quantidade de EPS sintetizado no biofilme dependerá do tipo e da disponibilidade das fontes de carbono (SUTHERLAND, 2001). Os nutrientes, principalmente os carboidratos, controlam a

formação do biofilme, além de influenciarem nas características fenotípicas das bactérias.

Pseudomonas é um gênero de bactérias Gram-negativas frequentemente isolado do solo rizosférico, sendo comum sua associação com raízes de plantas através da formação do biofilme na superfície (UDE et al., 2006). *P. fluorescens* é uma dessas espécies que forma biofilme, quando associada à raiz, desempenhando a função de agente de biocontrole, protegendo a planta contra fungos patogênicos. A motilidade é uma característica da maioria das linhagens de *Pseudomonas*, esse é um fator importante para a formação de biofilme, pois possibilita a rizobactéria movimentar-se, por quimiotaxia, em direção ao exudato da raiz, e a produção de EPS permite que a bactéria se associe a outros microrganismos como os fungos micorrízicos arbusculares (TURNBULL et al., 2001; BIANCIOTTO et al., 2001).

Os benefícios das rizobactérias promotoras de crescimento de plantas já foi relatada para várias espécies vegetais, inclusive alface e tomate (GASONI et al. 2001; MAYAK, 2004; SOTTERO et al. 2006). Entretanto, a formação de biofilme pode resultar em desvantagens para a planta, como foi observado quando da colonização das raízes por linhagens patogênicas de *P. aeruginosa* que impedem a ação de antibacterianos produzidos pela planta (DANHORN et al., 2007).

A composição e a estrutura do polissacarídeo determinam a conformação primária do biofilme. Por exemplo, muitas bactérias na sua estrutura principal do EPS, ligações β -1,3 ou β -1,4 em resíduos de hexoses, que podem torná-lo mais rígidos, menos deformados e, em certos casos pouco solúveis ou insolúveis. Sutherland (1990) usou a ligação específica de lecitinas com açúcares simples para avaliar desenvolvimento do biofilme bacteriano por diferentes organismos; o pesquisador mostrou que aqueles diferentes organismos produziram diferentes quantidades de EPS e que a quantidade de EPS aumentou com idade do biofilme (SUTHERLAND, 2001). Apesar dos trabalhos desenvolvidos, a composição de EPS de biofilmes ambientais ainda é pouco conhecida.

A determinação da arquitetura de um biofilme, particularmente o arranjo do EPS e das microcolônias têm implicações para a função destas complexas comunidades e, através de técnicas microscópicas, tem sido possível observar a grande heterogeneidade tridimensional dos biofilmes. A microscopia eletrônica de

varredura (MEV) é uma das ferramentas utilizadas na caracterização morfológica dos biofilmes de microrganismos cultiváveis (DONLAN, 2002). O MEV é ainda uma ferramenta eficaz de monitoramento do processo de colonização e formação de biofilmes na raiz da planta, e é parte integrante das metodologias para rastrear e descobrir linhagens microbianas, que possuam atividade eficaz para aplicação na agricultura ou na biotecnologia (CHIN-A-WOENG et al., 1997)

A região Semi-Árida brasileira abrange oito estados do nordeste e se estende entre os paralelos 3-17°S e 35-45°W, abrangendo uma área de 969.589,4 Km² (BRASIL, 2006). Nessa extensa região de terras áridas em áreas acima de 800-900m do complexo orográfico da Cadeia do Espinhaço da Serra Geral, no estado da Bahia, ocorre uma formação vegetacional característica denominada de Campo Rupestre (GIULIETTI *et al.* 1997). O Campo Rupestre pode ser considerado como uma vegetação do tipo savânica, com predominância de um estrato herbáceo-subarbustivo extenso sobre solos arenosos rasos, com fisionomias variando desde campos limpos praticamente sem árvores e arbusto, até a formação arbustivo-arbórea densa (GIULIETTI, et al. 2006). Um tapete herbáceo de monocotiledôneas, composto principalmente de espécies de Xyridaceae, Eriocaulaceae, Velloziaceae, Graminae e Cyperaceae, entremeado por arbustos e substratos de dicotiledôneas, especialmente de Malpighiaceae, Melastomataceae, Compositae e Rubiaceae (JOLY 1970, GIULIETTI *et al.* 1987) são seus típicos componentes florísticos.

Nesse trabalho, foi avaliada em laboratório a produção de biofilme por rizobactérias isoladas em Campo Rupestre do Semi-Árido baiano crescidas em açúcares e concentrações diferentes, foi observada a micromorfologia do biofilme formado em meio cultura e na raiz de tomate e alface e analisada a influência dos isolados no crescimento das plantas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. IDENTIFICAÇÃO E MANUTENÇÃO DAS BACTÉRIAS

As linhagens utilizadas neste trabalho foram isoladas do solo rizosférico de *Stachytarpheta crassifolia* Schauer (Verbenaceae) e *Actinocephalus* sp. (Eriocaulaceae), plantas do Campo Rupestre da Chapada Diamantina. As coletas dos solos rizosféricos foram realizadas no Parque Municipal de Mucugê, município de Mucugê, BA. O solo dessa região é raso do tipo arenoso (arenito ou quartzito) predominantemente ácido, com baixa fertilidade (Tabela1), sobre manto rochoso em relevo muito acidentado. O clima é mesotérmico, caracterizado por invernos secos e verões brandos e chuvosos (TORRES; CORDEIRO; GIULIETTI, 2003).

Tabela 1. Análise química do solo rizosférico das espécies de plantas coletadas no Parque Municipal de Mucugê, Mucugê, BA.

Amostra	pH	MO	P	S	K	Ca	Mg	Al	H+Al	SB	T	V	M	B	Cu	Fe	Mn	Zn
	CaCl ₂	g.dm ⁻³	mg dm ⁻³	mg dm ⁻³	mmol _c dm ⁻³	%	%	mmol _c dm ⁻³	mg DM ⁻³	mg DM ⁻³	mg DM ⁻³	mg DM ⁻³						
Solo																		
Mucugê	3,0	34	2	14	0,2	1	1	9	72	2,2	74,2	3	80	0,18	0,1	51	1,3	0,2

MO = matéria orgânica, SB = saturação por bases; T = capacidade de troca catiônica, V = porcentagem de saturação por bases; M = índice de saturação por alumínio tocável

Os isolados de rizobactérias utilizadas nesse trabalho fazem parte da coleção do Laboratório de microbiologia Ambiental e Aplicada à Saúde Pública (LAMASP) da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), com os seguintes registros: Slim 03, Slim 04 e Mrbs 12 (SANTOS, 2008; dos SANTOS, 2008). As linhagens Slim 03, Slim 04 foram obtidos partir do solo rizosférico de *Actinocephalus* sp (dos Santos, 2008) e a Mrbs 12 isolada do solo rizosférico de *Stachytarpheta crassifolia* (Santos, 2008). O isolado Mrbs 12 foi identificado molecularmente como sendo a espécie *Alcaligenes faecalis* (SANTOS, 2008).

Para a identificação molecular dos isolados Slim 03 e Slim 04 foram realizadas extrações do DNA genômico de colônias crescidas caldo TY (SOMASEGARAN & HOBEN, 1994) e sequenciamento do gene da subunidade menor do DNA ribossômico 16S.

As condições de extração do DNA genômico foram as seguintes: as células das colônias crescida em caldo TY foram separadas por centrifugação a

11,337 x g, e suspensas em tampão de extração (tris HCl pH 8,0 200mM, EDTA 250 mM, NaCl 1,5M, SDS 2,0%, CTAB 1%); a mistura foi homogeneizada e incubada a 65°C, por 40 minutos e, em seguida, foram adicionados acetato de potássio 3M (pH 5.2), para precipitar proteínas e polissacarídeos. Na etapa de purificação um volume de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1 v/v/v) foi utilizado para separar o rDNA da fase orgânica através de centrifugação a 11,337 x g por 15 min; esse procedimento foi repetido por duas vezes. Ao final, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e misturado com 0,25 volumes de acetato de amônia 10M e 0,75 volumes de isopropanol, para precipitar o rDNA, e mantidos por 40min, a -20°C (adaptado de Sambrook et al., 2001). A precipitação do rDNA foi seguida de centrifugação por 10 min a 9,660 x g. O sobrenadante foi completamente removido, usando micropipeta e o *pellet* de DNA, lavado com etanol gelado 70% (v/v). O DNA foi ressuspensão em 60 µL de água ultra pura e estocado em congelador à -20 °C até o uso.

A reação em cadeia da DNA polimerase (PCR) foi executada amplificando a região de aproximadamente 1500 pb do 16S rRNA em termociclador (GeneAmp, PCR System 9700), utilizando para Slim 04 os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) fD1 5' – AGAGTTTGATCCTGGCTCAG – 3' e rD2 5' – AGAGTTTGATCATGGCTCAG – 3' (WEISBURG et al., 1991), e para a Slim 03 os *primers* F27 5'-AGAGTTTGATCMGGCTCAG-3' e R1525 5'-AAGGAGGTGWTCCARCC-3' (Lane, 1991). Cada 50 µL da mistura para PCR continha 5 ng rDNA, 1X tampão de PCR, 200 µM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfatado, 0,2 µM de cada *primer*, 3,7 mM MgCl₂, e 2,85 U Taq DNA polimerase (Taq DNA Polymerase, PROMEGA). Os parâmetros das reações de amplificação com os *primers* rD1 e fD2 foram: 1 ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 3 min, seguido por 34 ciclos de 95°C por 45 segundos (desnaturação), anelamento a 59°C por 45 segundos, e extensão a 72°C por 1 min, além de 1 ciclo final de extensão a 72°C por 5 min. A amplificação do DNA usando primers F27 e R1525 foi procedida da desnaturação inicial de 5 min a 94°C, seguida por 35 ciclos de 1 min a 94°C, 2 min a 60°C e 1 min a 72°C e a extensão final de 30 min a 72°C. Um isolado de *Pseudomonas aeruginosa* (CCBM 268) foi utilizado como controle positivo na análise de PCR. Os produtos da PCR foram analisados através de eletroforese em

gel de agarose 1% em tampão 1X TAE e as concentrações (em ng) destes produtos foram quantificadas por espectrometria (Genequant pro, Amesham Biosciences). As amostras amplificadas foram encaminhadas para a MacroGen Corp. (Rockville, MD, EUA) para seqüenciamento do gene 16S rRNA. Os eletroferogramas resultantes foram processados através do Software DNA Baser v.2 (HeracleSoftware, Alemanha) e a sequência consenso de cada isolado foi comparada (através da ferramenta BLAST) com seqüências depositadas em banco de dados público (RDP Project) e (GenBank), para identificação da espécie bacteriana.

Os isolados foram criopreservados em caldo nutriente (70%) e glicerol (30%) (v/v) a -80°C, e depositados na Coleção de Cultura de Microrganismos da Bahia (CCMB) na UEFS.

2.2. EXPERIMENTOS *IN VITRO* E *IN PLANTA*

2.2.1. *Caracterização morfológica dos isolados*

Testes preliminares foram realizados com os 4 isolados de rizobactérias em meio ágar Müller-Hinton e meio mineral mínimo suplementado com glicose e galactose. Os microrganismos foram semeados, através de estrias compostas, para placas de Petri (15 x 100 mm) autoclavadas, contendo o meio e incubadas durante 24h, a 28°C. Foram anotadas as características de forma, elevação, margem e produção de muco das colônias.

Posteriormente, foram analisadas as características macroscópicas das colônias e o comportamento dos isolados em meios de cultura com duas fontes de carbono e, em diferentes concentrações. Os isolados foram crescidos em meio ágar nutriente (AN), em meio ágar mineral mínimo com glicose e galactose em três concentrações distintas de 0,2%, 2% e 10%, em meio ágar-água com glicose e galactose nas mesmas concentrações supracitadas e, em meio ágar mineral mínimo (MM), composto apenas de macro e micronutrientes, sem fonte de carbono. Os inóculos foram preparados em caldo nutriente, incubados sob agitação de 180 rpm (Marconi, MA420), durante 24h, a 28°C. Em seguida, foram padronizados para 1×10^8 UFC.mL⁻¹, com D.O. de 0,08 a 0,10 de absorbância, com comprimento de onda de 600nm (espectrofotômetro, BEL-1105). Cada um dos três isolados foi inoculado

em triplicata, utilizando 100µL da suspensão e através de espalhamento em superfície, e incubados a 28°C. O crescimento e as características morfológicas das colônias foram observados nos intervalos de 18, 24, 48 e 72h.

Para avaliação microscópica Os isolados, avaliados macroscopicamente foram cultivados em AN por 24h, a 28°C, realizando-se esfregaço em lâmina, seguidos de coloração de Gram (KONEMAN, 2001). As lâminas foram observadas em microscópio óptico (Leica, DMLB) e fotografadas (câmera Sony Cyber Shot P93A) com aproximação de 1,7 de zoom e na objetiva 100x, com optovar 2x. Foram observadas também as características da parede, presença de cápsula, e forma e dimensão das células bacterianas.

2.2.2. Caracterização micromorfológica do biofilme dos isolados

Para a caracterização morfológica do biofilme através da microscopia eletrônica de varredura, os isolados foram crescidos em meio mineral mínimo com duas diferentes fontes de carbono. Os isolados foram cultivados em caldo nutriente, pH 6,8, durante 24 h, a 28 °C, com agitação de 180 rpm (Marconi, MA420), caldo este utilizado como inóculo.

Discos estéreis de membranas com diâmetro de 5 mm, porosidade de 0,45 µm (PVDA, Milipore®) foram colocados sobre os meios ágar mineral mínimo com 2% de glicose, ágar mineral mínimo com 2% de galactose e apenas meio mineral mínimo. Sobre os discos de membranas foram colocados 5 µL do inóculo de cada isolado, cultivados por 24 h, a 28 °C (Modificado de PRIESTER et al., 2007).

As membranas com as rizobactérias cultivadas foram retiradas e fixadas em solução de Karnovski modificado (glutaraldeído 2%, paraformaldeído 2% em tampão fosfato de sódio 0,1 M), durante 8 horas. Uma membrana estéril sem inóculo também foi fixada para ser usada como controle negativo. As membranas fixadas foram desidratadas em soluções de concentrações crescentes de acetona (50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% e 100%), durante 10 minutos cada, e passadas pelo ponto crítico (Critical Point Dryer, Balzers, CPD 030), onde se retira todo o líquido da amostra; em seguida, montadas em pequenos cilindros de aço (*stubs*), utilizando fita adesiva metálica e recobertas com ouro (sputter coater, Balzers, SDC050).

As amostras preparadas foram analisadas e fotografadas no microscópio eletrônico de varredura (LEO, 1430VP), no Laboratório de Pesquisa em Microrganismos (LAPEM) da UEFS.

2.2.3. Avaliação da produção de EPS dos isolados

Para preparo do inóculo os isolados foram cultivados em caldo nutriente durante 24 h, a 28°C sob agitação a 180 rpm (agitador orbital Marconi MA376). A densidade ótica ($D.O_{A600}$) foi ajustada para 0,08 a 0,10 A em espectrofotômetro UV-visível (Varian Cary 50 Probe) correspondente a 1×10^8 UFC.mL⁻¹. Foram retirados 0,3 mL do inóculo padronizado, transferindo-se para 30 mL do meio de cultura com diferentes fontes de carbono em diferentes concentrações.

No primeiro experimento (experimento I), para avaliar quantitativamente a produção de exopolissacarídeos em meios contendo diferentes fontes carbono foi adotado um delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e quatro repetições; cada tratamento correspondeu a uma diferente fonte de carbono (glicose, galactose, maltose e frutose) única no meio de cultura. Cada repetição constou de um frasco de vidro com capacidade para 125 ml, contendo 30 mL de meio mineral mínimo (2% de extrato de levedura e 6% da fonte de carbono) e 0,3 mL do inóculo (pH 6,5) e cultivado por 48 h, a 28°C, com 180 rpm de agitação (agitador orbital, Marconi MA376). O volume inicial do inóculo correspondeu a 1% do volume do meio de cultura. Ao final do tempo de incubação, os frascos foram autoclavados a 121°C por 15 minutos para inativação das células e armazenados em geladeira (por no máximo 24 horas), até a extração do EPS.

Para extração do EPS, 15 mL da cultura foram centrifugados (Eppendorf, 5804R) a 11.000 x g na temperatura de a 4°C, por 20 minutos. O precipitado foi seco em estufa a 45 °C até peso constante, para obtenção da massa das células bacterianas. Ao sobrenadante foi adicionado duas vezes o seu volume de etanol 96%, e a solução foi mantida a 4°C por 12h; posteriormente, foi centrifugada a 11.000 x g, a 4°C, por 20 minutos para precipitação do EPS (modificado de Cerning et al, 1994). O EPS precipitado foi seco em estufa a 45°C até peso constante, e sua massa obtida em balança analítica digital (BEL Mark210a).

No segundo experimento (experimento II), os três isolados foram crescidos em diferentes concentrações das fontes de carbono preferenciais para cada isolado definido no experimento I. Para comparação da produção dos exopolissacarídeos utilizou-se uma cepa padrão de *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 13525), obtida da coleção de cultura do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde INCQS (00077). O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e quatro repetições por tratamento, cada tratamento correspondeu a diferentes concentrações (0%, 2%, 6%, 10% e 14%) do açúcar, que resultou em melhor rendimento da produção de EPS, obtida no experimento I. Cada repetição constou de um frasco de 125 mL, com 30 mL de meio (mineral mínimo, 2% de extrato de levedura e a respectiva quantidade da fonte de carbono) e 0,3mL do inóculo (pH 6,5), cultivado por 48 h, a 28°C, com 180 rpm de agitação (agitador orbital, Marconi MA376). A extração e obtenção do EPS e da massa celular foi procedida conforme descrito acima para o experimento I.

As médias da produção de massa celular e EPS dos diferentes tratamentos nos experimentos I e II foram trabalhadas através de análise de variância seguida do teste de Tukey ($p < 0,05$), utilizando o software *Statistica* 6.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA).

2.2.4. Avaliação da colonização dos isolados em raízes de plantas

Dois experimentos independentes, um com tomate e outro com alface, foram conduzidos com o objetivo de avaliar a resposta dessas plantas à inoculação com os isolados bacterianos (Slim 03, Slim 04 e Mrbs 12) e a colonização nas raízes. Para preparação do inóculo, as rizobactérias foram cultivadas em caldo nutriente por 24 horas, a 28°C, a 180 rpm, posteriormente centrifugados a 4.000 x g por 5 min, o precipitado foi ressuspenso em solução estéril de NaCl 0,85% e novamente centrifugados, a fim de retirar resíduo do caldo nutriente; o precipitado foi ressuspenso em solução NaCl 0,85% e homogeneizado em vortex, e a densidade ótica da suspensão ajustada a $DO_{(A600)}$ 1,0 a 0,80 de absorbância que foi equivalente a 1×10^6 UFC.mL⁻¹, obtida a partir de diluição seriada e contagem de UFC.mL⁻¹ por espalhamento em superfície (Modificado de ALSANIUS et al., 2002; KLERKS et al. 2007).

O delineamento adotado nos dois experimentos foi o inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e cinco repetições por tratamento para cada espécie vegetal testada. Os tratamentos corresponderam à inoculação de cada um dos isolados, um tratamento inoculado com a mistura dos três isolados e um controle (inoculação com solução salina estéril).

Sementes de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill c.v. Santa Clara) e de alface (*Lactuca sativa* c.v. Elba Crespa), previamente desinfestadas (1min em etanol 70% (v/v) e 2 min em hipoclorito de sódio 2,5 % com Tween 20 a 0,1% (v/v)), foram cultivadas em tubos de ensaio (2,5 X 18 cm) (para o tomate) e em magentas (Nippon, 8cm, 350mL) (para a alface), contendo meio nutritivo MS (Murashige e Skoog, 1962) com metade da dosagem dos nutrientes recomendados. Após germinação (7 dias para o tomate e 15 dias para a alface), cada recipiente contendo a plântula recebeu 10 µL dos inóculos bacterianos, que foram pipetados, utilizando micropipetas autoclavadas e ponteiros estéreis, a uma distância de aproximadamente 1 cm do coleto das plântulas. As plantas foram mantidas em câmaras de fotoperíodo, 27°C ± 2°C, com 16 h de luz (70 a 80 µmoles m⁻².s⁻¹) e 8 h no escuro (HABE e UESUGI, 2000).

Plantas de tomate com vinte e oito dias e de alface com trinta e cinco dias, após a inoculação das bactérias, foram coletadas e avaliadas quanto aos parâmetros de altura (somente para o tomate), área foliar (somente para a alface) (medidor de área foliar LI-COR, LI-3100), diâmetro do coleto, massa fresca da parte aérea e da raiz, volume da raiz, massa seca – por liofilização (labconco, freezone 6) da parte aérea e da raiz e biomassa total. Esses parâmetros foram analisados estatisticamente para cada espécie vegetal, por análise de variância seguida do teste de Tukey (p<0,05), utilizando o software *Statistica* 6.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA).

A colonização das raízes do tomate e da alface e a formação do biofilme bacteriano foram verificadas por microscopia eletrônica de varredura. As raízes foram fixadas em solução de Karnovsky modificado (idem ao item 2.2.2), passadas pelo ponto crítico (CPD 030; Balzers), metalizadas com ouro (SDC050, Balzers), analisadas e micrografadas no microscópio eletrônico de varredura (LEO 1430VP) no LAPEM da UEFS.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

O sequenciamento da subunidade menor do gene do RNA ribossômico (16S rDNA) permitiu identificar os isolados Slim 03 e Slim 04 como *Pseudomonas aeruginosa* (com 97 e 95% de similaridade, respectivamente); entretanto, houve similaridades mais altas com sequências depositadas que não correspondiam a espécies, como pode ser observado na Tabela 2 abaixo.

A análise molecular 16S do DNAr dos isolados demonstraram que Slim 03 como Slim 04 correspondem a mesma espécie e foram identificadas como *Pseudomonas aeruginosa*. Na tabela 2 pode-se observar a origem do isolado, o equivalente mais próximo no Blast (16S rDNA), com sua respectiva identidade e a espécie mais próxima (16S rDNA).

Tabela 2. Taxonomia dos isolados utilizados nos experimentos desse estudo. São apresentados a rizosfera da planta de origem (da qual o microrganismo foi isolado), e o equivalente (seqüência de nucleotídeos do 16S rDNA) e a espécie mais próximos de cada isolado.

Isolado	Planta hospedeira	Equivalente próximo*	Identidade	Espécie mais próxima*	Identidade
Slim 03	<i>Actinocephalus</i> sp.	Uncultured bacterium clone P1D7-474 GenBank: EF508820.1	98%	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain ZFJ-1 GenBank: EU931548.1	97%
Slim 04	<i>Actinocephalus</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp. RJS2 GenBank: EU590647.1	96%	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain PS7721-1 GenBank: EF485040.1	95%
Mrbs 12	<i>Stachytarpheta crassifolia</i>	<i>Alcaligenes faecalis</i> strain MT1 GenBank: AY823619.1	99%	<i>Alcaligenes faecalis</i> strain MT1 GenBank: AY823619.1	99%

(*) Nome seguido pelo número de acesso do gene 16S rRNA no GenBank.

3.2. EXPERIMENTOS IN VITRO E IN PLANTA

3.2.1. Caracterização morfológica dos isolados

Nos testes preliminares foram observadas as características das colônias dos isolados Slim 03, Slim 04 e Mrbs 12, que apresentaram sutis alterações quando cultivadas em meio ágar mineral mínimo com diferentes fontes de carbono - glicose

e galactose - só diferenciadas após 48 horas de incubação. Nenhuma alteração nas características morfológicas das colônias foi evidenciada, variando as duas concentrações do mesmo açúcar. No meio de cultivo ágar Müller-Hinton os isolados apresentaram, nas primeiras 24 horas de incubação, com diferenças na morfologia das colônias, em relação aos cultivados em meio ágar mineral mínimo mais fonte de carbono.

No meio de cultivo ágar Müller-Hinton, as rizobactérias apresentaram, já nas primeiras 24 horas de incubação, crescimento acelerado das colônias que evidenciaram as diferenças fenotípicas entre os isolados (Tabela 3), com as bactérias crescendo em todo o meio contido na placa. Esse comportamento não se repetiu para as mesmas, cultivadas em meio ágar mineral mínimo (adicionado ou não com o açúcar), onde as colônias tiveram crescimento mais lento, diâmetro menor e morfologia diferente (para o mesmo isolado) das crescidas em ágar Müller-Hinton.

Tabela 3. Caracterização morfológicas das colônias de rizobactérias Müller-Hinton, após 24h, a 28°C de incubação.

Linhagem	Forma	Elevação	Margem	Produção de muco
SLIM 03	Circular	Convexa	Inteira	Alta
SLIM 04	Irregular	Monticular	Lobada	Alta
MRBS 12	Rizóide	Elevada	Ondulada	Baixa

No meio ágar nutriente (AN), todas as linhagens cresceram com tempo menor que 20h; Slim 03 apresentou viscosidade e brilho, coloração esverdeada e odor de uva verde nas primeiras 48h, após este tempo a coloração tornou-se amarronzada, características peculiares do gênero *Pseudomonas*; Slim 04 apresentou coloração branca e a Mrbs 12 amarelada.

No experimento envolvendo os 3 isolados crescidos em ágar nutriente e em meio mineral mínimo acrescido de açúcares em diferentes concentrações, diferenças fenotípicas das colônias também foram evidentes para esses dois meios de cultivo. No meio AN os isolados cresceram em um tempo menor (cerca 20h) do que no meio mínimo independentemente da adição de açúcar. Todos os isolados apresentaram crescimento no meio ágar mineral mínimo sem fonte de carbono, mas ele foi mais lento e discreto quando comparado ao meio AN e aos meios mínimos

suplementados com açúcares. O dendograma, apresentado na Figura 1 abaixo, mostra a similaridade entre as rizobactérias estudadas, gerada a partir das características fenotípicas das colônias crescidas nos meio AN, mineral mínimo sem açúcar, mineral mínimo com glicose a 2% e mineral mínimo com galactose 2%.

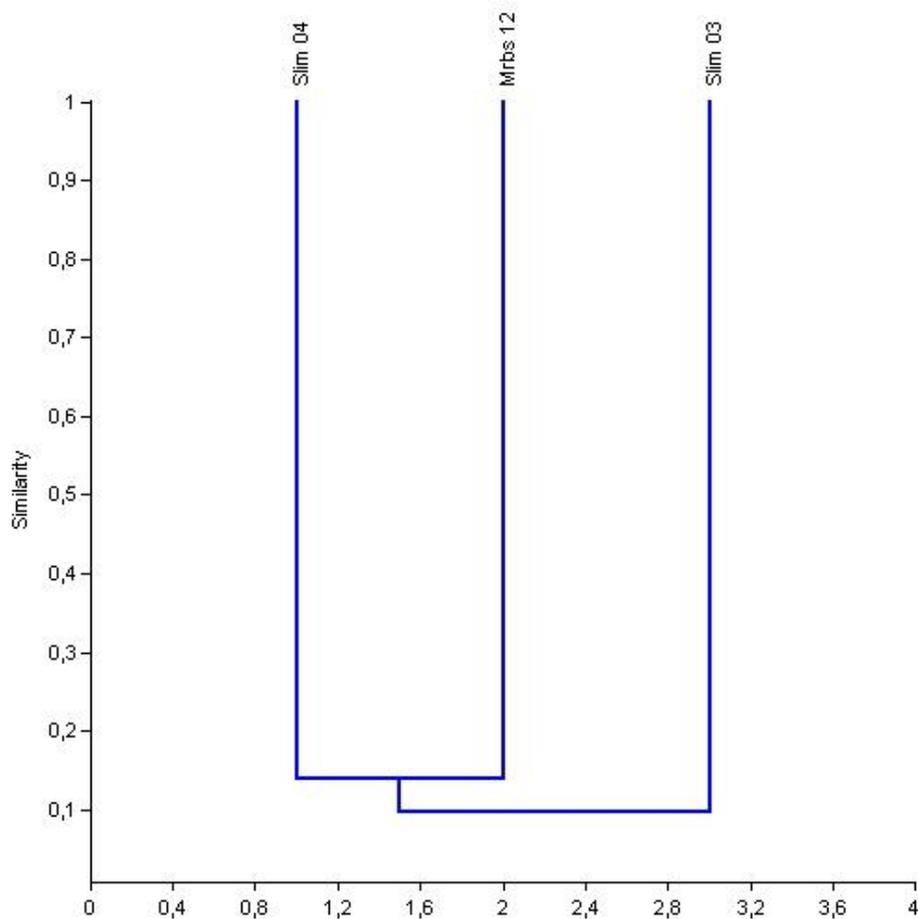


Figura 1: Dendograma baseado nas análises morfotintoriais e nas características fenotípicas das colônias dos isolados Sim 17, Rizo 02, Rizo 11 e Rizo 35 cultivados em diferentes meios de cultura. O dendograma foi obtido pela análise de agrupamento com o algoritmo UPGMA (*Unweighted pair-group method with arithmetical averages*) utilizando o índice de Jaccard como coeficiente de similaridade.

De acordo com a caracterização morfotintorial, observou-se que os 3 isolados do estudo são Gram-negativos e, quanto à forma, todos os isolados são bacilos curtos, e apresentam tamanho médio de 1,0 μm para a Slim 03, de 2,5 μm para a Slim 04 e de de 0,7 μm para a Mrbs.

Cada isolado apresentou características peculiares e diferenças quanto à morfologia das colônias e das células, e isso se refletiu na análise de agrupamento (Fig. 1) em que não houve formação de grupos com similaridade maior do que 15%.

3.2.2. Caracterização micromorfológica do biofilme dos isoaldos

O cultivo dos isolados em meio ágar mineral mínimo com 2 % de açúcar resultou na formação do biofilme (muco), o qual foi observado no MEV. Para detalhamento da topografia do biofilme e do arranjo das rizobactérias crescidas sobre os discos de membranas. A análise da micromorfologia mostrou que as células bacterianas dos isolados Slim 03 e Slim 04 são envolvidas em uma matriz de polissacarídeos com diferentes topografias e arranjos das rizobactérias (Fig. 2). Estes isolados apresentaram tamanho celular menor, quando cultivados em meio mineral mínimo (MMM) sem suplementação de açúcar (Figs. 2A e 2D, respectivamente), do que o daqueles acrescidos de açúcares (Figs. 2B, 2C, 2F, 2G).

A figura 2A apresenta a cultura de Slim 03 em meio mineral mínimo (sem fonte de carbono no meio) onde observa-se a presença de flagelos polares e escassez de uma matriz polimérica. Já na figura 2B a matriz polimérica é abundante e tem aspecto mucóide diferenciado daquele apresentado pelo isolado crescido em galactose a 2% (Fig. 2C).

Para os cultivos do isolado Slim 04 em meio mineral mínimo (MMM) sem açúcar, com 2% de glicose e com 2% de galactose foram observados formação de biofilme em todos eles, entretanto, o aspecto da matriz polimérica é distinto entre eles (Figs. 2D - 2F). No MMM sem açúcar, a matriz formada pelas bactérias tem aparência de uma camada contínua, assemelhando-se a um filme depositado entre as células (Fig. 2D), enquanto que no meio com adição de glicose ela apresenta um aspecto gelatinoso e filamentososo (Fig. 2E), e no meio com adição de galactose apresenta um aspecto de trama ou rede (Fig. 2F).

O isolado Mrbs 12 (Figs. 3A – 3C) não apresentou formação de matrizes poliméricas em nenhum dos meios mínimos cultivados (com ou sem adição de açúcar). Entretanto, as células cultivadas em MMM com 2% de galactose apresentaram maior volume celular do que as cultivadas em MM sem açúcar e MMM com glicose a 2%. Foram feitas micrografias dos discos de membrana tanto para servir de controle negativo, como para observar a estrutura tridimensional dessa

membrana polimérica nos aumentos (magnificações) em que as micrografias das bactérias foram feitas (Figs. 2D e 2E).

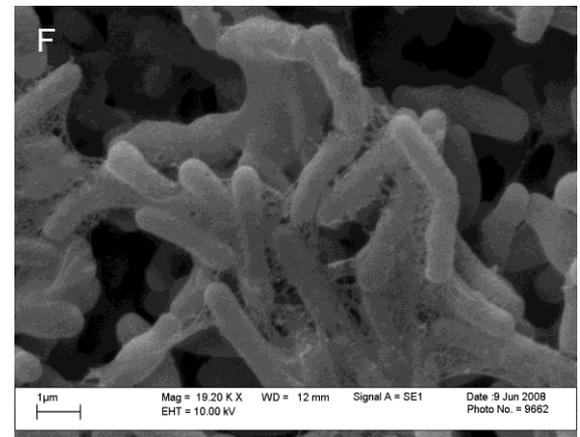
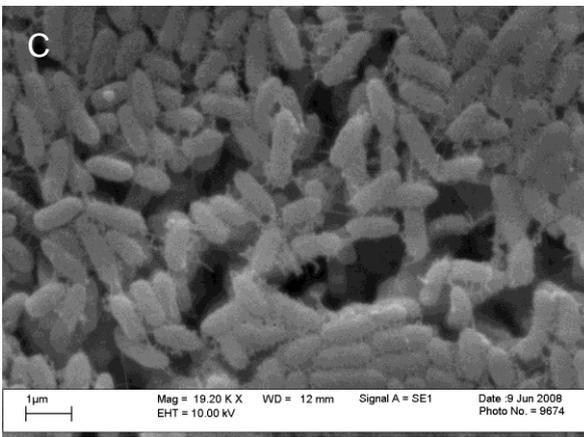
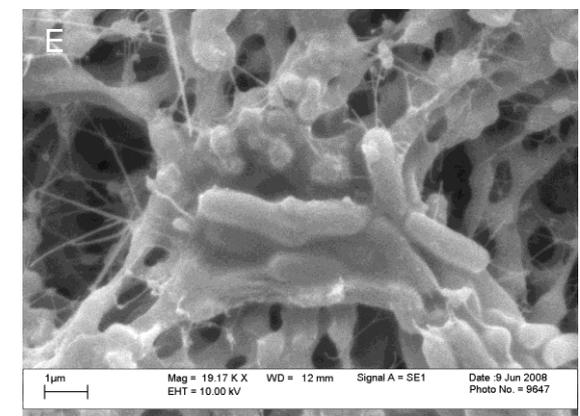
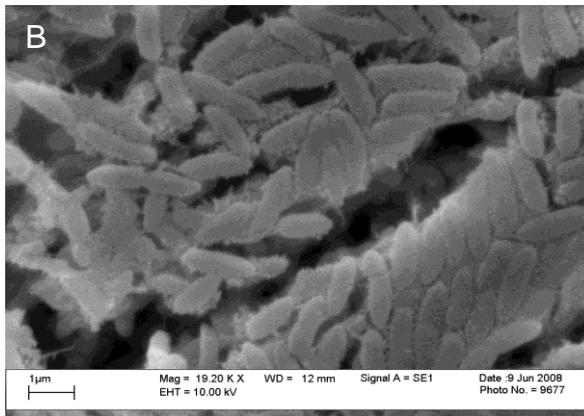
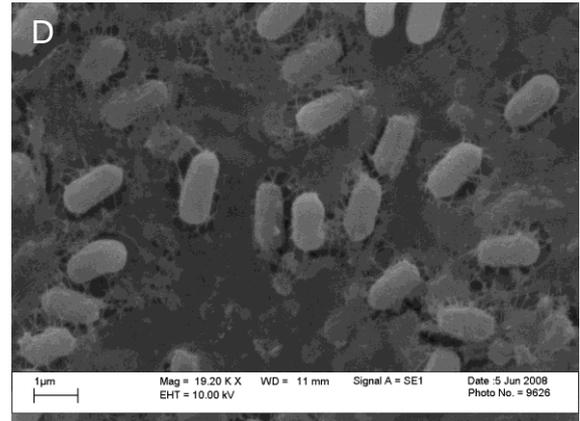
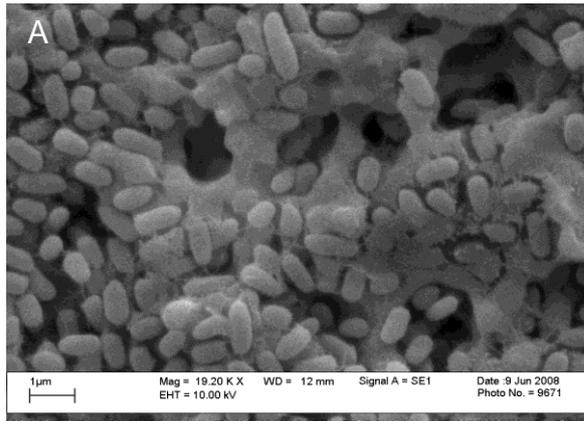


Figura 2. Micrografias eletrônicas de varredura de rizobactérias cultivadas em meio mineral mínimo com diferentes fontes de carbono. (A) Slim 03 cultivada em MMM sem suplementação de açúcar. (B) Slim 03 cultivada em MMM com 2% Glicose. (C) Slim 03 cultivada em MMM com 2% Galactose. (D) Slim 04 cultivada em MMM. (E) Slim 04 cultivada em MMM com 2% Glicose. (F) Slim 04 cultivada em MMM com 2% Galactose.

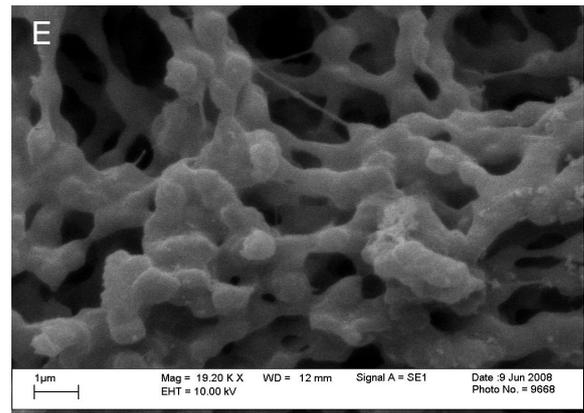
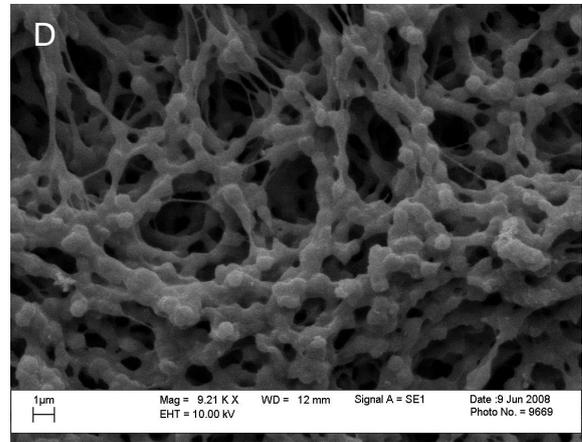
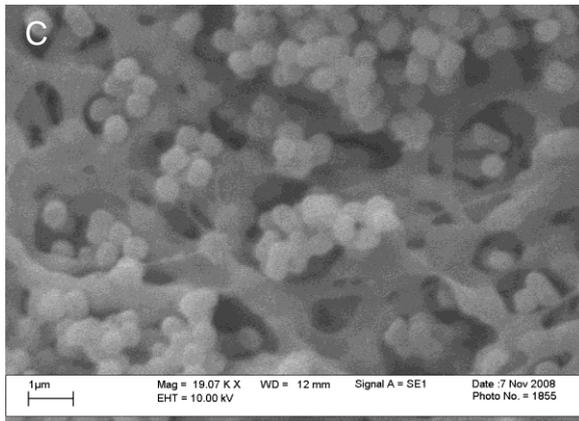
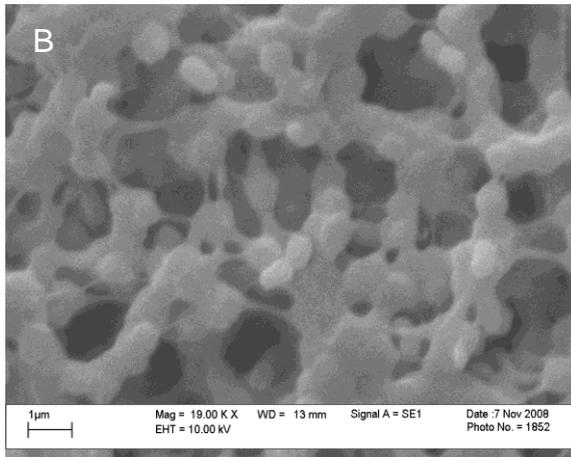
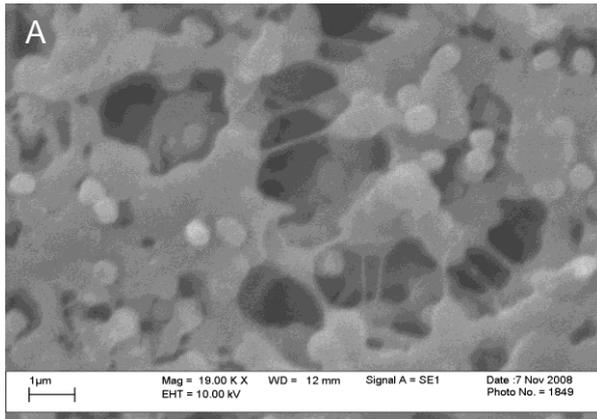


Figura 3. Micrografias de rizobactérias cultivadas em meio mineral mínimo com diferentes fontes de carbono. (A) Mrbs 12 cultivado em MMM, (B) Mrbs 12 cultivado em MMM com 2% de glicose, (C) Mrbs 12 cultivado 2% de galactose, D) Membrana de PVDA, E) Membrana de PVDA em maior aumento.

3.2.3 Avaliação da produção de EPS pelos isolados

Experimento I – Isolados crescidos em diferentes fontes de carbono

As análises da produção de EPS pelas rizobactérias Slim 03, Slim 04 e Mrbs 12, cultivadas em meio mineral mínimo com quatro açúcares distintos (glicose, galactose, maltose e frutose) na mesma concentração (6%), comparados entre si, demonstraram preferências por um tipo de sacarídeo, na sua utilização para o crescimento bacteriano e para as vias da produção dos exopolímeros (Tabela 4). A razão entre produção de EPS e massa bacteriana apresentou valores, em geral, não proporcionais à produção total de EPS (Tabela 4).

Tabela 4. Médias da produção de massa bacteriana, produção de EPS e razão EPS massa bacteriana dos isolados de rizobactérias crescidos em meio mínimo acrescidos de diferentes açúcares (concentração de 6%).

Isolado	Açúcar	Média da massa bacteriana (g.L ⁻¹)*	Média da produção de EPS (g.L ⁻¹)*	Razão EPS / massa bacteriana
Slim 03	Glicose	4,0317	1,7283	0,4287
	Galactose	4,3050	2,1100	0,4901
	Maltose	2,5444	1,4956	0,5878
	Frutose	3,4233	3,2500	0,9494
Slim 04	Glicose	2,1316	4,7466	2,2930
	Galactose	3,5683	2,0100	0,5732
	Maltose	4,0733	1,8833	0,4649
	Frutose	4,1500	4,5083	1,1234
Mrbs 12	Glicose	4,6766	0,9200	0,2011
	Galactose	1,3633	2,5300	1,8699
	Maltose	4,2850	1,3650	0,3190
	Frutose	4,7800	1,2750	0,2669

(*) média de 4 repetições.

Foi constatado que a produção da massa bacteriana não é proporcional à produção do EPS, e esses dois parâmetros avaliados variam de acordo com o tipo de açúcar presente no meio de cultura. O isolado Slim 04 produziu grande quantidade de EPS, quando cultivado em meios com glicose e frutose, entretanto, a massa bacteriana no meio com frutose foi aproximadamente duas vezes maior que a massa bacteriana em glicose. Conseqüentemente, o rendimento (razão EPS por massa bacteriana) foi maior para esse isolado na presença de glicose.

Efeitos significativos estatisticamente dos isolados e da interação (isolados x fonte de carbono) demonstraram que a produção de EPS respondeu aos tratamentos (açúcares) de diferentes maneiras para os isolados (Tabela 4). Slim 04 apresentou a maior produção de EPS para duas das fontes de carbono utilizadas (glicose e frutose) quando comparados aos outros 2 isolados, crescidos com os diferentes monossacarídeos. A produção de EPS foi afetada pelo açúcar presente no meio de cultura de maneira isolado-específica.

A partir da avaliação do comportamento das rizobactérias crescidas nos 4 diferentes açúcares quanto à massa bacteriana, relação EPS por massa bacteriana e, principalmente, produção de EPS foram escolhidas as fontes preferenciais de carbono para cada isolado, que foram testados, no experimento subsequente, com diferentes concentrações do açúcar. Assim, o isolado Slim 03 foi crescido em diferentes concentrações de frutose, Slim 04 de glicose e Mrbs 12 de galactose. Uma cepa padrão de *Pseudomonas fluorescens* foi utilizada com a finalidade de comparar a produção de EPS com a dos isolados.

Experimento II – Isolados crescidos em diferentes concentrações de açúcar

Também nesse experimento foram observados efeitos significativos estatisticamente dos isolados e da interação (isolados x concentração do açúcar), evidenciando que a produção de EPS respondeu ao tratamento (concentração do açúcar) com comportamento diferenciado para os isolados (Fig. 5). Slim 04 foi novamente o isolado que apresentou maior produção de EPS, isso para a concentração de 6% do açúcar (glicose), e que diferiu estatisticamente, ($P = 0,00017$) de todos os outros isolados (incluindo a cepa padrão) em todas as concentrações de açúcar (0, 2, 6, 10 e 14%). A produção de EPS foi afetada pela concentração do açúcar, presente no meio de cultura de maneira isolado-específica, para todos os isolados avaliados.

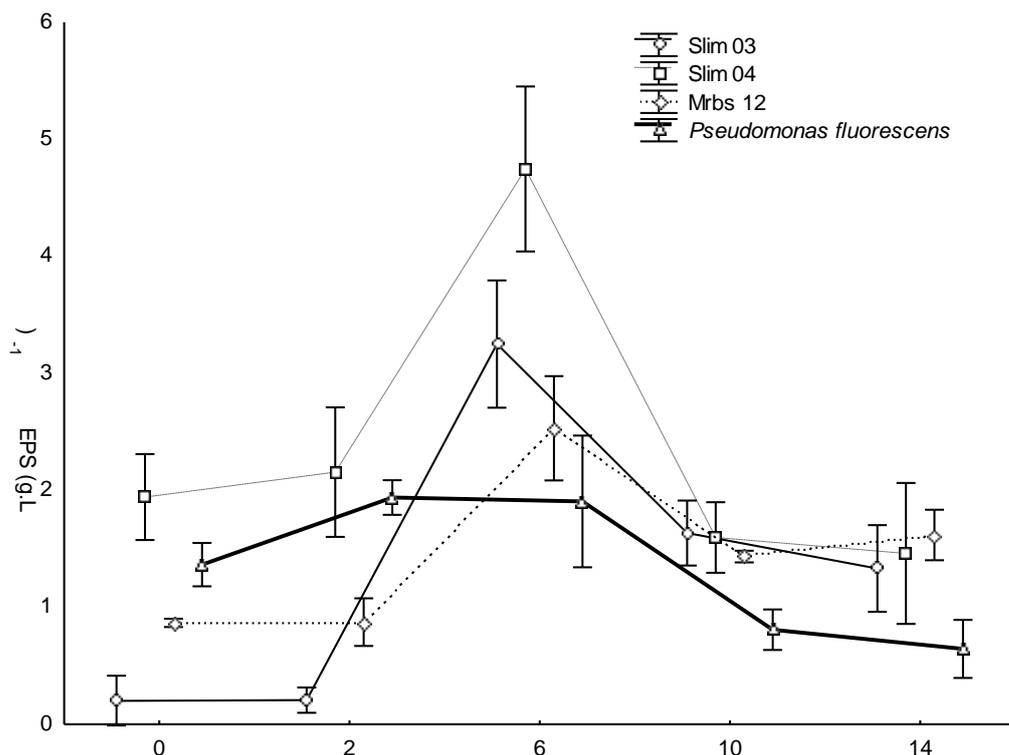


Figura 5. Produção de EPS (g.L^{-1}) dos isolados Slim 03 (meio com frutose), Slim 04 (meio com glicose), Mrbs 12 (meio com galactose) e cepa padrão *Pseudomonas fluorescens* (meio com frutose) cultivados na concentração do açúcar do meio de 0%, 2%, 6%, 10% e 14%. As barras correspondem ao erro padrão.

Os isolados não apresentaram uma tendência linear de aumento da produção de EPS em função da elevação da concentração do açúcar no meio, pois, a partir de 6% da concentração do monossacarídeo, a produção de EPS foi reduzida. Equação quadrática foi obtida (dado não apresentado) e explicou esse comportamento dos isolados bacterianos.

Quando foi avaliada a razão EPS massa bacteriana (Fig. 6), os isolados apresentaram tendências variadas, entretanto, o isolado que apresentou maior valor para essa relação foi o Slim 03, que diferiu estatisticamente ($P = 0,000177$) de todos os outros isolados nas diferentes concentrações do açúcar, exceto para o Mrbs 12 na concentração de 6% do açúcar (galactose) e Slim 04 na concentração 0 (glicose). A ANOVA fatorial demonstrou que houve efeitos significativos da interação (isolados x concentração do açúcar) para o rendimento de EPS por massa bacteriana e que este foi afetado pela concentração do açúcar presente no meio de maneira isolado-específica.

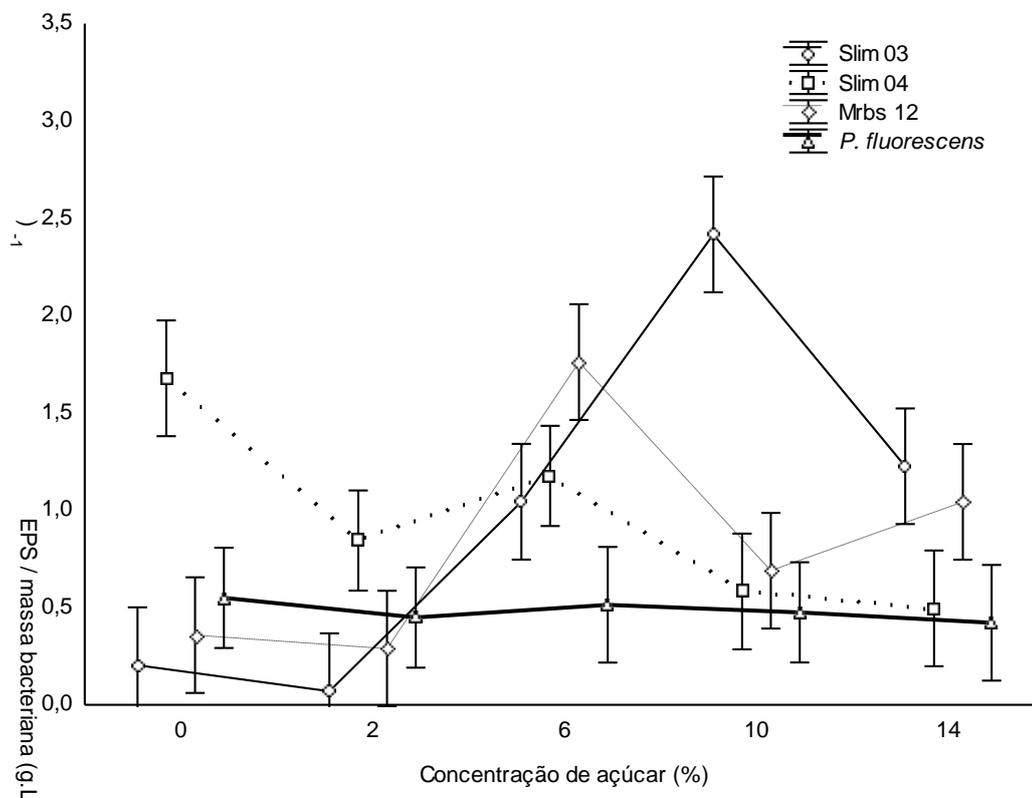


Figura 6. Relação entre produção de EPS e massa bacteriana (g.L^{-1}) dos isolados Slim 03 (crescido em meio com frutose), Slim 04 (crescido em meio com glicose), Mrbs 12 (crescido em meio com galactose) e cepa padrão de *Pseudomonas fluorescens* (crescido em meio com frutose) cultivados em meios com concentração do açúcar variável em 0%, 2%, 6%, 10% e 14%. As barras correspondem ao erro padrão.

3.2.4 Avaliação da Colonização dos isolados em raízes de plantas

A observação da colonização dos isolados bacterianos nas raízes de plantas, realizada através do MEV, evidenciou que os isolados Slim 03 e Slim 04 colonizaram os segmentos de raízes do tomateiro ($n = 20$) amostrados (Fig 7A – 7D), fato que não ocorreu (micrografia não apresentada) com o isolado Mrbs 12 ($n = 10$). A situação se inverteu no experimento com alface, onde os isolados Slim 03 e Slim 04 não colonizaram (micrografias não apresentadas) as raízes de alface ($n = 20$), enquanto que o isolado Mrbs 12 formou biofilme (Figs. 7E e 7F) na superfície das raízes ($n = 10$), nas condições de crescimento axênico das plantas dos experimentos.

Os biofilmes formados pelos isolados Slim 03 e Slim 04 nas raízes de tomateiros apresentaram diferenças micromorfológicas (Figs. 5B e 5D) e as bactérias do isolado Mrbs 12 colonizaram parcamente as raízes da alface (Fig. 5F).

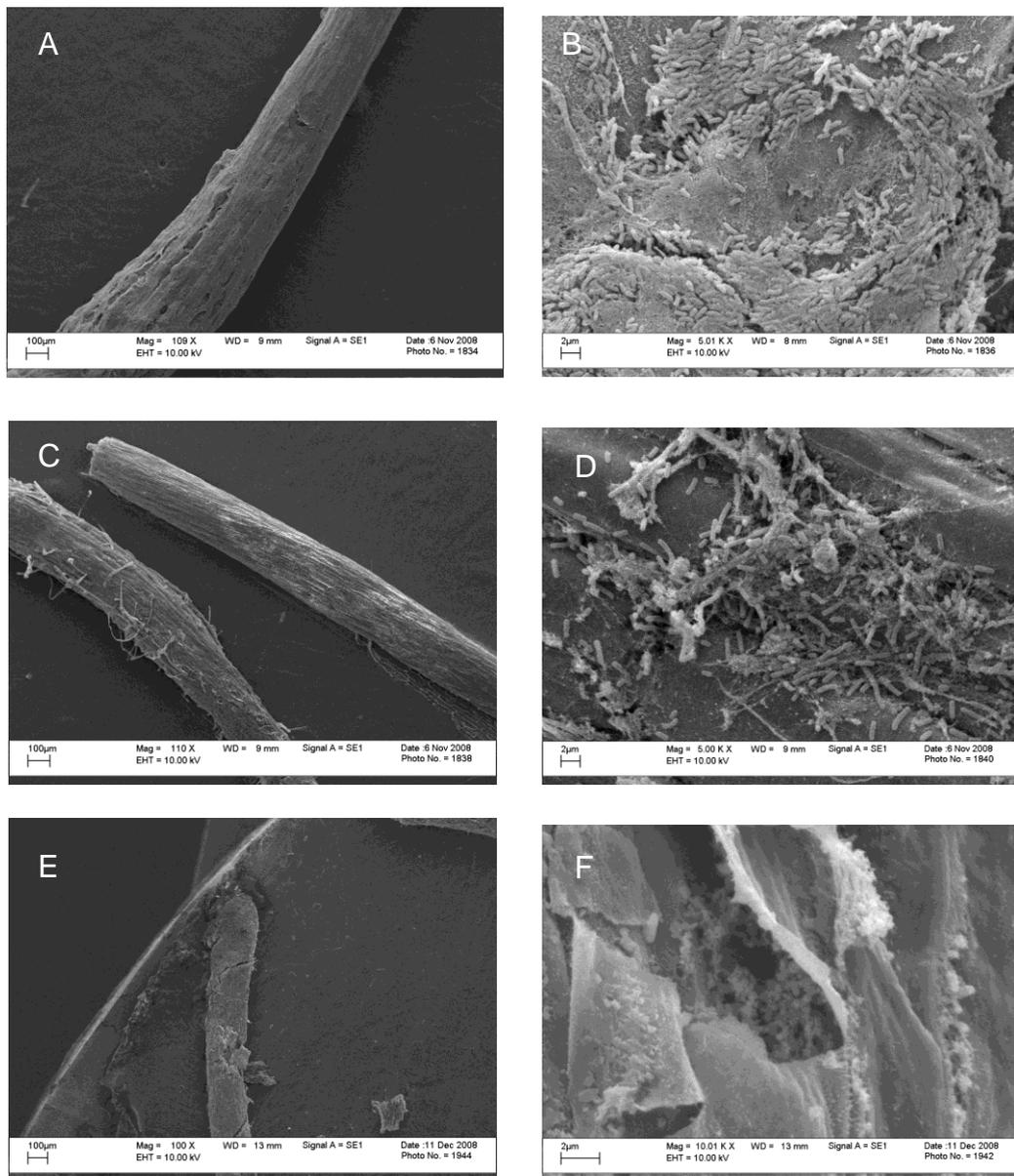


Figura 5. Micrografias eletrônicas das raízes de tomateiro e alface colonizadas por rizobactérias. (A) Vista geral da raiz de tomateiro colonizada com o isolado Slim 03. (B) Detalhe da figura anterior mostrando o biofilme formado pelas bactérias na superfície da raiz. (C) Vista geral da raiz de tomateiro colonizada com o isolado Slim 04. (D) Detalhe da figura anterior mostrando o biofilme formado pelas bactérias na superfície da raiz. (E) Vista geral da raiz de alface colonizada com o isolado Mrbs 12, (F) Detalhe da figura anterior mostrando o biofilme formado pelas bactérias na superfície da raiz.

Apesar da formação do biofilme na superfície da raiz de tomateiro por parte dos isolados Slim 03 e Slim 04, todos os parâmetros de crescimento da planta analisados (altura, diâmetro do coleto, massa fresca da parte aérea e da raiz, volume da raiz, massa seca da parte aérea e da raiz e biomassa total) não diferiram estatisticamente (dados não apresentados) entre os tratamentos (isolados inoculados) e o controle (plantas não inoculadas), nas condições de crescimento axênicas desse experimento. Além disso, de todos os parâmetros de crescimento da alface analisados (área foliar, diâmetro do coleto, massa fresca da parte aérea e da raiz, volume da raiz, massa seca da parte aérea e da raiz e biomassa total) apenas a área foliar total (Fig. 8) apresentou diferença estatística entre o isolado Slim 04 e as plantas controle ($P= 0,026855$).

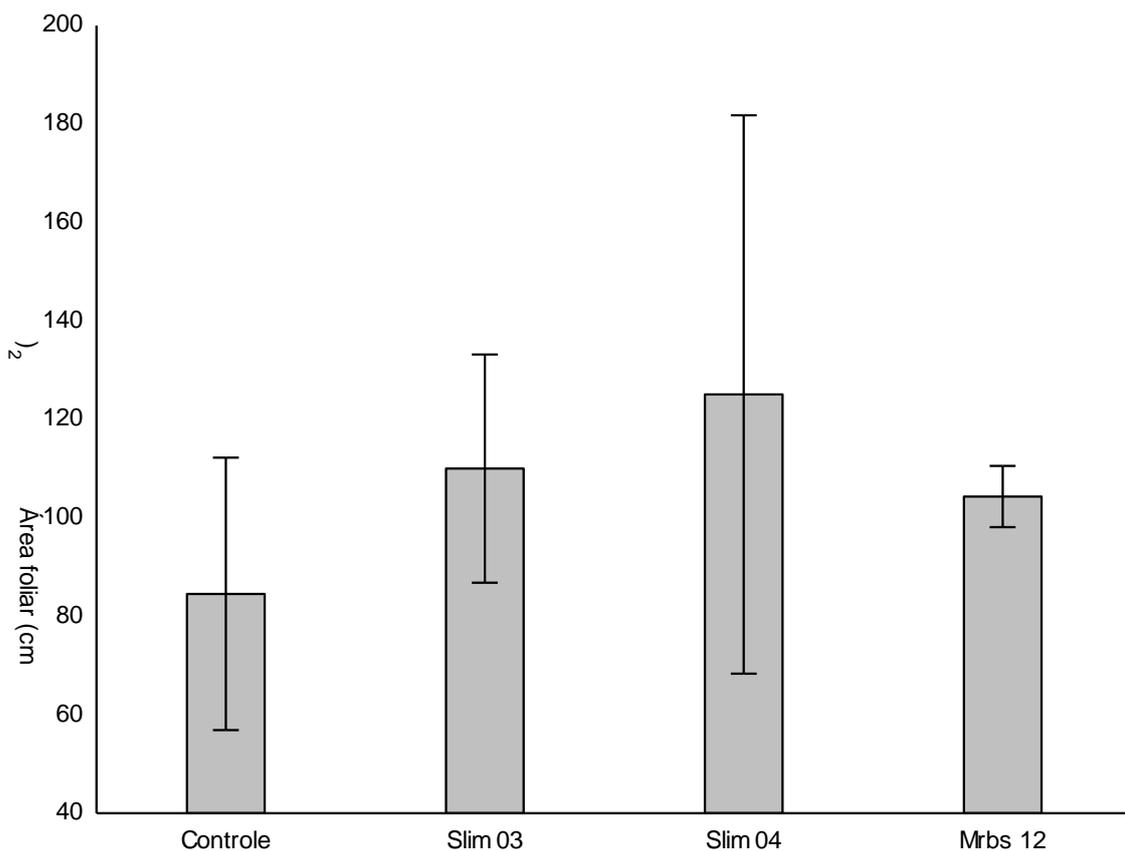


Figura 8. Média ($n = 5$) da área foliar total de plantas de alface controle e inoculadas com os isolados Slim 03, Slim 04 e Mrbs 12. As barras correspondem ao erro padrão.

4. DISCUSSÃO

A caracterização morfológica das colônias e tintorial (coloração de Gram) dos isolados bacterianos da rizosfera de plantas do Semi-Árido baiano, Slim 03, Slim 04 e Mrbs 12, mostraram a diferenciação existente entre esses isolados. Isso permite a separação dos isolados, utilizando algumas características das colônias em placa (coloração, produção e aspecto do muco) e da morfologia da célula (tamanho e presença de cápsula). A análise molecular do gene 16S rRNA apontou a maior similaridade com o gênero *Pseudomonas* para 2 desses isolados (Slim 03 e Slim 04), que foram provenientes da rizosfera da mesma espécie de planta (*Actinocephalus* sp.).

Quando foi comparado o crescimento dos isolados bacterianos e produção de EPS dos isolados do Semi-Árido baiano em diferentes meios de cultivo, ricos (Müller-Hinton e AN) e pobre (MM) em nutrientes e carboidratos, este último meio apresentou colônias com crescimento mais lento e sem produção de muco (EPS). Segundo Madigan et al. (2004), essa não produção de muco pode ser justificada pela ausência de carboidratos. Isso é corroborado por Romeiro et al (2001) quando mostrou que o cultivo de bactérias em um meio pobre em carboidratos diminui a produção de muco.

Os 3 isolados de bactérias do Semi-Árido baiano, entretanto, apresentaram crescimento no meio ágar mineral mínimo sem fonte de carbono. Isso pode ser explicado pela modificação do metabolismo celular em função da ausência de carboidrato, através dos seguintes mecanismos: 1. Quimioautotrofia, utilizando o CO₂ como fonte de carbono e compostos inorgânicos presentes no meio MM (Fe, H, N, S) como fonte de energia, para sintetizar, através do ciclo de Calvin, os carboidratos, o que poderia ainda justificar o crescimento lento das colônias (MADIGAN et al., 2004). 2. Bactérias armazenam compostos energéticos, por exemplo, como grânulos de poli-β-hidroxibutirato (PHB) e grânulos de glicogênio, utilizados funcionalmente como reservas de carbono. As bactérias consomem o que estava estocado nas unidades formadoras de colônias iniciais (do inóculo), podendo então, utilizar a energia para subseqüentes divisões celulares (PELCZAR JR., 1997). Às custas das células mortas que não puderam se adaptar, pode existir um

compartilhamento de resíduos depositados no meio ou de moléculas orgânicas descartadas como resíduo metabólico da colônia.

Sutherland (1977) demonstrou que maior quantidade de carboidrato no meio de cultura aumenta a produção de substâncias poliméricas extracelulares bacterianas. Essa afirmação, entretanto, deve ser observada cuidadosamente, considerando-se a fonte de carboidrato e a concentração deste no meio de cultura. Castellane e Lemos (2007) pesquisaram a constituição química de exopolissacarídeos de rizóbios crescidos em diferentes fontes de carbono e concluíram que ocorrem variações nas proporções dos monômeros de monossacarídeos que compõe as unidades repetitivas do EPS. Isso pode talvez implicar na a maior produção de EPS em determinado açúcar por parte dos isolados bacterianos do Semi-Árido baiano.

Celik et al. (2008), em trabalho de quantificação de EPS produzidos por linhagens de *Pseudomonas* em meio de cultivo com diferentes fontes de carbono e diferentes concentrações, concluíram que as concentrações de 2 e 3% de açúcar obtiveram melhores rendimentos e que as altas concentrações (5 e 6%) de açúcar inibiam produção de EPS. O experimento com as rizobactérias do Semi-Árido baiano submetidas a doses crescentes de açúcar demonstrou que houve uma concentração mais adequada (6%), que resultou na maior produção de EPS para a Slim 03 e 04. O rendimento na produção de EPS para estes isolados do Semi-Árido foi aproximadamente dez vezes superior do que o encontrado no trabalho de Celik et al. (2008) que utilizou *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas putida* crescidas em xilose a 2%.

Os experimentos com os isolados de bactérias do Semi-Árido baiano demonstraram que a produção da massa bacteriana não é proporcional à produção de EPS e varia com o tipo do isolado, com o tipo e concentração do açúcar presente no meio de cultivo do respectivo isolado.

A utilização do MEV se mostrou viável tanto para monitorar a colonização das raízes, como sugere Chin-A-Woeng et al. (1997) de se tratar uma ferramenta útil para tal propósito, como para observação da formação de EPS. Os isolados de bactérias gram-negativas do semi-Árido baiano apresentaram uma rede polimérica entre as células, que foi denominada de biofilme, e que aparentemente

desempenhou a função de agregação celular e adesão á superfície. A variação dos espaços colonizados na raiz pode ser devido a flutuações na composição do exudatos e disponibilidade de nutriente na secreção ou específica de antimicrobianos da ponta de raiz. Watt et al. (2006) examinaram associação de *Pseudomonas* em raiz de trigo e concluíram que a colonização foi heterogênea, com presença de bactérias em aproximadamente 40% da raiz, apresentando agrupamentos na região dos pelos radiculares e coifa, indicando nichos específicos de colonização.

Apesar da colonização das raízes de tomateiro por parte dos isolados Slim 03 e Slim 04 e das raízes de alface por Mrbs 12 a ausência de efeitos significativos sobre o crescimento destas plantas foi evidenciada. Na literatura são frequentemente relatada a ausência de efeitos de rizobactérias em condições experimentais. Freitas et al. (2003), também observaram instabilidade nos efeitos dos isolados *Pseudomonas* sp. sobre plantas de alface. Digat et al. (1990) inocularam diferentes variedades de alface e tomate com um isolado de *Pseudomonas fluorescens* e observaram que, ainda que as condições ambientais fossem semelhantes, as respostas quanto à promoção do crescimento nestas duas plantas divergiram. De acordo com Raaijmakers & Weller (2001) uma das grandes dificuldades em se utilizar rizobactérias como uma alternativa viável de biocontrole de patógenos é que a maioria dessas bactérias é muito variável quanto à sua performance.

Gasoni e colaboradores (2001) observaram aumento significativo na matéria seca de alface, em condições de campo, quando as sementes foram inoculadas com *Pseudomonas fluorescens* e *Bacillus pumilus*. No experimento com alface inoculada com os isolados Gram-negativos do Semi-Árido baiano, houve apenas um discreto aumento da área foliar das plantas inoculadas com o isolado Slim 04.

Os resultados dos experimentos de inoculação dos isolados bacterianos provenientes do Semi-Árido em plantas de alface e tomateiro permitem avaliar que, nas condições experimentais utilizadas, esses isolados não são fitopatógenos, bem como, não são promotores de crescimento de planta.

5. REFERÊNCIAS

- ALSANIUS, B. W.; HULTBERG, M.; ENGLUND, J. E. Effect of lacZY-marking of the 2,4-diacetyl-phloroglucinol producing *Pseudomonas fluorescens*-strain 5-2/4 on its physiological performance and root colonization ability. *Microbiol. Res.*, v.157, p.39–45, 2002.
- BAIS, H.P. et al. How plants communicate using the underground information superhighway. *Trends in Plant Science*. v.9, n.1, p.26-32, 2004
- BIANCIOTTO V, et al. Mucoid mutants of the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0 show increased ability in biofilm formation on mycorrhizal and nonmycorrhizal carrot roots. *Mol. Plant-Microbe Interact*. v.14, p.255–60, 2001.
- BRASIL, Nova delimitação do Semi-Árido brasileiro, Secretaria de Políticas de Desenvolvimento regional, Ministério da Integração Nacional, Governo Federal, 35 p. 2006.
- BRISOU, J.F.. Biofilms, Methods for Enzymatic Release of Microorganisms. CRC Press, Boca Raton, FL. 1995.
- CASTELLANE, T.C.L.; LEMOS, E.G.M. Composição de exopolissacarídeos produzidos por estirpes de rizóbios cultivados em diferentes fontes de carbono, *Pesq. agropec. bras.* Brasília.v.42, n.10, 2007.
- CELIK G. Y.; ASLIM, B.; BEYATLI, Y., Characterization and production of the exopolysaccharide (EPS) from *Pseudomonas aeruginosa* G1 and *Pseudomonas putida* G12 strains. *Carbohydrate Polymers*, v.73, n.1, 4, p.178-182, 2008.
- CERNING J.; RENARD, C. M. G. C.; THIBAUT, J. F.; BOUILLANNE, C.; LANDON, M.; DESMAZEAUD, M. J.; TOPISIROVIC, L. Carbon source requirements for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11 and partial structure analysis of the polymer. *Appl. Environ. Microbiol.* v.60, p.3914–3919, 1994.
- CHIN-A-WOENG, T. F. C., DE PRIESTER, W., VAN DER BRIJ, A., LUGTENBERG, B. J. J.. Description of the colonization of a gnotobiotic tomato rhizosphere by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain WCS365, using scanning electron microscopy. *Molecular Plant-Microb Interact*ion, v.10, p.79-86, 1997.
- DANHORN, T.; FUQUA,C. Biofilm Formation by Plant-Associated Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* v. 61, p.401–422, 2007.
- DIGAT, B.; GAUDILLAT, M.; LABADIE, J.M. Susceptibility of various tomato and lettuce genotypes of plat-growth-promoting *Pseudomonas*. *Symbiosis*, v. 9, p. 295-303, 1990.
- DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* v.15, p.167–193, 2002.

DOS SANTOS, S. C. Prospecção de linhagens bacterianas produtoras de biossurfactantes com potencial biotecnológico no Semi-árido baiano. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Universidade Estadual de Feira de Santana, 2008.

FREITAS, S.S.; DE MELO, A.M.T.; DONZELI, V.P. Promoção de crescimento de alface por rizobactérias. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, v. 27, n. 1, p. 61-70, 2003.

GASONI, L. et al. Response of lettuce and potato to bacterial fungal inoculants under field conditions in Cordoba (Argentina). *J. Plant Diseases Protec.* v.108, p.530-535, 2001.

GIULIETTI AM., MENEZES, N.L., PIRANI, I.R, MEGURO, M. & WANDERLEY, M.G.L. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: caracterização e lista de espécies. *Boletim de Botânica*, Universidade de São Paulo, 9: 1-151. 1987.

GIULIETTI AM., PIRANI, I.R & HARLEY, RM. Espinhaço range Region, Eastern Brazil. In Davis, S. D., Heywood, V. H Herrera-MacBride, O., Villa-Lobos, J. & Hamiltos, A C. (eds.). *Centers of plant diversity. A guide and strategy for their conservation*. Vol. 3. The Americas. IUCN Publication Unity, Cambridge. 1997.

GIULIETTI, A. M. ; HARLEY, R. M. ; QUEIROZ, L. P.; RAPINI, A. . To set the scene. In: Luciano Paganucci de Queiroz, Alessandro Rapini, Ana Maria Giulietti. (Org.). *Towards Greater Knowledge of the Brazilian Semi-arid*. Brasília: Ministério de Ciência e Tecnologia. v. I, p. 15-19, 2006.

HABE, M.H. & UESUGI, C.H. Método *in vitro* para avaliar a capacidade colonizadora de bactérias em raízes de tomateiro. *Fitopatol. Bras.*, v.25; p.657-660, 2000.

JOLY, A.B. 1970. *Conheça a vegetação brasileira*. Edusp, Polígono, São Paulo.

KLERKS, M. M.; VAN GENT-PELZER, M.; FRANZ, E.; ZIJLSTRA, C.; VAN BRUGGEN, A. H. C.. Physiological and Molecular Responses of *Lactuca sativa* to Colonization by *Salmonella enterica* Serovar Dublin *Applied and environmental microbiology*. v.73, p.4905–4914, n.15, 2007.

KONEMAN, E. W. et al. *Diagnóstico Microbiológico. Texto e atlas colorido*. Trad. de Arlete Emily Aury. 5ª ed. São Paulo: MEDSI, 2001.

LANE, D.J. 16S/23S rRNA sequencing. In: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* (Stackbrandt E and Goodfellow M, eds.). Wiley, Chichester, p.115-176. 1991.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. *Microbiologia de Brock*, In *Diversidade* Ed. Prentice Hall. 10ªed. São Paulo, 608p. 2004.

MAYAK, S.; TIROSH, T.; GLICK, B.R. Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*. v.42, p.565–572. 2004.

PARSEK, M. R.; TOLKER-NIELSEN, T., Pattern formation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Current Opinion in Microbiology*, v.11, p.560–566, 2008.

PELCZAR JR, J.M.; CHAN, N.R.K.; KRIEG, N.R. Microbiologia conceitos e aplicações. Ed. Makron Books, São Paulo, 2ª Ed., vol I, 524p. 1997.

PRIESTER, J. H.; HORST, A. M.; VAN DE WERFHORST, L. C.; SALETA, J. L.; MERTES, L. A. K.; HOLDEN, P. A. Enhanced visualization of microbial biofilms by staining and environmental scanning electron microscopy, *Journal of Microbiological Methods*. v.68, p.577–587, 2007.

PULCINI, E.De.L. Bacterial biofilms: a review of current research. *Nephrologie*. v.22, p.439– 441, 2001.

RAAIJAMAKERS, J.M.; WELLER, D.M. Exploiting genotypic diversity of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas* spp: characterization of superior root-colonizing *P. fluorescens* strain Q8rl- 96. *Applied and Environmental Microbiology*. 67:2545-2554. 2001.

ROMEIRO, R. S.; SOUZA, R. M. & LIEBEREI, R. Sensibilidade a cianeto e capacidade de metabolização do composto por isolamentos de *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. *Fitopatologia Brasileira*, v.16, n.2, p.24, 1991.

RUDRAPPA, T.; BIEDRZYCKI, M.L.; BAIS, H.P. Causes and consequences of plant-associated biofilms, *FEMS Microbiol Ecol*. v. 64, p.153–166, 2008.

SAMBROOK, J.; MANIATIS, T.; FRISCH, E.F. Molecular cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbour Lab. Press, 2001.

SANTOS, S. N. Determinação da avaliação da atividade antifúngica de biomoléculas obtidas (do metabolismo secundário) de rizobactérias em linhagens de *Candida albicans*. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, 2008.

SOMASEGARAN, P., HOBEN, H. J. Handbook for Rhizobia: methods in Legume-Rhizobium Technology. Springer-Verlag New York, Inc., 1994.

SOTTERO, A.N.; FREITAS, S.S.; MARCHI, A.; MELO, T.; TRANI, P.E. Rizobactérias e alface: colonização rizosférica, promoção de crescimento e controle biológico, *R. Bras. Ci. Solo*, v.30, p.225-234, 2006

SUTHERLAND, I.W. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*. v.147, p.3–9, 2001.

SUTHERLAND, I. W.. Biotechnology of microbial exopolysaccharides. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom. 1990.

TORRES, D.S.C.; CORDEIRO, I.; GIULIETTI, A.M. O gênero *phyllanthus* L. (Euphorbiaceae) na Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. *Acta Bot. Bras.*, v.17, n.2, p.265-278, 2003.

TURNBULL, G.A.; MORGAN, J.A.W.,WHIPPS, J.M.; SAUNDERS, J.R. The role of bacterial motility in the survival and spread of *Pseudomonas fluorescens* in soil and in the attachment in bacterial-plant interactions. *FEMS Microbiol. Ecol.* v.35, p.57–65, 2001.

UDE, S.; ARNOLD, D.L.; Moon, C.D.; TIMMS-WILSON, T.; SPIERS, A.J. Biofilm formation and cellulose expression among diverse environmental *Pseudomonas* isolates. *Environ. Microbiol.* v.8, p.1997–2011, 2006.

WATT, M.; HUGENHOLTZ, P.; WHITE, R.; VINALL, K. Numbers and locations of native bacteria on field-grown wheat roots quantified by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Environ. Microbiol.* V.8, p.871–84, 2006.

WELLER, D.M. Biological control of soil borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopatology.* v.26, p.379- 407, 1998.

WEISBURG, W.G. et al. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *Journal of Bacteriology*, v. 173, n. 2, p.697-703, 1991.

WIMPENNY, J.; MANZ, W.; SZEWZYK, U. Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiol. Rev.* v.24, p.661– 671, 2000.

CAPÍTULO 2

Produção e micromorfologia de exopolissacarídeos de rizobactérias Gram-positivas do Semi-Árido baiano

RESUMO

As bactérias estão presentes na rizosfera de plantas colonizando as raízes e formando biofilmes na sua superfície. O gênero *Bacillus* é frequentemente isolado da rizosfera de plantas e produz uma matriz exopolissacarídica (EPS) que agrega e protege as células bacterianas além de permitir sua adesão à superfície da raiz. A produção de EPS por parte dessas bactérias é influenciada pela composição e concentração de sacarídeos no meio. Nesse trabalho, foi avaliada a produção de biofilme por rizobactérias Gram-positivas isoladas em Campo Rupestre do Semi-Árido baiano crescidas em diferentes tipos e concentrações de açúcares, sendo observada a micromorfologia do biofilme em meio cultura e na raiz de tomate e alface, relatando a influencia dos isolados no crescimento das plantas. O biofilme produzido pelos isolados apresentou diferentes micromorfologias quando cultivado em presença de diferentes concentrações e tipos de açúcares. O isolado Rizo 02 crescido em meio mínimo mineral com adição de 6% de glicose apresentou maior produção de EPS do que todos os outros isolados em outras concentrações de monossacarídeos. Os isolados não promoveram o crescimento das plantas de tomateiro e alface nas condições axênicas dos experimentos, e também não apresentaram sinais de patogenicidade nas plantas que se desenvolveram semelhantemente às plantas controle.

Palavras-chave: Biofilme, *Bacillus*, metabolismo microbiano.

INTRODUÇÃO

As bactérias estão presentes na rizosfera de plantas, colonizando as raízes e utilizando os exudatos radiculares e substâncias provenientes da lise celular como nutrientes para o seu crescimento (BURR e CAESAR, 1985). As bactérias que interagem com plantas colonizando suas raízes são chamadas de rizobactérias (WELLER E THOMASHOW, 1994); estas estabelecem interações comensais, mutualísticas e/ou parasíticas com o vegetal (LAMBET et al., 1987, NEHL et al., 1997; KLOEPPER, 1986).

Algumas rizobactérias são potentes agentes de controle de doenças que atacam o sistema radicular, outras são promotoras de crescimento de plantas e outras ainda são fitopatogênicas (TIAN et al, 2007). Schroth & Hancock (1981) adotaram o termo Rizobactérias Promotoras de Crescimento em Plantas (RPCP) para descrever bactérias benéficas, que estão adaptadas ao ambiente radicular. As RPCP habitam o solo e, com freqüência, são isoladas da rizosfera de diversas plantas cultivadas, como por exemplo, do tomate e alface (WELLER & THOMASHOW, 1994, FREITAS et al., 2003, MAYAK et al 2004). Os gêneros mais comuns de RPCP realtados são *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Alcaligenes*, *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Arthrobacter*, *Enterobacter*, *Azotobacter*. (SALEEM, 2007; RUDRAPPA et al, 2008)

O gênero *Bacillus* é formado por bactérias Gram-positivas, formadoras de esporos, móveis, e a maioria das espécies tem seu habitat no solo e são formadoras de biofilme (BRANDA et al., 2001). As bactérias desse gênero, principalmente a espécie *Bacillus subtilis*, são relevantes para a biotecnologia, para a agricultura e até para a indústria, por suas importantes propriedades de formação de biofilme e de exopolissacarídeos (EPS) (KEARNS et al., 2005; MORIKAWA, 2006). São utilizadas no controle de patógenos e promoção de crescimento em plantas, e produzem substâncias de interesse biotecnológico e industrial, como biopolímeros e biosurfactantes (KEARNS et al., 2005; MORIKAWA, 2006)

Biofilme pode ser conceituado como a associação entre as bactérias em uma estruturação tridimensionalmente complexa envolta em uma matriz extracelular polissacarídica, o EPS. Na sua constituição, além dos carboidratos que são maioria,

o EPS pode apresentar proteínas e ácidos nucléicos (HALL- STOODLEY et al., 2004).

O EPS é composto quimicamente de homo ou heteropolímeros formados por ligações entre monossacarídeos e outros componentes protéicos, que conferem ao EPS diferentes propriedades químicas e físicas (CELIK et al., 2008). A produção de EPS frequentemente é favorecida por temperaturas mais baixas que aquelas ótimas para o crescimento bacteriano, pela alta relação carbono:nitrogênio e pela privação de nutrientes (FETT, 1993).

As características qualitativas e quantitativas do EPS podem sofrer influência de vários fatores, como a composição (tipos e concentrações de fontes de carbono) e o pH do meio, e as condições de incubação (temperatura, tempo, aeração). As fontes de carbono preferenciais para a produção de EPS são: a glicose, a xilose, a lactose, a galactose e a sacarose (TALLON, 2003; CELIK et al., 2008). Existe um interesse considerável em descobrir novos EPS, apropriados para aplicações diversas, tanto industriais quanto biotecnológicas. Alguns EPS microbianos são industrialmente importantes, como por exemplo, dextranas, xantanas, gelana, pululana e alginatos (DE VUYST e DEGEEST, 1999).

Para caracterizar e avaliar a estrutura tridimensional do biofilme, formado tanto em condições *in vitro* como associadas a raízes de plantas, pode ser utilizada a microscopia eletrônica de varredura (PRIESTER et al., 2007). Esta ferramenta é utilizada para constatar a colonização das raízes por rizobactérias, pois a formação do biofilme na superfície radicular é uma condição fundamental para que o microrganismo possa interagir com a planta e desempenhar sua função (Chin-A-CHIN-A-WOENG et al., 1997; GÖTZ et al., 2006)

A região Semi-Árida brasileira abrange oito estados do nordeste e se estende entre os paralelos 3-17°S e 35-45°W abrangendo uma área de 969.589,4 Km² (BRASIL, 2006). Nessa extensa região de terras áridas em áreas acima de 800-900 m do complexo orográfico da Cadeia do Espinhaço da Serra Geral, no estado da Bahia, ocorre uma formação vegetal característica denominada de Campo Rupestre (GIULIETTI et al. 1997). O Campo Rupestre pode ser considerado como uma vegetação do tipo savânica, com predominância de um estrato herbáceo-subarbustivo extenso sobre solos arenosos rasos, com fisionomias variando desde

campos limpos, praticamente sem árvores e arbustos, até a formação arbustivo-arbórea densa (GIULIETTI, et al. 2006). Um tapete herbáceo de monocotiledôneas, composto principalmente de espécies de Xyridaceae, Eriocaulaceae, Velloziaceae, Graminae e Cyperaceae, entremeado por arbustos e substratos de dicotiledôneas, especialmente de Malpighiaceae, Melastomataceae, Compositae e Rubiaceae (JOLY 1970, GIULIETTI *et al.* 1987) são seus típicos componentes florísticos.

Nesse trabalho, foi avaliada a produção de biofilme por rizobactérias Gram-positivas isoladas em Campo Rupestre do Semi-Árido baiano crescidas em diferentes açúcares (e concentrações destes) e observada a micromorfologia do biofilme em meio cultura e na raiz de tomate e alface, relatando a influencia dos isolados no crescimento das plantas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. IDENTIFICAÇÃO E MANUTENÇÃO DAS BACTÉRIAS

As linhagens utilizadas neste trabalho foram isoladas do solo rizosférico de *Syngonanthus mucugensis* Giulietti (Euriocaulaceae) e *Actinocephalus sp.* (Eriocaulaceae), plantas do ecossistema de Campo Rupestre na Chapada Diamantina (BA). As coletas dos solos rizosféricos foram realizadas no Parque Municipal de Mucugê, município de Mucugê, BA (13°00'06" S, 41°20'33,7" O, 953 m de altitude). O solo dessa região é raso do tipo arenoso (arenito ou quartzito), predominantemente ácido, de baixa fertilidade natural (Tabela apresentada no capítulo 1), sobre manto rochoso em relevo muito acidentado. O clima é mesotérmico, tipo *CWb* (KÖPPEN 1948), caracterizado por invernos secos e verões brandos e chuvosos (TORRES; CORDEIRO; GIULIETTI, 2003).

Os isolados de rizobactérias utilizadas nesse trabalho fazem parte da biblioteca do Laboratório de microbiologia Ambiental e Aplicada à Saúde Pública (LAMASP) da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), com os seguintes registros: Slim 17, Rizo 02, Rizo 11 e Rizo 35 (DOS SANTOS, 2008; OLIVEIRA, 2008). A linhagem Slim 17 foi obtida a partir do solo rizosférico de *Actinocephalus sp* (DOS SANTOS, 2008) e Rizo 02, Rizo 11 e Rizo 35 isoladas do solo rizosférico de *Syngonanthus mucugensis* (OLIVEIRA, 2008).

Para a identificação molecular dos quatro isolados foram realizadas extrações do DNA genômico de colônias crescidas caldo TY (SOMASEGARAN & HOBEN, 1994) e sequenciamento do gene da subunidade menor do DNA ribossômico 16S. Para isso o DNA genômico foi extraído utilizando dois protocolos:

a) As células das colônias do isolado Slim 17 seguiu o protocolo descrito no capítulo 1.

b) O segundo protocolo diferiu do primeiro em duas etapas: I) no crescimento da colônia dos isolados Rizo 02, Rizo 11 e Rizo 35, no qual o meio de crescimento foi o caldo nutriente e, II) na extração, para a qual utilizou-se do tampão de extração (tris HCl pH 7,5 200mM, EDTA 250 mM, NaCl 250mM, SDS 0,5%), homogeneizou e repousou em temperatura ambiente por 15 min).

A reação em cadeia da DNA polimerase (PCR) foi executada amplificando a região de aproximadamente 1500 pb do 16S rRNA em termociclador (GeneAmp,

PCR System 9700), utilizando para Rizo 02, Rizo 11 e Rizo 35 os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) fD1 5' – AGAGTTTGATCCTGGCTCAG – 3' e rD2 5' – AGAGTTTGATCATGGCTCAG – 3' (WEISBURG et al., 1991), e para a Slim 17 os *primers* F27 5'-AGAGTTTGATCMGGCTCAG-3' e R1525 5'-AAGGAGGTGWTCARCC-3' (Lane, 1991). Cada 50 µL da mistura para PCR continha 5 ng rDNA, 1X tampão de PCR, 200 µM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfatado, 0,2 µM de cada *primer*, 3,7 mM MgCl₂, e 2,85 U Taq DNA polimerase (Taq DNA Polymerase, PROMEGA). Os parâmetros das reações de amplificação com os *primers* rD1 e fD2 foram: 1 ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 3 min, seguido por 34 ciclos de 95°C por 45 segundos (desnaturação), anelamento a 59°C por 45 segundos, e extensão a 72°C por 1 min, além de 1 ciclo final de extensão a 72°C por 5 min. A amplificação do DNA usando primers F27 e R1525 foi procedida da desnaturação inicial de 5 min a 94°C, seguida por 35 ciclos de 1 min a 94°C, 2 min a 60°C e 1 min a 72°C e a extensão final de 30 min a 72°C. Um isolado de *Pseudomonas aeruginosa* (CCBM 268) foi utilizado como controle positivo na análise de PCR. Os produtos da PCR foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 1% em tampão 1X TAE e as concentrações (em ng) destes produtos foram quantificadas por espectrometria (Genequant pro, Amesham Biosciences). As amostras amplificadas foram encaminhadas para a Macrogen Corp. (Rockville, MD, EUA) para seqüenciamento do gene 16S rRNA. Os eletroferogramas resultantes foram processados através do Software DNA Baser v.2 (HeracleSoftware, Alemanha) e a seqüência consenso de cada isolado foi comparada, (através da ferramenta BLAST), com seqüências depositadas em banco de dados público (RDP Project) e (GenBank) para identificação da espécie bacteriana.

Os isolados foram criopreservados conforme descrito no capítulo 1.

2.2 EXPERIMENTOS *IN VITRO* E *IN PLANTA*

2.2.1. Caracterização morfológica dos isolados

Os quatro isolados de rizobactérias Gram-positivas foram caracterizados morfológicamente e avaliados microscopicamente seguindo técnicas descritas no capítulo 1.

2.2.2. Caracterização micromorfológica do biofilme dos isolados

Ver técnica utilizada para caracterização da morfologia do biofilme, através da microscopia eletrônica de varredura no capítulo 1.

2.2.3. Avaliação da produção de EPS dos isolados

Tanto a técnica de preparo do inóculo os isolados; quanto a técnica utilizada no primeiro experimento para avaliar quantitativamente a produção de exopolissacarídeos em meios contendo diferentes fontes de carbono (experimento I); quanto a técnica utilizada no segundo experimento para avaliar quantitativamente a produção de EPS dos quatro isolados crescidos em meios diferentes concentrações das fontes de carbono (experimento II), foram descritas no capítulo 1.

No experimento II, para comparação da produção dos exopolissacarídeos utilizou-se uma cepa padrão de *Bacillus subtilis* (ATCC 19659), obtida da coleção de cultura do INCQS (00002). Ver o delineamento experimental adotado no capítulo 1.

As médias da produção de massa celular e EPS dos diferentes tratamentos nos experimentos I e II foram trabalhadas através de análise de variância seguida do teste de Tukey ($p < 0,05$), utilizando o software *Statistica* 6.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA).

2.2.4. Avaliação da colonização dos isolados em raízes de plantas

Dois experimentos independentes, um com tomate e outro com alface, foram conduzidos com o objetivo de avaliar a resposta dessas plantas à inoculação com os isolados bacterianos (Slim 17, Rizo 02, Rizo 11 e Rizo 35) e a colonização nas raízes conforme Alsanius et al., (2002) e Klerks et al. (2007) modificados. A preparação do inóculo, o delineamento adotado nos dois experimentos, a desinfestação e a inoculação das sementes estão descritos no capítulo 1.

Plantas de tomate com vinte e oito dias e de alface com trinta e cinco dias, após a inoculação das bactérias, foram coletadas e avaliadas quanto aos parâmetros de altura (somente para o tomate), área foliar (somente para a alface, utilizando medidor de área foliar LI-COR, LI-3100), diâmetro do coleto, massa fresca da parte aérea e da raiz, volume da raiz, massa seca – por liofilização (Labconco, freezezone 6) da parte aérea e da raiz e biomassa total. Esses parâmetros foram

analisados estatisticamente para cada espécie vegetal por análise de variância seguida do teste de Tukey ($p < 0,05$) utilizando o software *Statistica* 6.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA).

A colonização das raízes do tomate e da alface e a formação do biofilme bacteriano foram verificadas por microscopia eletrônica de varredura (conforme método descrito no capítulo 1).

3. RESULTADOS

3.1. IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

O sequenciamento da subunidade menor do gene do RNA ribossômico (16S rDNA) permitiu identificar o isolado Slim 17 como *Bacillus vallismortis* (99% de identidade) e os isolados Rizo 02, Rizo 11 e Rizo 35 apresentaram maior identidade com *Bacillus atrophaeus* (com 97, 95 e 93% de identidade respectivamente), como pode ser observado na Tabela 2 abaixo.

Tabela 2. Taxonomia dos isolados utilizados nos experimentos desse estudo. São apresentados a rizosfera da planta de origem (da qual o microrganismo foi isolado), e o equivalente (seqüência de nucleotídeos do 16S rDNA) e a espécie mais próximos de cada isolado.

Isolado	Rizosfera (planta) de origem	Espécie mais próxima (16S rDNA) ^a	Identidade
Rizo 02	<i>Syngonanthus mucugensis</i>	<i>Bacillus atrophaeus</i> strain MM20 GenBank: EU729737.1	97%
Rizo 11	<i>S. mucugensis</i>	<i>Bacillus atrophaeus</i> strain SL-44 GenBank: FJ194961.1	95%
Rizo 35	<i>S. mucugensis</i>	<i>Bacillus atrophaeus</i> strain SL-13 GenBank: FJ194959.1	93%
Slim 17	<i>Actinocephalus sp.</i>	<i>Bacillus vallismortis</i> GenBank: AB021198.1	99%

^a. Nome seguido pelo número de acesso do gene 16S rRNA no GenBank.

3.2 EXPERIMENTOS *IN VITRO* E *IN PLANTA*

3.2.1 Características morfológicas dos isolados

Os testes prévios com os isolados Slim 17, Rizo 02, Rizo 11 e Rizo 35 cultivados em meio mineral mínimo e em Agar Müller-Hinton apresentaram diferentes resultados para a morfologia das colônias crescidas nesses dois diferentes meios. Estas tiveram sutis alterações, quando cultivadas em ágar mineral mínimo com diferentes fontes de carbono (glicose e galactose), estas só evidenciadas 48 horas após a inoculação. Não houve nenhuma alteração perceptível nas características fenotípicas macroscópicas das colônias, quando os isolados foram crescidos em meio mínimo com diferentes concentrações do mesmo açúcar.

No meio de cultivo ágar Müller-Hinton, as rizobactérias apresentaram, já nas primeiras 24 horas de incubação, crescimento acelerado das colônias que tiveram evidenciadas as diferenças fenotípicas entre os isolados (Tabela 3), com as bactérias crescendo em todo o meio contido na placa. Esse comportamento não se

repetiu para as mesmas, cultivadas em meio ágar mineral mínimo (adicionado ou não com o açúcar), onde as colônias tiveram crescimento mais lento, diâmetro menor e morfologia diferente (para o mesmo isolado) das crescidas em ágar Müller-Hinton.

Tabela 3. Caracterização morfológica das colônias de rizobactérias em meio Müller-Hinton após 24^o (à 28 °C) de incubação.

Linhagem	Forma	Elevação	Margem	Produção de muco
SLIM 17	Irregular	Umbilicada	Lobada	Alta
RIZO 02	Irregular	Monticulada	Ondeadada	Alta
RIZO 11	Irregular	Monticulada	Lobada	Alta
RIZO 35	Irregular	Monticulada	Ondeadada	Alta

No experimento envolvendo os 4 isolados crescidos em ágar nutriente e em meio mineral mínimo, acrescido de açúcares em diferentes concentrações, diferenças fenotípicas das colônias, também foram evidentes para esses dois meios de cultivo. No meio AN os isolados cresceram em um tempo menor (cerca 20h) do que no meio mínimo, independentemente da adição de açúcar. Nos dois meios os isolados Slim 17, Rizo 02, Rizo 11 apresentaram viscosidade e brilho, o que não ocorreu pra Rizo 35. Quanto a coloração Slim 17, Rizo 02 e Rizo 35 apresentaram coloração creme e a Rizo 11 amarelada.

Todos os isolados apresentaram crescimento no meio ágar mineral mínimo sem fonte de carbono, mas ele foi mais lento e discreto, quando comparado ao meio AN e aos meios mínimos suplementados com açúcares. O dendograma apresentado na Figura 1 abaixo mostra a similaridade entre as rizobactérias estudadas, gerado a partir das características fenotípicas das colônias crescidas nos meio AN, mineral mínimo sem açúcar, mineral mínimo com glicose a 2% e mineral mínimo com galactose 2%.

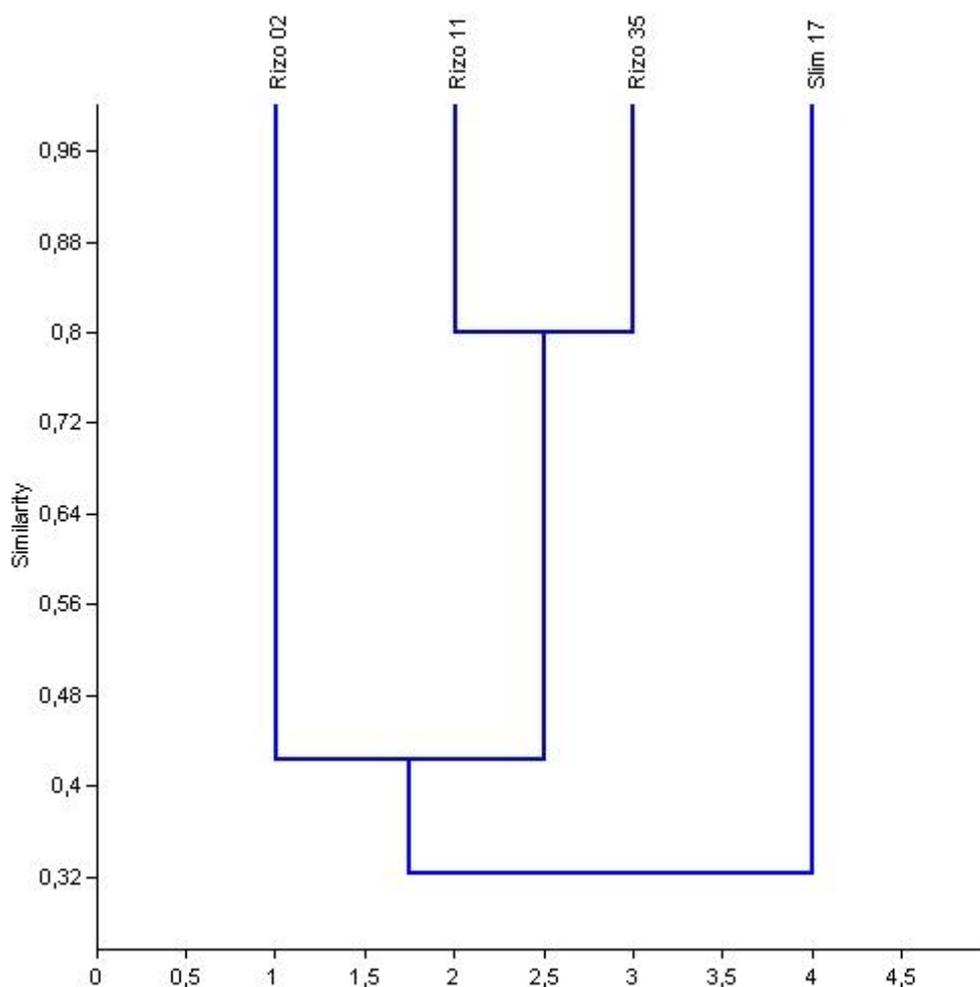


Figura 1: Dendrograma baseado nas análises morfotintoriais e nas características fenotípicas das colônias dos isolados Sim 17, Rizo 02, Rizo 11 e Rizo 35 cultivados em diferentes meios de cultura. O dendrograma foi obtido pela análise de agrupamento com o algoritmo UPGMA (*Unweighted pair-group method with arithmetical averages*) utilizando o índice de Jaccard como coeficiente de similaridade.

De acordo com a caracterização morfotintorial, observou-se que os quatro isolados do estudo são Gram-positivos, e quanto à forma, todos são bacilos. O tamanho médio das células de Slim 17 e Rizo 11 foi 2,5 μm , enquanto que para Rizo 02 e Rizo 35 o tamanho foi de 2,0 μm . Rizo 02, Rizo 11 e Rizo 35 apresentaram formação de cápsulas.

Cada isolado apresentou características peculiares e diferenças quanto à morfologia das colônias e das células, e isso se refletiu na análise de agrupamento (Fig. 1) em que houve formação de apenas um grupo (contendo Rizo 11 e Rizo 35) com similaridade em torno de 80%.

3.2.2 Caracterização micromorfológica do biofilme dos isolados

O cultivo dos isolados em meio ágar mineral mínimo com 2 % da fonte de carbono resultou na formação do biofilme (muco), observado no MEV. A análise da micromorfologia mostrou que as células bacterianas são envolvidas em matriz de polissacarídeos com diferentes topografias e arranjos das rizobactérias (Figs. 2 e 3). Os isolados Slim 17, Rizo 02 e Rizo 11 apresentaram tamanho celular menor (Figs. 2A, 2D e 3A, respectivamente), quando cultivado em meio mineral mínimo (MMM), do que com o meio acrescido de açúcares (Figs. 2B, 2C, 2F, 2G, 3B e 3C).

As culturas de SLIM 17 crescidas em MMM+Gli têm aspectos semelhantes a tramas de tecido (Fig. 2B), enquanto que em MMM+Gal (Fig. 2C) apresenta a matriz polimérica com aspecto fibroso e viscoso. Para o isolado Rizo 02, cultivado em MMM+Gli (Fig. 2E), foi observada densa massa celular e maior presença de exopolissacarídeos quando comparadas ao MMM (2D) e MMM+Gal (2E) que apresentaram massa celular bastante reduzida e a formação de escassos filamentos de exopolissacarídeos.

O isolado de Rizo 11, crescido em MMM apresentou menos filamentos de exopolissacarídeos (Fig. 3A) do que os cultivados em MMM+Gli (Fig. 3B) que tiveram aspecto mucóide e tramado e também menos do que os crescidos em MMM+Gal (Fig. 3C) que tiveram aspecto fibroso e tramado. A elétron-micrografia dos cultivos de Rizo 35 em MMM apresentou escassez de massa celular e poucos filamentos de exopolissacarídeos (Fig. 3D), quando comparada com as que mostram esse isolado crescido em MMM+Gli (Fig. 3E) e MMM+Gal (Fig. 3F). As rizobactérias desse isolado, crescidas em meio com os açúcares, apresentaram a matriz polimérica de aspecto semelhante, mas no meio com glicose (Fig. 3F) houve maior massa celular e camada de EPS mais densa do que a observada naquelas crescidas em meio com adição de galactose.

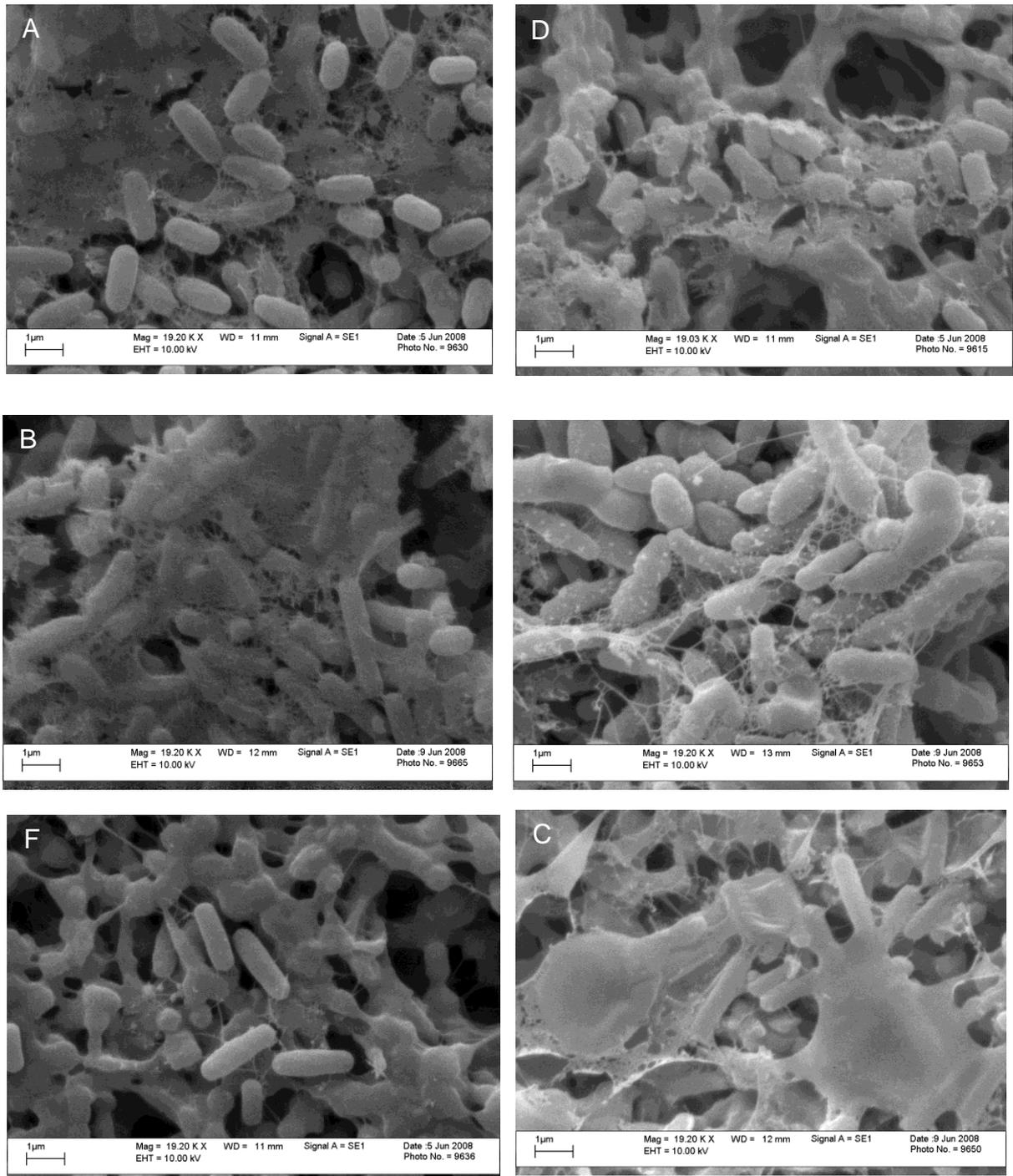


Figura 2. Micrografias eletrônicas de varredura de rizobactérias cultivadas em meio mineral mínimo com diferentes fontes de carbono. (A) Slim 17 cultivada em MMM sem suplementação de açúcar. (B) Slim 17 cultivada em MMM com 2% Glicose. (C) Slim 17 cultivada em MMM com 2% Galactose. (D) Rizo 02 cultivada em MMM. (E) Rizo 02 cultivada em MMM com 2% Glicose. (F) Rizo 02 cultivada em MMM com 2% Galactose.

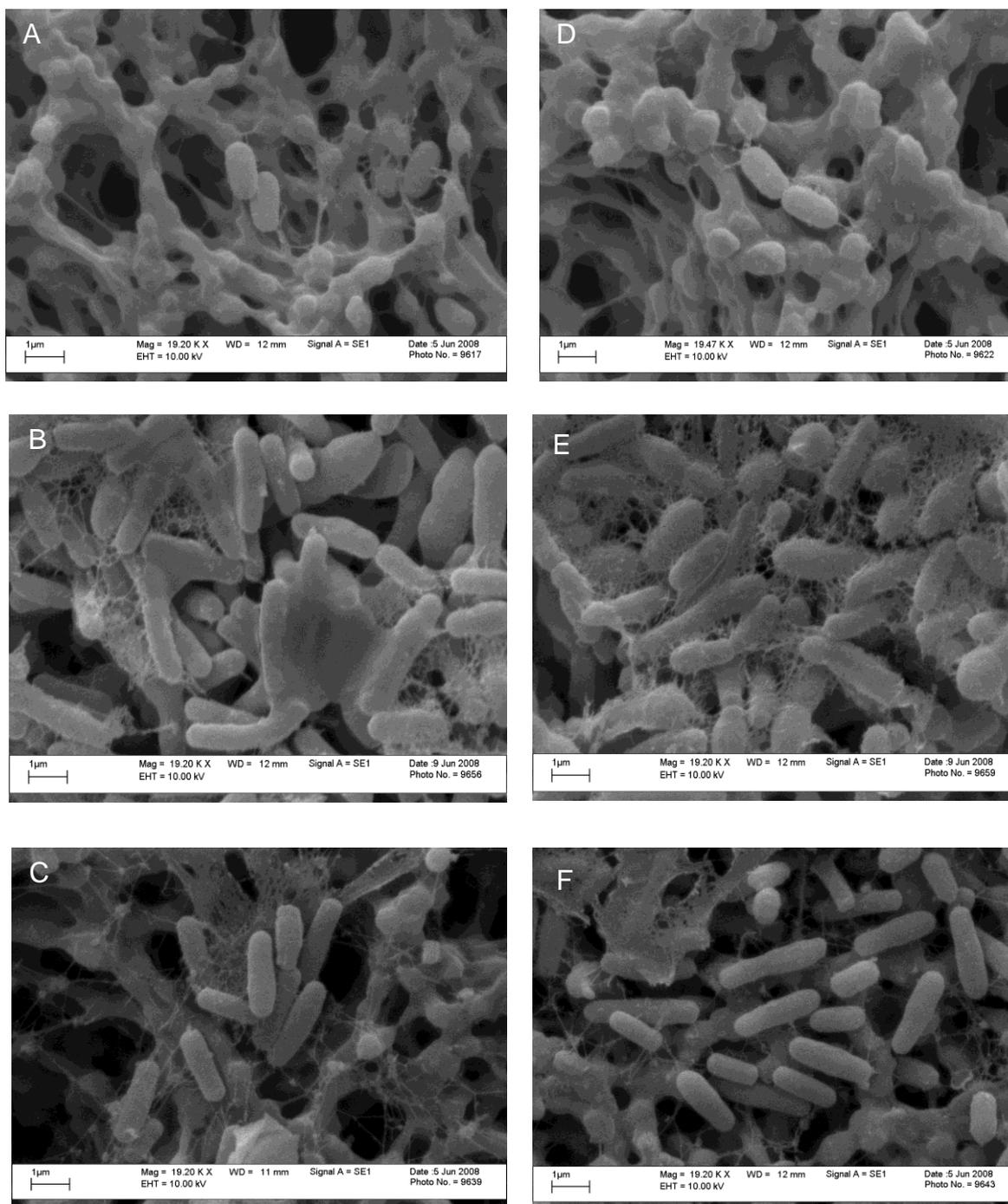


Figura 3. Micrografias eletrônicas de varredura de rizobactérias cultivadas em meio mineral mínimo com diferentes fontes de carbono. (A) Rizo 11 cultivada em MMM sem suplementação de açúcar. (B) Rizo 11 cultivada em MMM com 2% Glicose. (C) Rizo 11 cultivada em MMM com 2% Galactose. (D) Rizo 35 cultivada em MMM. (E) Rizo 35 cultivada em MMM com 2% Glicose. (F) Rizo 35 cultivada em MMM com 2% Galactose.

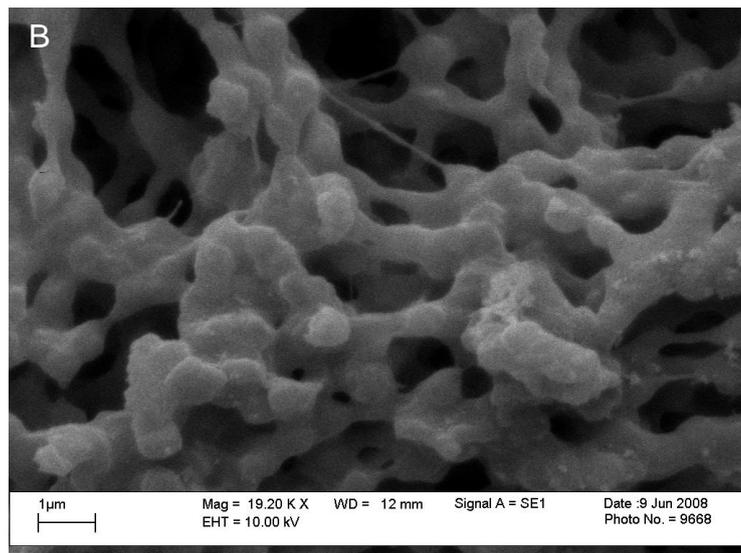
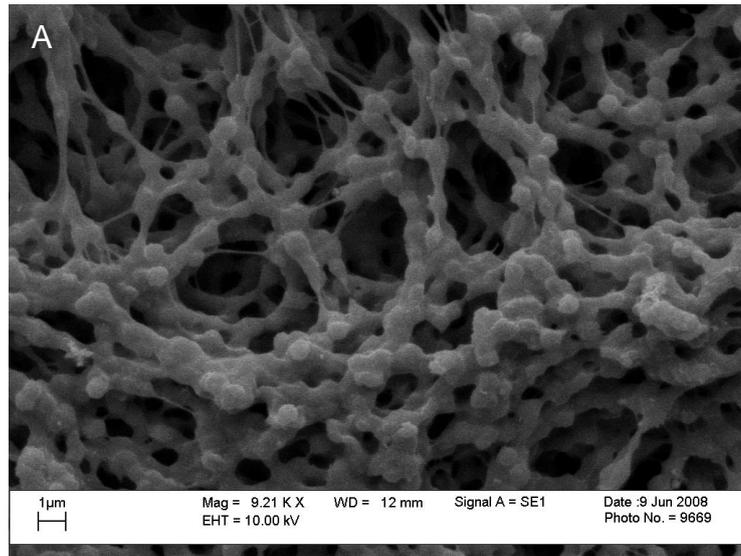


Figura 4. Micrografias eletrônicas de varredura da membrana de PVDA – Controle negativo. (A) Menor aumento, (B) Maior aumento.

3.2.3 Avaliação da produção de EPS dos isolados

Experimento I – Isolados crescidos em diferentes fontes de carbono

As rizobactérias Slim 17, Rizo 02, Rizo 11 e Rizo 35, cultivadas em meio mineral mínimo com quatro açúcares distintos (glicose, galactose, maltose e frutose) na mesma concentração (6%), demonstraram preferências na utilização do açúcar para o crescimento bacteriano e para as vias da produção dos exopolímeros (Tabela 4). A razão entre produção de EPS e massa bacteriana apresentou valores, em geral, não concatenados com a produção total de EPS (Tabela 4).

Tabela 4. Médias da produção de massa bacteriana, produção de EPS e razão EPS massa bacteriana dos isolados de rizobactérias crescidos em meio mínimo acrescidos de diferentes açúcares (concentração de 6%), (\pm erro padrão).

Isolado	Açúcar	Média da massa bacteriana (g.L ⁻¹) ^A	Média da produção de EPS (g.L ⁻¹)	Razão EPS/ massa bacteriana
Slim 17	Glicose	3,1800 \pm 0,14	2,3483 \pm	0,7452 \pm
	Galactose	4,5244 \pm 0,06	1,3500 \pm	0,2850 \pm
	Maltose	4,3783 \pm 0,11	2,2750 \pm	0,5196 \pm
	Frutose	3,7566 \pm 0,26	1,5783 \pm	0,4250 \pm
Rizo 02	Glicose	2,4500 \pm 0,21	6,4250 \pm	2,6909 \pm
	Galactose	3,2350 \pm 0,16	2,5622 \pm	0,8165 \pm
	Maltose	3,9183 \pm 0,09	3,2716 \pm	0,8378 \pm
	Frutose	5,1050 \pm 0,16	5,7616 \pm	1,1319 \pm
Rizo 11	Glicose	3,3693 \pm 0,08	1,4733 \pm	0,4390 \pm
	Galactose	3,3288 \pm 0,24	1,5633 \pm	0,4668 \pm
	Maltose	3,3800 \pm 0,10	2,0900 \pm	0,6266 \pm
	Frutose	3,2377 \pm 0,12	1,5111 \pm	0,4668 \pm
Rizo 35	Glicose	3,2833 \pm 0,09	1,2816 \pm	0,3901 \pm
	Galactose	3,3016 \pm 0,17	1,8650 \pm	0,5682 \pm
	Maltose	3,1000 \pm 0,18	1,7450 \pm	0,5668 \pm
	Frutose	3,2750 \pm 0,03	1,7466 \pm	0,5336 \pm

^A médias de 4 repetições.

Efeitos significativos estatisticamente dos isolados e da interação (isolados x fonte de carbono) demonstraram que a produção de EPS respondeu ao tratamento (açúcar) utilizado de diferentes maneiras para os isolados (Tabela 4).

Rizo 02 apresentou maior produção de EPS para duas fontes de carbono utilizadas (glicose e frutose) quando comparados a todos os outros 3 isolados crescidos com os diferentes monossacarídeos. A produção de EPS foi afetada pelo açúcar presente no meio de cultura de maneira isolado-específica, especialmente para Slim 17 e Rizo 02. Tal comportamento não se repetiu para os isolados Rizo 11 e Rizo 35 que não tiveram sua produção de EPS afetada pelo monossacarídeo suplementado no meio mineral mínimo.

A partir da avaliação do comportamento das rizobactérias crescidas nos 4 diferentes açúcares quanto à massa bacteriana, relação EPS por massa bacteriana e, principalmente, produção de EPS, foram escolhidas as fontes de carbono preferenciais para cada isolado, que foram testadas, no experimento subsequente, com diferentes concentrações do açúcar. Assim, os isolados Slim 17 e Rizo 02 foram crescidos em diferentes concentrações de glicose, enquanto que Rizo 11 e Rizo 35 de galactose. Uma cepa padrão de *Bacillus subtilis* foi utilizada com a finalidade de comparar a produção de EPS com a dos isolados.

Experimento II – Isolados crescidos em diferentes concentrações de açúcar

Também nesse experimento foram observados efeitos significativos estatisticamente dos isolados e da interação (isolados x concentração do açúcar) evidenciando que a produção de EPS respondeu ao tratamento (concentração do açúcar) com comportamento diferenciado para os isolados (Fig. 5). Rizo 02 foi novamente o isolado que apresentou maior produção de EPS, isso para a concentração de 6% do açúcar, e que diferiu estatisticamente, ($p = 0,000269$, para Slim 17 em 6% de açúcar) de todos os outros isolados (incluindo a cepa padrão) em todas as demais concentrações de açúcar. A produção de EPS foi afetada pela concentração do açúcar presente no meio de cultura de maneira isolado-específica, exceto para Slim 17.

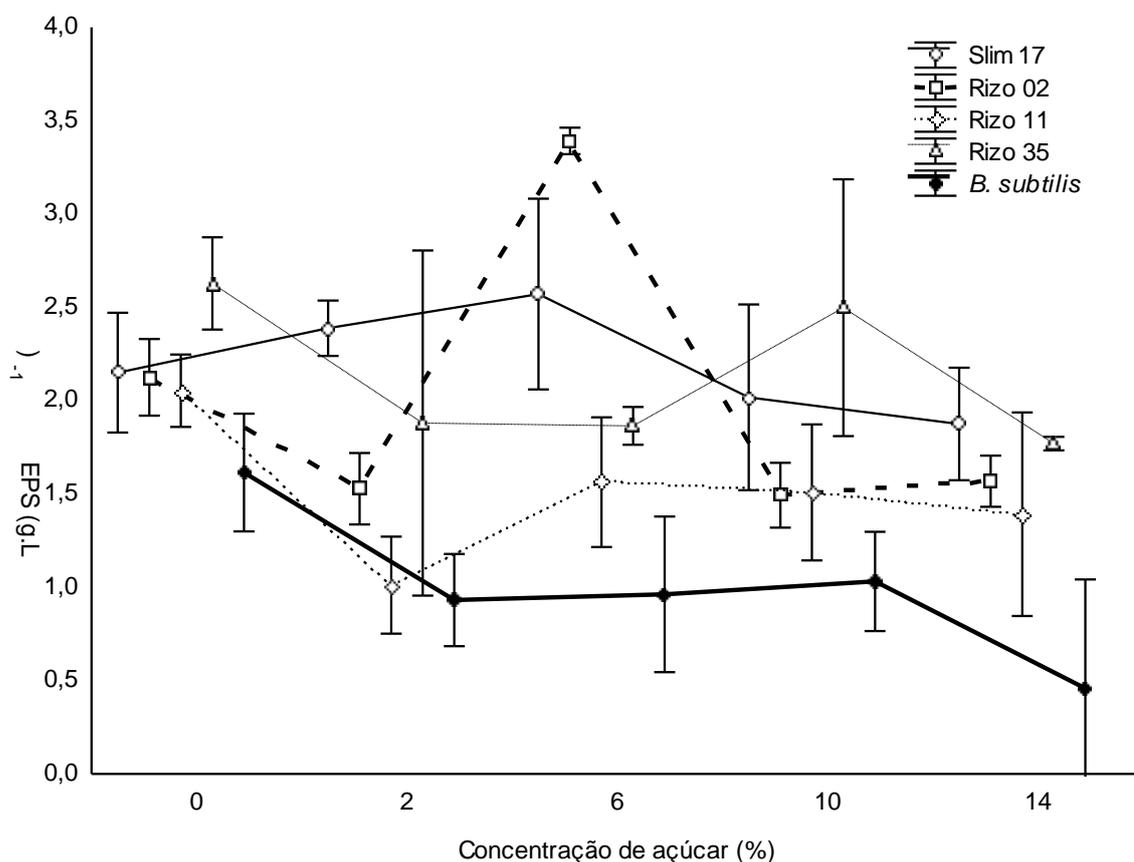


Figura 6. Produção de EPS (g.L⁻¹) dos isolados Slim 17 (meio com glicose), Rizo 02 (meio com glicose), Rizo 11 (meio com galactose) e Rizo 35 (meio com galactose) e cepa padrão *Bacillus subtilis* cultivados em meios com concentração do açúcar de 0%, 2%, 6%, 10% e 14%. As barras correspondem ao erro padrão.

Os isolados não apresentaram uma tendência linear de aumento da produção de EPS em função da elevação da concentração do açúcar no meio. Entretanto, quando foi avaliada a razão EPS massa bacteriana (Fig. 6), os isolados apresentaram tendência em ter um rendimento maior no meio mínimo sem adição de açúcar. O isolado que apresentou maior valor para essa relação foi Rizo 35 que diferiu estatisticamente ($P = 0,000158$) de todos os outros isolados nas diferentes

concentrações do açúcar. A ANOVA demonstrou que não houve efeitos significativos da interação (isolados x concentração do açúcar) para o rendimento de EPS por massa bacteriana.

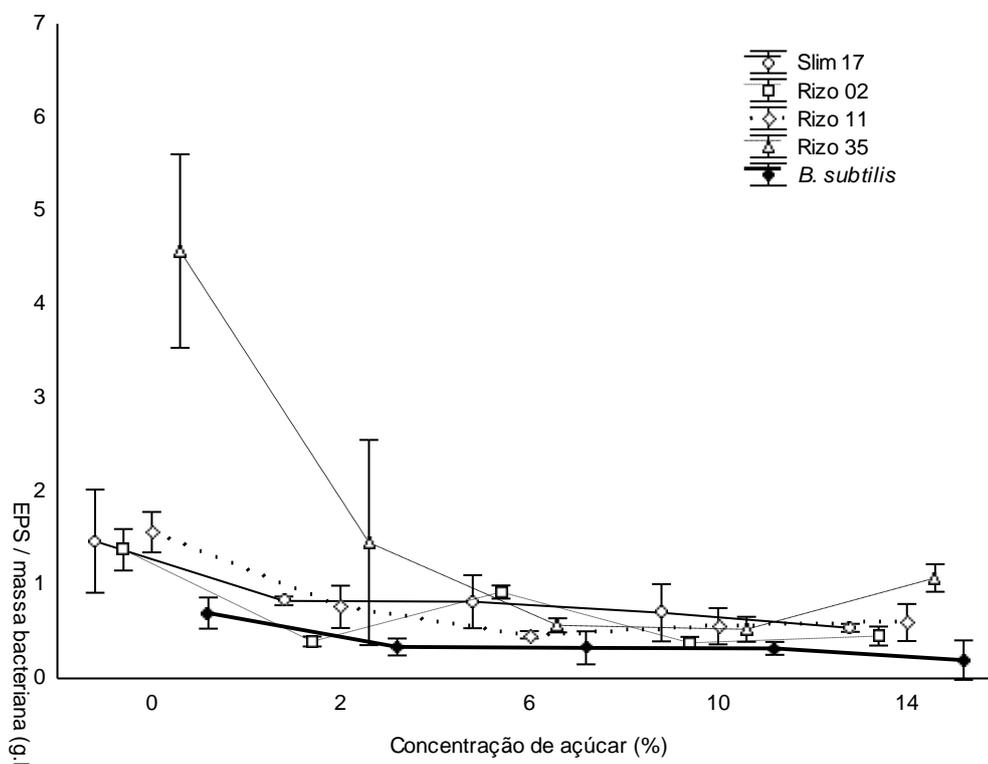


Figura 7. Relação produção de EPS e massa bacteriana (g.L^{-1}) dos isolados Slim 17 (meio com glicose), Rizo 02 (meio com glicose), Rizo 11 (meio com galactose) e Rizo 35 (meio com galactose) cepa padrão *Bacillus subtilis* (meio com glicose) cultivadas em meios com concentração do açúcar variável em 0%, 2%, 6%, 10% e 14%. As barras correspondem ao erro padrão.

3.2.4 Avaliação da Colonização dos isolados em raízes de plantas

A observação da colonização dos isolados bacterianos nas plantas realizada através do MEV, mostrou que os isolados Slim 17 e Rizo 02 não colonizaram os segmentos de raízes do tomateiro ($n = 20$) amostrados (dados não apresentados). Além disso, nenhum dos 4 isolados bacterianos colonizou as raízes de alface ($n = 40$), nas condições de crescimento axênico das plantas no experimento (dados não apresentados).

As raízes do tomateiro foram colonizadas (Fig. 7) parcamente pelas bactérias do isolado Rizo 11 (Figs. 7A, 7B e 7C) e abundantemente pelas do isolado

rizo 35 (Figs. 7D, 7E e 7F). As bactérias do Rizo11 formaram um pequeno agregado de células, envolto de exopolímeros (Figs. 7B e 7C), aderido à superfície da raiz. As bactérias do Rizo 35 foram abundantes na raiz de tomateiro e apresentaram uma rede polimérica entre as células, que foi denominada de biofilme e que aparentemente desempenhou a função de agregação celular e adesão á superfície.

Apesar da formação do biofilme na superfície da raiz de tomateiro por parte do isolado Rizo 35, todos os parâmetros de crescimento da planta analisados (altura, diâmetro do coleto, massa fresca da parte aérea e da raiz, volume da raiz, massa seca da parte aérea e da raiz e biomassa total) não apresentaram nenhuma diferença estatística entre os tratamentos (isolados inoculados) para as plantas nas condições de crescimento axênicas desse experimento (dados não apresentados). Além disso, todos os parâmetros de crescimento da alface analisados (área foliar, diâmetro do coleto, massa fresca da parte aérea e da raiz, volume da raiz, massa seca da parte aérea e da raiz e biomassa total) não apresentaram diferenças significativas entre os isolados inoculados nas condições experimentais adotadas (dados não apresentados).

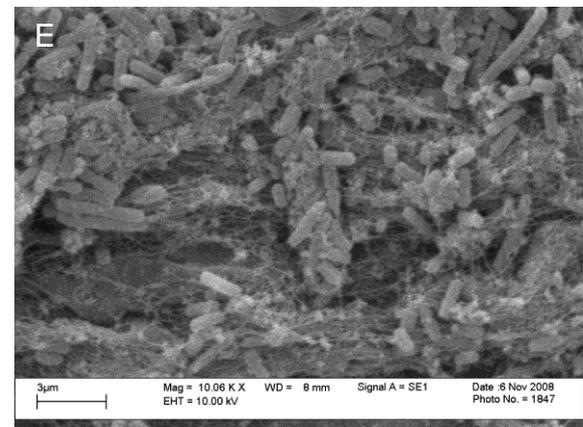
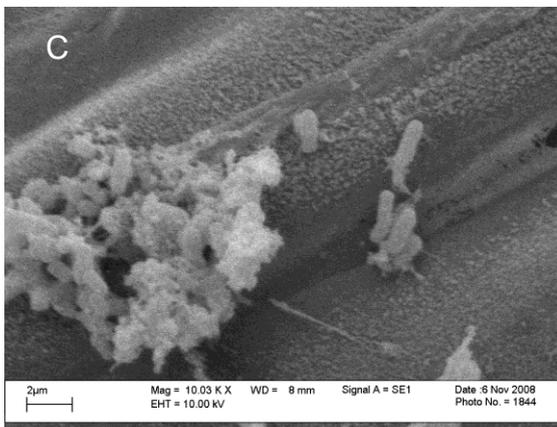
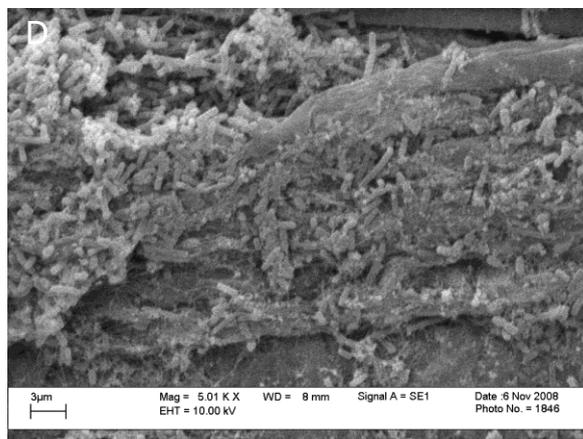
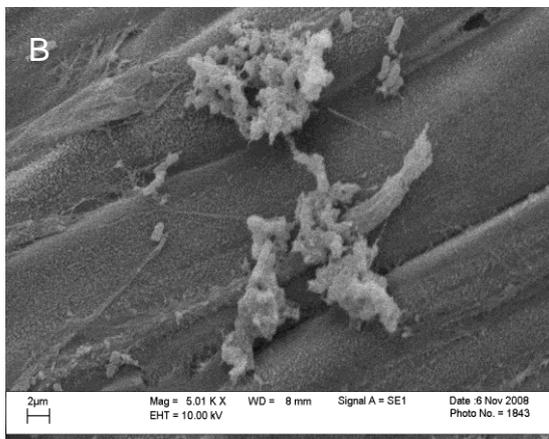
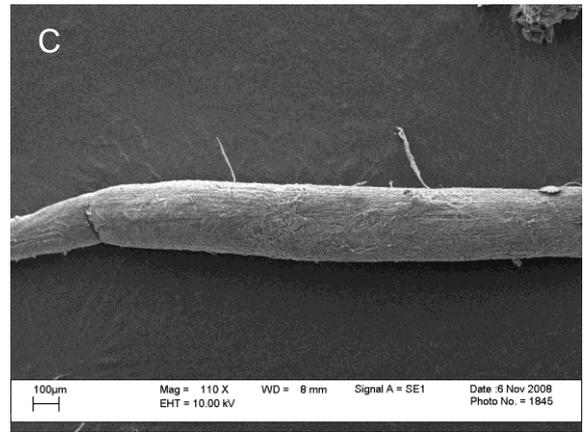
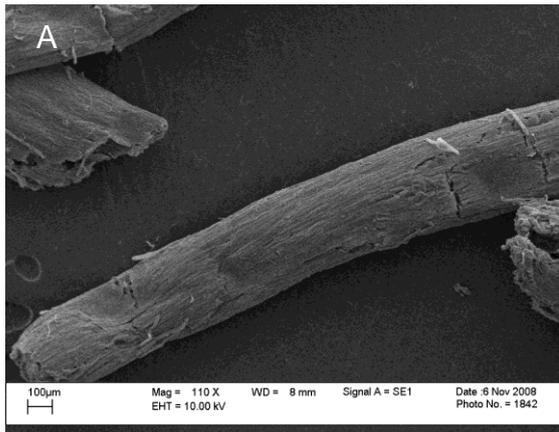


Figura 5. Micrografias eletrônicas das raízes de tomateiro colonizadas por rizobactérias. (A) Vista geral da raiz de tomateiro colonizada com o isolado Rizo 11. (B) Detalhe da figura anterior mostrando o biofilme formado pelas bactérias na superfície da raiz. (C) Aumento da figura anterior mostrando o biofilme formado pelas bactérias na superfície da raiz. (D) Vista geral da raiz de tomateiro colonizada com o isolado Rizo 35 (E) Aumento da figura anterior mostrando o biofilme formado pelas bactérias na superfície da raiz, (F) Detalhe da figura anterior mostrando o biofilme formado pelas bactérias na superfície da raiz.

4. DISCUSSÃO

A caracterização morfológica e tintorial dos isolados bacterianos da rizosfera de plantas do Semi-Árido baiano, Slim 17, Rizo 02, Rizo 11 e Rizo 35, mostrou a diferenciação existente entre esses isolados. Isso permite a separação dos isolados, utilizando algumas características das colônias em placa (coloração, produção e aspecto do muco), e da morfologia da célula (tamanho e presença de cápsula). A análise molecular do gene 16S rRNA apontou a maior similaridade com a mesma espécie de *Bacillus* (*B. atrophaeus*) para 3 desses isolados (Rizo 02, Rizo 11 e Rizo 35) que foram provenientes da rizosfera da mesma espécie de planta (*Syngonanthus mucugensis*). Esses isolados bacterianos assumem uma importância ecológica e científica relevante, quando se considera o fato que *S. mucugensis* é endêmica de Campo Rupestre e está em risco de extinção, devido ao extrativismo das suas flores, sendo sua distribuição restrita a áreas, principalmente, dos municípios de Mucugê e Rio de Contas na Chapada Diamantina (GIULIETTI et al., 1997).

Quando foi comparado o crescimento dos isolados bacterianos e produção de EPS dos isolados do Semi-Árido baiano em diferentes meios de cultivo ricos (Müller-Hinton e AN) e pobre (MM) em nutrientes e carboidratos, este último meio apresentou colônias com crescimento mais lento e sem produção de muco (EPS) visível a olho nu. Segundo Madigan et al. (2004), essa não produção de muco pode ser sugerida pela ausência de carboidratos. Isso é corroborado por Romeiro et al (2001) ao mostrar que o cultivo de bactérias em um meio pobre em carboidratos diminui a produção de muco.

Os quatro isolados de bactérias do Semi-Árido baiano, entretanto, apresentaram crescimento no meio ágar mineral mínimo sem fonte de carbono. Isso pode ser explicado pela modificação do metabolismo celular em função da ausência de carboidrato, através dos seguintes mecanismos: 1. Quimioautotrofia, utilizando o CO₂ como fonte de carbono e compostos inorgânicos presentes no meio MM (Fe, H, N, S) como fonte de energia, para sintetizar, através do ciclo de Calvin, os carboidratos, o que poderia ainda justificar o crescimento lento das colônias (MADIGAN et al., 2004). 2. Bactérias armazenam compostos energéticos, por exemplo, como grânulos de poli-β-hidroxibutirato (PHB) e grânulos de glicogênio

utilizados funcionalmente como reservas de carbono. As bactérias consomem o que estava estocado nas unidades formadoras de colônias iniciais (do inóculo), podendo então, utilizar a energia para subseqüentes divisões celulares (PELCZAR JR., 1997).

O biofilme dos isolados variaram entre os isolados quanto à topografia, ao arranjo das bactérias e ao aspecto tridimensional dos exopolissacarídeos (EPS), e variaram também entre os mesmos isolados, quando cultivados em meio com diferentes fontes de carbono. Pois, segundo Sutherland (2001), diferentes tipos de carboidratos influenciam na formação da matriz polimérica, na estruturação do biofilme e a quantidade de EPS sintetizado.

Sutherland (1977) demonstrou que maior quantidade de carboidrato no meio de cultura aumenta a produção de substâncias poliméricas extracelulares bacterianas. Essa afirmação, entretanto, deve ser observada cuidadosamente, considerando-se a fonte de carboidrato e a concentração deste no meio de cultura. Castellane e Lemos (2007) pesquisaram a constituição química de exopolissacarídeos de rizóbios crescidos em diferentes fontes de carbono e concluíram que ocorrem variações nas proporções dos monômeros de monossacarídeos que compõem as unidades repetitivas do EPS.

Celik et al. (2008), em trabalho de quantificação de EPS produzidos por linhagens de *Pseudomonas* em meio de cultivo com diferentes fontes de carbono e diferentes concentrações, concluíram que as concentrações de 2 e 3% de açúcar obtiveram melhores rendimentos, e que as altas concentrações (5 e 6%) de açúcar inibiam a produção de EPS. O experimento com as rizobactérias do Semi-Árido, baiano submetidas a doses crescentes de açúcar, demonstrou que houve uma concentração mais adequada que resultou na maior produção de EPS de 6% para Rizo 02 e Slim 17. O rendimento na produção de EPS para estes isolados do Semi-Árido foi aproximadamente dez vezes superior do que o encontrado no trabalho de Celik et al. (2008), que utilizou *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas putida* crescidas em xilose a 2%.

Os experimentos com os isolados de bactérias do Semi-Árido baiano demonstraram que a produção da massa bacteriana não é proporcional à produção de EPS e varia com o tipo e concentração do açúcar presente no meio de cultivo.

A colonização de *Bacillus subtilis* em raízes de *Arabidopsis thaliana* foi observada por Rudrappa et al. (2008), que concluíram que a presença e formação de biofilme bacteriano distinto em diferentes regiões da raiz, sendo menos volumoso na região madura da raiz, quando comparado ao biofilme presente na ponta da raiz. O padrão dessa colonização se repete, aqui, para o isolado Rizo 35 que colonizou abundantemente as raízes de tomateiro, tendo maior presença de biofilme na região apical da raiz. A utilização do MEV para monitorar a colonização das raízes se mostrou viável, corroborando a afirmação de Chin-A-Woeng et al. (1997) de se tratar uma ferramenta útil para tal propósito.

A taxa de colonização nula para os 4 isolados bacterianos do Semi-Árido baiano em raízes alface e a baixa e nula colonização das raízes de tomateiro dos isolados Slim 17, Rizo 02 e Rizo 11 talvez expliquem a ausência de efeitos sobre o crescimento destas plantas. Na literatura, é frequentemente relatada a ausência de efeitos de rizobactérias em condições experimentais. Freitas et al. (2003), também observaram instabilidade nos efeitos dos isolados *Pseudomonas* sp. sobre plantas de alface. Digat et al. (1990) inocularam diferentes variedades de alface e tomate com um isolado de *Pseudomonas fluorescens* e observaram que, mesmo em condições ambientais semelhantes, as respostas quanto à promoção do crescimento destas duas plantas divergiram. De acordo com Raaijmakers & Weller (2001) uma das grandes dificuldades em se utilizar rizobactérias como uma alternativa viável de biocontrole de patógenos é que a maioria dessas bactérias é muito variável quanto à sua performance.

Os resultados dos experimentos de inoculação dos isolados bacterianos provenientes do Semi-Árido em plantas de alface e tomateiro permitem avaliar que, nas condições experimentais utilizadas, esses isolados não são fitopatógenos, bem como, não são promotores de crescimento de planta.

5. REFERÊNCIAS

ALSANIUS, B. W.; HULTBERG, M.; ENGLUND J-E. Effect of lacZY-marking of the 2,4-diacetyl-phloroglucinol producing *Pseudomonas fluorescens*-strain 5-2/4 on its physiological performance and root colonization ability, *Microbiol. Res.* v.157, p.39–45, 2002.

BRANDA, S., et al. Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *PNAS* 98, p.11621–11626, 2001.

BRASIL, Nova delimitação do Semi-Árido brasileiro, Secretaria de Políticas de Desenvolvimento regional, Ministério da Integração Nacional, Governo Federal, 35 p. 2006.

BURR, T.J.; CAESAR, A. Beneficial plant bacteria. *CRC Critical Reviews in Plant Sciences.* v. 2, n. 1, p. 1-20, 1985.

CASTELLANE, T.C.L.; LEMOS, E.G.M. Composição de exopolissacarídeos produzidos por estirpes de rizóbios cultivados em diferentes fontes de carbono, *Pesq. agropec. bras.* Brasília.v.42, n.10, 2007.

CELIK G.Y.; ASLIM, B.; BEYATLI, Y., Characterization and production of the exopolysaccharide (EPS) from *Pseudomonas aeruginosa* G1 and *Pseudomonas putida* G12 strains. *Carbohydrate Polymers.* V.73, n.1, 4, p.178-182, 2008.

CHIN-A-WOENG, T.F.C., DE PRIESTER, W., VAN DER BRIJ, A., LUGTENBERG, B.J.J. Description of the colonization of a gnotobiotic tomato rhizosphere by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain WCS365, using scanning electron microscopy. *The American Phytopathological Society.* v.10, p.79-86, 1997.

DE VUYST, L.; DEGEEST, B. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews.* v. 23, p.153–177,1999.

DIGAT, B.; GAUDILLAT, M.; LABADIE, J.M. Susceptibility of various tomato and lettuce genotypes of plant-growth-promoting *Pseudomonas*. *Symbiosis.* v. 9, p. 295-303, 1990.

DOS SANTOS, S. C. Prospecção de linhagens bacterianas produtoras de biossurfactantes com potencial biotecnológico no Semi-árido baiano. 2008. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia.

FETT, W.F. Bacterial exopolysaccharides: Their nature, regulation and role in host-pathogen interactions. *Current Topics in Botanical Research*. v.1, p.367–390, 1993.

FREITAS, S.S.; DE MELO, A.M.T.; DONZELI, V.P. Promoção de crescimento de alface por rizobactérias. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, v. 27, n. 1, p. 61-70, 2003.

GIULIETTI AM., MENEZES, N.L., PIRANI, I.R, MEGURO, M. & WANDERLEY, M.G.L. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: caracterização e lista de espécies. *Boletim de Botânica, Universidade de São Paulo*, 9: 1-151. 1987.

GIULIETTI AM., PIRANI, I.R & HARLEY, RM. Espinhaço range Region, Eastern Brazil. In Davis, S. D., Heywood, V. H Herrera-MacBride, O., Villa-Lobos, J. & Hamiltos, A C. (eds.). *Centers of plant diversity. A guide and strategy for their conservation*. Vol. 3. The Americas. IUCN Publication Unity, Cambridge. 1997.

GIULIETTI, A. M. ; HARLEY, R. M. ; QUEIROZ, L. P.; RAPINI, A. . To set the scene. In: Luciano Paganucci de Queiroz, Alessandro Rapini, Ana Maria Giulietti. (Org.). *Towards Greater Knowledge of the Brazilian Semi-arid*. Brasília: Ministério de Ciência e Tecnologia. v. I, p. 15-19, 2006.

GÖTZ, M.; et al. Survival of gfp-tagged antagonistic bacteria in the rhizosphere of tomato plants and their effects on the indigenous bacterial community. *FEMS Microbiol Ecol*. v.56, p.207–218, 2006.

HABE, M.H.; UESUGI, C.H. Método in vitro para avaliar a capacidade colonizadora de bactérias em raízes de tomateiro. *Fitopatol. Bras*. v.25, p.657-660, 2000.

HALL-STOODLEY L, COSTERTON JW, STOODLEY P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol*. v.2, p.95–108, 2004.

JOLY, AB. *Botânica - Introdução à taxonomia vegetal*. São Paulo, Companhia Editora Nacional, 777p. 1970.

JONES, H. C.; ROTH, I. L.; SAUNDERS, W. M. III. Electron microscopic study of a slime layer. *J Bacteriol*. v.99, p.316–25, 1969.

KEARNS, D. B.; CHU, F.; BRANDA, S. S.; KOLTER, R.; LOSICK R., A master regulator for biofilm formation by *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*. 2005.

KLERKS, M.M.; VAN GENT-PELZER, M.; FRANZ, E.; ZIJLSTRA, C.; VAN BRUGGEN, A.H.C. Physiological and Molecular Responses of *Lactuca sativa* to

Colonization by *Salmonella enterica* Serovar Dublin. *Applied and environmental microbiology*. v.73, n.15, p.4905–4914, 2007.

KONEMAN, E. W. et al. Diagnóstico Microbiológico. Texto e atlas colorido. Trad. de Arlete Emily Aury. 5ª ed. São Paulo: MEDSI, 2001.

LAMBET et al. Rhizobacteria of Maize and Their Antifungal Activities. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 1866-1871, 1987.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: Nucleic acid techniques in bacterial systematics (Stackbrandt E and Goodfellow M, eds.). Wiley, Chichester, p.115-176. 1991.

KLOEPPER, J.W.; SCHER, F.M.; LALIBERTE, M.; Tipping, B. Emergence-promoting rhizobacteria: description and implications for agriculture. In: Iron, Siderophores and Plant Disease ed. Swinburne, T.R. Plenum, NY: CRC Press Inc. FL, USA: Boca Raton. p.155–164, 1986.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. Microbiologia de Brock, In Diversidade. Ed. Prentice Hall. 10ed. São Paulo, 608p. 2004.

MAYAK, S.; TIROSH, T.; GLICK, B. R., Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress, *Plant Physiology and Biochemistry*. v.42, p.565–572, 2004.

MORIKAWA, M. Beneficial Biofilm Formation by Industrial Bacteria *Bacillus subtilis* and Related Species. *Journal of bioscience and bioengineering*. v.101, n.1, p.1–8, 2006.

NEHL, D.B.; ALLEN, S.J.; BROWN, J.F. Deleterious rhizosphere bacteria: an integrating perspective. *Applied Soil Ecology*, v. 5, n.1, p. 1-20, 1997.

PELCZAR JR, J.M.; CHAN, N.R.K.; KRIEG, N.R. Microbiologia conceitos e aplicações. Ed. Makron Books, São Paulo, 2ª Ed., vol I, 524p. 1997.

PRIESTER, J. H.; HORST, A. M.; VAN DE WERFHORST, L. C.; SALETA, J. L.; MERTES, L. A. K.; HOLDEN, P. A. Enhanced visualization of microbial biofilms by staining and environmental scanning electron microscopy. *Journal of Microbiological Methods*. v.68, p.577–587, 2007.

RAAIJAMAKERS, J.M.; WELLER, D.M. Exploiting genotypic diversity of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas* spp: characterization of superior root-colonizing *P. fluorescens* strain Q8rl- 96. *Applied and Environmental Microbiology*. v.67, p.2545-2554, 2001.

RUDRAPPA, T; BIEDRZYCKI, M.L.; BAIS, H.P. Causes and consequences of plant-associated biofilms. *FEMS Microbiol Ecol*. v.64,p.153–166, 2008.

SCHROTH, M.N.; HANCOCK, J.G. Selected topics in biological control. *Annual Review of Microbiology*, v.35, p. 453 – 476, 1981

SALEEM, M.; ARSHAD, M.; HUSSAIN, S.; BHATTI, A.S., Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2007.

SAMBROOK, J.; MANIATIS, T.; FRISCH, E.F. Molecular cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbour Lab. Press, 2001.

SOMASEGARAN, P., HOBEN, H. J. Handbook for Rhizobia: methods in Legume-Rhizobium Technology. Springer-Verlag New York, Inc., 1994

SUTHERLAND, I. W.. Biotechnology of microbial exopolysaccharides. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom. 1990.

TALLON, R., BRESSOLLIER, P.; URDACI, M.C. Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. *Research in Microbiology*. v.154, p.705–712, 2003.

TIAN, B.; YANG, J.; ZHANG, K.Q. Bacteria used in the biological control of plant-parasitic nematodes: populations, mechanism of action, and future prospects. *FEMS Microbiology Ecology*. v. 61, p. 197-213, 2007.

WELLER, D.M.; THOMASHOW, L.S. Current challenges in introducing beneficial Microorganisms in to the Rhizosphere. In: O.gara, F.; Dowling, D. N.; Boesten, B. Molecular Ecology of Rhizosphere Microorganisms. VCH Publishers, Weinheim, Alemanha. 1994.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os diversos experimentos executados ao longo desse estudo permitem fazer algumas inferências e conclusões sobre a produção de EPS, colonização das raízes, interações com as plantas e morfologia dos isolados de bactérias do Semi-Árido baiano:

- Os Isolados apresentaram colônias com diferenças morfológicas, quando crescidos em diferentes meios de cultura e com diferentes fontes de carbono. Os mesmos não se diferenciaram, quando crescidos em um mesmo meio com diferentes concentrações de açúcar;
- O biofilme dos isolados são diferentes quanto à topografia, ao arranjo das bactérias e ao aspecto tridimensional dos exopolissacarídeos (EPS), quando cultivados em meio com diferentes fontes de carbono;
- A quantidade de EPS produzida pelos isolados depende do tipo e concentração dos açúcares;
- A maior quantidade de EPS produzida foi do isolado Rizo 02 (no estudo das Gram positivas) e Slim 04 (no estudo das Gram negativas), quando crescidas em meio contendo glicose a 6%;
- A massa bacteriana do isolado e sua respectiva produção de EPS não tem relação direta e varia de acordo com o isolado;
- Com relação à interação rizobactéria - planta, nenhum dos isolados (Gram-positivos ou negativos) demonstrou ser promotor de crescimento das plantas, nas condições experimentais deste estudo;
- Os isolados bacterianos aqui estudados não foram patogênicos para as plantas de tomateiro e alface;

Alguns pontos deste estudo merecem continuidade com intuito de elucidar algumas questões como: existe componente protéico no EPS* produzido pelos isolados bacterianos do Semi-Árido baiano e caso exista qual sua quantidade? Qual a constituição química dos EPS e quais as propriedades físicas e reológicas dos EPS produzidos? Houve alguma resposta das plantas* a inoculação dos isolados quanto à produção de enzimas ou fitormônios? Em condições de casa de vegetação e utilizando solo como substrato os isolados de rizobactéria apresentariam associação com raízes de plantas e promoção de crescimento destas? Esses isolados apresentam atividade para solubilização de P e, ou fixação de nitrogênio? Investigando estas questões poderiam vir a surgir algum produto biotecnológico de relevância.

* Materiais conservados em dessecador e por liofilização para eventuais futuras análises.

ANEXOS

ANEXO I - MEIOS DE CULTURA

a) Meio Mineral Mínimo (MMM)

K ₂ HPO ₄	1,6g
KH ₂ PO ₄	0,2g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01g
NaCl	0,1g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,02g
Agar	15,0g

Água destilada q.s.p. 1000mL

SILVA, C.M.M.S.; ROQUE, M.R.A.; MELO, I.S. Microbiologia Ambiental: manual de laboratório. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 98p. 2000. ISSN 1516-4691

b) Meio Ágar Nutriente

Peptona	5,0 g
Extrato de carne	3,0 g
Ágar	15,0g
H ₂ O destilada	1000 ml

c) Meio TY

Triptona	5,0 g
Extrato de levedura	3,0 g
CaCl ₂ .H ₂ O	0,87 g
H ₂ O deionizada	1000 mL

SOMASEGARAN, P., HOBEN, H. J. **Handbook for Rhizobia: methods in Legume-Rhizobium Technology**. Springer-Verlag New York, Inc., 1994

ANEXO II - PROTOCOLOS

ANEXO II - PROTOCOLOS

a) Reterminação do número de UFC.ML⁻¹

- Preparar as placas (esterilizar meio e plaquear) com o meio de cultura (AN);
- Preparar e esterilizar salina com 20µL Tween 80 a 0,1 %, pois as linhagens apresentam tendência a uma copiosa produção muco, com dificuldade de homogeneização, uma das formas de se minimizar o problema é a adição de um espalhante conforme GERHARDT (1994) e ROMEIRO et al (1991);
- Repicar, em estrias compostas, as bactérias* para o meio de cultura (AN), encubar a 28°C por 18 a 24 horas. – (placa mãe);
- Seleciona-se, pelo menos, de três a cinco colônias, bem isoladas. Retira-se cada colônia com uma alça, transferindo-se os microrganismos para um tubo contendo 4-5mL de salina (tubo mãe);
- Homogeneiza-se em vortex;
- No espectrofotômetro, acertar o comprimento de onda do feixe luminoso para 600 nm, utilizar cubetas apropriadas, usar como branco a solução salina. Determinar a absorbância em 600nm deverá variar de 0,08 a 0,10 (equivale a solução padrão McFarland de 0,5 - Isso resulta numa suspensão contendo aproximadamente de 1 a 2×10^8 UFC/mL de *E. coli* ATCC® 25922).
- Transferir as suspensões bacterianas fornecidas, para tubos do espectrofotômetro (cubeta), fazendo-se em seguida a leitura da absorbância (DO), usar solução salina estéril para ajustar a absorbância.
- Após determinado a absorbância de 0,08 a 0,10, retirar 0,1ml suspensão do tubo mãe e transferir para um ependorf, acrescentar 0,9mL de salina(diluição 1:10), homogeneizar no vortex. Repetir o procedimento por 5 vezes ou 6 vezes, a partir do 4°, do 5° e 6° ependorf retirar 0,1mL para fazer plaqueamento nas placas de Petri contendo NA pelo método de espalhamento por superfície com alça de “Drigalsk”. Incubar as placas por 24 horas, a 28°C, contar o número de colônias, repetir a contagem com 48h.

Resultados: a) Escolher as placas que apresentarem entre 30 a 300 colônias e realizar a contagem de colônias de cada placa. Tirar a média do número de colônias/placa e multiplicar pelo fator da diluição. O resultado deverá ser expresso em UFC.mL⁻¹; b) Correlacionar a leitura da DO com a contagem em placas e lâmina; c) Observar o crescimento e a formação de biofilme nos tempos de 18h, 24h, 48h e 72h.

Lelliott & Stead (1987) assumem que, a 600nm, 108-109 c.f.u./ml correspondem a uma absorbância de 0,3-0,4.

ANEXO II - PROTOCOLOS

b) Biologia Molecular

SOLUÇÕES ESTOQUES BIOLOGIA MOLECULAR

TRIS- HCl

1 M Tris-HCl (100 ml)

Dissolver 121,1 g de Tris base em 800 ml de água. Ajustar o pH para o valor desejado adicionando o volume adequado de HCl concentrado:

pH	HCl
7,4	70 ml
7,6	60 ml
8,0	42 ml

O pH de Tris depende muito de temperatura e é recomendável aguardar a solução esfriar antes do ajuste final. Ajuste o volume para 1 litro e autoclavar. Armazenar a temperatura ambiente.

NaCl - Peso molecular para:

250mm	1L – 58,44g (1M)
	100mL – 5,84

Coloca em 100mL de H₂O miliq autoclavada e mistura.

5 M NaCl (100 ml)

Dissolver 29,2 g de NaCl em 80 ml de água. Ajustar o volume para 100 ml, dispensar em alíquotas e autoclavar.

EDTA - Peso molecular para:

1M EDTA (pH= 8,0)	1L – 372,24g
25mm	100mL – 37,22

Coloca em 80mL de H₂O miliq autoclavada, corrige o PH com NaOH 10% para 8,0 e completa para 100mL.

0,5M EDTA (pH 8,0) (100 ml)

Adicionar 93,05 g de Na₂EDTA.2H₂O a 400 ml de H₂O. Agitar bastante no agitador magnético. Ajustar o pH para 8,0 com pastilhas de NaOH (cerca de 10 g de NaOH), e completar o volume. Esterelizar por autoclavagem e armazenar na geladeira. Obs. O Na₂EDTA não dissolve enquanto o pH não estiver próximo de 8,0 pela adição de NaOH.

SDS (5%) – $\frac{\text{Peso}}{\text{Volume}} = \frac{5\text{g}}{100\text{ml}}$ → NÃO AUTOCLAVAR

10% SDS (sulfato dodecil de sódio) (100 ml)

Dissolver 10 g de SDS em 90 ml de água destilada. Aquecer a solução até 68°C para ajudar a dissolução. Ajustar o volume para 100 ml. USAR MÁSCARA AO MANIPULAR SDS. Não é necessário esterelizar e armazenar a a 4°C.

Tampão de extração

Estoque para 100 mL

20 mL de Tris-HCl 1M

25 mL de NaCl 1M

2,5 mL de EDTA 1M OBS: solução estoque à 0,5 M → 5,0 mL

10 mL de SDS 5%

Completa com 42,5 mL de H₂O miliq autoclavada.

Se EDTA estiver a 0,5M completa com 40mL de H₂O miliq autoclavada.

OBS cálculos feitos com a fórmula $C_1.V_1 = C_2.V_2$

3 M Acetato de potássio, pH 5,5 (100 ml)

Preparar uma solução 5 M de acetato de potássio, dissolvendo 49,1 g de acetato de potássio em 50 ml de água, e completar o volume até 100 ml. Usar 60 ml dessa solução 5 M de acetato de potássio, e adicionar 11,5 ml de ácido acético glacial e 28,5 ml de água. Não precisa esterelizar, e armazenar a 4°C.

3 M Acetato de Sódio (100 ml)

Dissolver 40,81 g de acetato de sódio em 80 ml de água. Ajustar o pH para 5,2 usando ácido acético glacial. Ajustar o volume para 100 ml, e esterilizar em autoclave.

1 M NaOH (100 ml)

Fazer estoque 1 M, dissolvendo 4 g de NaOH em 100 ml de água estéril.

50 x TAE (Tris acetato) (100 ml)

por litro

242 g Tris base

57,1 ml de ácido acético glacial

100 ml de 0,5 M EDTA (pH 8,0)

Concentração de uso: 40 mM Tris-acetato

(1 X) 1 mM EDTA

5 x TBE (Tris borato) (100 ml)

por litro

54 g Tris base

27,5 g ácido bórico

20 ml de 0,5 M EDTA (pH 8,0)

Concentração de uso: 45 mM Tris-borato

(0,5 X) 1 mM EDTA

TE pH 8,0 (50 ml)

10 mM Tris HCl (pH 8,0)

1 mM EDTA (pH 8,0)

Armazenar a temperatura ambiente.

1 M Glicose

Preparar essa solução dissolvendo 18 g de glicose em 90 ml de água destilada, dissolver, ajustar o volume para 100 ml com água destilada, e esterelizar por filtração através de filtro de 0,22 µm.

1 M CaCl₂

Dissolver 29,4 g de CaCl₂.2H₂O em 200 ml de água mQ, e esterelizar a solução por filtração, e conserve congelado. Para preparação de células competentes, derreter uma alíquota e diluir para 100 ml em H₂O mQ, e esterelizar por filtração, e resfrie a 0°C.

2 M MgCl₂

Dissolver 40,7 g de MgCl₂.6H₂O em 70 ml de água destilada, ajustar o volume para 100 ml com água estéril e autoclavar por 20 minutos.

PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA

Preparação do microrganismo:

- Crescimento em caldo:

Em eppendorfs de 2mL autoclavados, colocar 1mL de meio TY em cada eppendorf (com a ponteira autoclavada, sob fluxo laminar e atrás da chama), flambar a alça de platina, retirar uma colônia isolada do meio sólido, dispersar no caldo TY.

Marca devidamente os eppendorfs;

Prende no suporte e incubar no shaker (agitador orbital com temperatura controlada), sob agitação de 180 rpm, a 28°C (ou a temperatura ótima de crescimento do microrganismo), por 24 horas (ou temperatura ótima de crescimento do microrganismo). OBS: PARA MICRORGANISMO FORMADOR DE EPS INCUBAR POR TEMPO MENOR, 12h por exemplo)

- Crescimento em placa:

Sob fluxo laminar e atrás da chama, flambar a alça de platina, retirar uma colônia isolada do meio sólido, plaquear no ágar TY, incubar a 28°C (ou a temperatura ótima de crescimento do microrganismo), por 24 horas (ou temperatura ótima de

crescimento do microrganismo. OBS: PARA MICRORGANISMO FORMADOR DE EPS INCUBAR POR TEMPO MENOR, 12h por exemplo).

Extração do DNA:

Colocar a cultura cultivada em caldo TY na centrífuga por 7 min, a 13.000 rpm, para concentrar as células, descartar o sobrenadante;

Acrescenta 400 µL de **Tampão de extração de Gileno** (tris HCl pH 8,0 200mM, EDTA 250 mM, NaCl 1,5M, SDS 2,0%, CTAB 1%) (OBS.: agitar o tampão antes de retirar a alíquota, pois é uma suspensão – precipitada),

(Se a cultura for em meio sólido colocar 400 µL do **Tampão de extração** sobre as colônias, raspar com uma alça de platina flambada e retirar com pipeta e transferir para um eppendorf de 2mL)

Homogeneizar no vórtex, incubar a 65°C, por 40 minutos, invertendo 10 vezes o eppendorf a cada 5 minutos.

Adicionar 200 µL de **Acetato de Potássio 3M** e homogeneizar a mão umas 40 vezes, centrifugar a 13.000 rpm por 5 min.

Transferir o sobrenadante para um **novo tubo**.

Novo tubo: adicionar o mesmo volume (600 µL) de **Fenol/Clorofórmio/ álcool isoamílico (25:24:1)**, (na capela) homogeneiza no vórtex e centrifuga a 13.000 rpm por 15 min. Retirar o sobrenadante e transferir para **Outro Tubo** (550 µL) (até a linha no meio do tubo, sem tocá-la)

Repetir a operação.

Novo tubo: adicionar (600 µL) de **Clorofórmio/ álcool isoamílico (24:1)**, (na capela) homogeneiza no vórtex e centrifuga a 13.000 rpm por 15 min. Retirar o sobrenadante e transferir para **Outro Tubo** (500 µL) (até a linha no meio do tubo, sem tocá-la)

Acrescentar 25% do volume de **Acetato de amônia 10M** e 75% de **Isopropanol**.

$$\text{Cálculo p/ 500 } \mu\text{L} \quad 0,25 \times 500 = 125$$

$$0,75 \times 500 = 375$$

Incubar os tubos por 40 min, a – 20 °C (para precipitação do DNA);

Centrifugar a 12.000 rpm por 15 min. Descartar o sobrenadante e lavar o precipitado com **Álcool 70%** gelado (200 µL de álcool) e centrifuga 5 min a 12.000 rpm. Repetir por 3 vezes. (OBS.: retirar o álcool com a pipeta, colocando o tubo inclinado do lado contrário onde o pellet está preso - coloca a aba de abertura p/ dentro e pegar com a pipeta do outro lado p/ não pegar o DNA).

Depois da lavagem, secar o DNA a temperatura ambiente (na capela) aprox. 30 min e ressuspender em 60 µL de **água mili q** (ou TE ou TE super baixo) e armazenar a -20°C (congelador).

Material para extração de DNA

- 1- Tampão de extração
 - 2- Acetato de Potássio 3M
 - 3- Fenol/clorofórmio/ álcool isoamílico 25:24:1
 - 4- Clorofórmio/ álcool isoamílico 24:1
 - 5- Acetato de Amônia 10M
 - 6- Isopropanol
 - 7- Álcool 70%
 - 8- Água mili q
- ❖ Ponteiras de 100-1000 µL, e de 10-100 µL
Ependorfs autoclavados e pipetas.

PCR

(Reação em Cadeia da Polimerase)

- Vê a quantidade a depender do n^o de tubos (multiplica por tubos);
- Usar luvas em todo o processo,
- Manter todos os reagentes no gelo
- Descongelar e homogeneizar em vortex antes de tirar a alíquota
- Coloca primeiro a água no **MIX**
- Depois os outros reagentes na ordem que segue;

- TAQ por último no Mix
- Tubo separado: parte do mix e mais o DNA;
- TAQ deve ser posto e conservado na geladeira.
- Coloca no termociclador por 35 ciclos (programa ALEX 16s, para o primer fD1 e rD2):
 - 94°C por 1 min para desnaturação;
 - 62°C por 1 min para anelamento;
 - 72°C por 2 min para extensão;
- Para o primer f27 e r1525 utilizar o programa programa Ana f27
- Após a amplificação retirar uma alíquota de 5 µL de cada microtubo + 2 µL de azul de bromofenol correr em eletroforese com Gel de Agarose a 1% por 30 min a 80V.

OBS: Observar se os componentes para o Mix estão totalmente descongelados;

Como foram 10 µL e já tinha 2 de DNA nos tubos, só precisa colocar 8 do Mix em cada ependorf.

PCR - Reação em cadeia da Polimerase

Reagentes	[final]	50 (microlitros)	Mix (n amostras)
Água miliq		qsp 50microL	
Tampão Taq (10x)	1x	5	
MgCl2 (25mM)	2mM	4	
dNTPs (10mM)	0,25mM	1,25	
Primer F (10mM) - fD1	0,2nM	1	
Primer R (10mM) - rD2	0,2nM	1	
Taq-polimerase (5u/microlitros)	0,03	0,3	
DNA (amostra)	10ng-5ng/microlitro		
Total		50	

número de amostras 7

Para calcular o volume a ser aliquotado do DNA amostra: $C1V1=C2V2$, onde concentração 1 = concentração lida n
C2 = a concentração padrão (geralmente 8 nanograma/microlitro) e V2 = é o volume final (50microlitros)

OBS.As concentrações podem ser alteradas de acordo com a reação e com os fabricantes dos reagentes.

Preparação do Gel à 1%

- | | |
|-----------------------|-------|
| ➤ Agarose 1% | 0,5 |
| ➤ Tampão 99% (TAE 1X) | 50 mL |

- Coloca no elemayer a agarose, depois o tampão, leva ao microondas por aprox. 2 min.
- Tira do microndas e coloca 1 μ L de Brometo de Etídio e coloca na cuba.
- Espera 20 min. para polimerizar.
- Mistura as amostras com o marcador e põe na cuba, deixando o 1 poçinho para o marcador (DNA + marcador) e põe os outros na ordem que segue;
- Deixa correr aproximadamente 20 minutos.

ANEXO II - PROTOCOLOS

c) Microscopia eletônica

Solução K4 – Karnovski modificado

Glutaraldeído 2%

Paraformaldeído 2%

Tampão cacodilato de sódio 0.05M

Modo de preparo

Paraformaldeído 25% ----- 10mL

Glutaraldeído 25% ----- 10mL

Tampão fosfato de sódio ou cocodilato de sódio 0,125M --- 80mL.

Protocolo para Microscopia Eletrônica de Varredura

1. Crescimento das amostras:

a) 1º cultivo: As linhagens foram repicadas em ágar nutriente (NA), pH 6,8, por estrias compostas, após 22 – 26h de incubação, a 28°C,

b) 2º cultivo: foi retirado um inóculo de uma colônia isolada do 1º cultivo e transferido para um ependorf com 1mL de caldo nutriente (CN) pH 6.8 e incubado por 22 – 26h, a 28°C, a 180rpm de aeração.

b) 3º cultivo: Foram recortados discos PVDA Milipore® de 5mm de diâmetro, esterilizados em calor seco a 130°C por 1h e 30'. Os discos estéreis foram colocados sobre as placas com meio de cultura sólido do estudo (meio mínimo mineral- MMM, MMM + 2% de glicose, MMM + 2% de galactose e NA). Foi colocado 5 microlitros do caldo de cada isolado sobre os respectivos discos (linhagens utilizadas: RIZO 2, RIZO 11, RIZO 35, SLIM 03, SLIM 04, SLIM 17 e MRBS 12). Posteriormente incubadas por 24h, a 28°C.

(Foi usado apenas 2% da fonte de carbono para visualizar melhor a formação do biofilme em uma camada delgada)

2. Preparação da amostra para observação no MEV.

OBS: Dentre as amostras preparou-se também uma membrana estéril, totalizando 16 amostras.

2.1. Fixação

Amostras foram fixadas em solução K4 – Karnovski modificado, (glutaraldeído 2%, paraformaldeído 2% em tampão cacodilato de sódio 0.05M)

solução K4 – Karnovski modificado para MEV – modo de preparo

Paraformaldeído 25% ----- 10mL

Glutaraldeído 25% ----- 10mL

Tampão fosfato de sódio ou cacodilato de sódio 0,125M --- 80mL.

Amostras serão fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,05M, pH 7,2, ou em Karnovski modificado (glutaraldeído 2%, paraformaldeído 2% em tampão cacodilato de sódio 0.05M). As amostras foram fixadas durante 8h.

2.2. Desidratação

Após fixação as amostras são transferidas para cápsulas de silicone e serão desidratadas em banhos de série crescente de concentração de soluções de acetona em água destilada (50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% e 100%) por 10 min cada um.

2.3. Ponto crítico

Passa-se pelo ponto crítico – no qual retirará todo o líquido da amostra. Usar acetona PA

Equipamento: Critical Point Dry; modelo CPD 030; Marca Balzers

2.4. Montagem dos *stubs*

Posteriormente serão montadas em pequenos cilindros de aço (*stubs*) com fita adesiva metálica

2.5. Metalização

Os *stubs* com as amostras serão recobertos com ouro em "*sputtering*" Balzers.

Equipamento: sputter coater, modelo SCD 050; marca Balzers

3. Observação em microscópio eletrônico de varredura (MEV)

As amostras preparadas foram analisadas e fotografadas no MEV no Laboratório de Biologia da UEFS.

Equipamento: Microscópio eletrônico de varredura; modelo LEO 1430VP; marca Zeiss.

d) Testes de rizobactérias em plantas

Protocolo de Inóculo de Rizobactérias para Inoculação em Raiz.

- Retirar inóculo de colônia isolada,
- Transferir para eppendorf com 1mL de caldo nutriente ou para erlenmeyer com 20mL do meio. Incubar sob aeração a 180rpm, por 24h, a 28°C.
- Centrifugar 1mL em eppendorf, por 5 minutos, a 4000rpm.
- Desprezar o sobrenadante, acrescentar 1mL de solução salina estéril (NaCl 0,85%), agita em vortex, centrifugar por 5 minutos a 4000rpm, desprezar o sobrenadante (visa eliminar a maior parte possível de componentes do meio de cultura associado de alguma forma às células bacterianas a serem usadas como inóculo),
- Acrescentar 1mL de NaCl 0,85%, agita em vortex,
- Proceder leitura no espectrofotômetro com comprimento de onda de 600nm para verificar a concentração celular e anotar a % da absorbância encontrada.
- Proceder diluição seriada da suspensão bacteriana até obter uma suspensão entre 0,010 a 0,008 de absorbância, equivalente a um inóculo de 1×10^7 UFC/mL.

Protocolo para desinfestação e inoculação em sementes (*L. esculentum*)

1. Triagem das sementes:

As sementes são colocadas em uma placa de petri e contadas manualmente (n° necessário para o experimento e mais 10 unidades)

2. Material a ser autoclavado:

- Becker de 50mL
- Pinça

- 100mL de água destilada
- Ponteira de 1000 μ L
- Placa de petri grande com papel filtro
- Meio de germinação (MS/2) (MURASHIGE & SKOOG, 1962), magentas (ou recipiente do cultivo)
- Peneira

3. Material não autoclavado:

- Bagueta
- Agitador magnético
- Becker para descarte (500mL)
- Tubo de ensaio com álcool à 96%

4. Soluções:

- 50mL de Hipoclorito de sódio 2,5% (v/v) + Tween-20 a 0,1% (v/v) [o hipoclorito comercial é a 2,5%, + 4 gotas do Tween-20]
- 50mL de Álcool a 70%

5. Desinfestação e inoculação:

Colocar as sementes no Becker previamente autoclavado, e adicionar a solução de etanol a 70% e agitar por 1 minuto, desprezar a solução e adicionar a solução de hipoclorito + Tween, agitar vigorosamente por 15 minutos. Descartar a solução e lavar 4 vezes com água destilada estéril por 2 minutos sob agitação cada uma.

As sementes podem ser espalhadas em uma placa de petri com papel filtro para secagem.

Fazer a inoculação nos meios de germinação (MS/2) com auxílio de uma pinça flambando-a no mínimo 3 vezes (5 sementes/ tubo de ensaio). Os tubos são

vedadas com filme e levadas para a sala de crescimento. Incubadas à temperatura de $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, sob irradiância de 60 a $70 \mu\text{moles m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 16 horas de fotoperíodo.

**Protocolo para desinfestação e inoculação de sementes (*Lactuca solanum*)
(cultivar Elba/Crespa) (Stop Seed Premium)**

1. Triagem das sementes:

As sementes são colocadas em uma placa de petri e contadas manualmente (nº necessário para o experimento e mais 10%)

2. Material a ser autoclavado:

- Becker de 50mL
- Pinça
- 100mL de água destilada
- Ponteira de 1000 μL
- Placa de petri grande com papel filtro
- Meio de germinação (MS/2) (MURASHIGE & SKOOG, 1962), magentas (ou recipiente do cultivo)
- Peneira

3. Material não autoclavado:

- Bagueta
- Agitador magnético
- Becker para descarte (500mL)
- Tubo de ensaio com álcool à 96%
- Lamparina

4. Soluções:

- 50mL de Hipoclorito de sódio 2,5% (v/v) + Tween-20 a 0,1% (v/v) [o hipoclorito comercial é a 2,5%, + 4 gotas do Tween-20]
- 50mL de Álcool a 70%

5. Desinfestação e inoculação:

No fluxo laminar proceder:

Colocar as sementes no Becker previamente autoclavado, e adicionar a solução de etanol a 70% e agitar por 1 minuto, desprezar a solução e adicionar a solução de hipoclorito + Tween, agitar vigorosamente por 10 minutos. Descartar a solução e lavar 4 vezes com água destilada estéril por 2 minutos sob agitação cada uma.

As sementes podem ser espalhadas em uma placa de petri com papel filtro para secagem.

Próximo à chama, fazer a inoculação nos meios de germinação (MS/2) com auxílio de uma pinça flambando-a no mínimo 3 vezes (8 sementes/ magenta). As magentas (Sigma Chemical Company, EUA) são vedadas com filme e levadas para a sala de crescimento. Incubadas à temperatura de $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, sob irradiância de 70 a 80 $\mu\text{moles m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 16 horas de fotoperíodo.

Protocolo de Micropropagação de Tabaco (*Nicotiana tabacum*)

1. Triagem das plântulas:

As plântulas micropropagadas de *Nicotiana tabacum* com 30 dias de inoculada.

2. Material a ser autoclavado:

- Becker de 50mL

- Pinça
- 100mL de água destilada
- Placa de petri grande com papel filtro
- Meio de crescimento MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) em magentas (ou recipiente do cultivo)
- Bisturi

3. Material não autoclavado:

- Becker para descarte (500mL)
- Tubo de ensaio com álcool à 96%
- Algodão
- Lamparina

4. Soluções:

- Álcool a 70%

5. Secção e inoculação:

Retirar as plântulas da magenta e transferi-las para as placas com o papel filtro (previamente autoclavado) umectado com água estéril. Com bisturi estéril retirar as folhas e raízes e desprezar, seccionar o caule em pedaços de aproximadamente 1cm .

Com pinça estéril inocular um segmento por magenta ou recipiente com meio de cultivo MS. As magentas (Sigma Chemical Company, EUA) são vedadas com filme e levadas para a sala de crescimento. Incubadas à temperatura de $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, sob irradiância de 24 a $36 \mu\text{moles m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 16 horas de fotoperíodo.

Protocolo do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da UESC para Preparação do Meio MS

Condição	Sais	g.L ⁻¹
Macronutrientes (50X) (Armazenar em geladeira)	NH ₄ NO ₃	82,5
	KNO ₃	95,0
	MgSO ₄ .7H ₂ O	18,5
	KH ₂ PO ₄	7,5
	K ₂ HPO ₄	1,0
Micronutrientes (100X) (Armazenar em geladeira)	H ₃ BO ₃	0,62
	MnSO ₄ .4H ₂ O	1,68
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,86
	KI	0,083
	Na ₂ MoO ₄ .H ₂ O	0,025
	CuSO ₄ .5H ₂ O (2,5mg/mL)	1,0mL
	CoCl ₂ .6H ₂ O (2,5mg/mL)	1,0mL
Ferro (200X)	Na ₂ .EDTA	7,45
	FeSO ₄ .7H ₂ O	5,57
Vitaminas (100X) (Armazenar em geladeira)	TIAMINA.HCl	1,0
	PIRIDOXINA.HCl	1,0
	ÁC.NICOTÍNICO	0,5
	GLICINA	0,2
Cálcio (66X)	CaCl ₂ .H ₂ O	29,33

Modo de preparo

Ms Macronutrientes (50X)

Em um erlenmeyer de 1000mL, adiciona-se aproximadamente 500mL de H₂O destilada. Acomoda-se em um agitador magnético e sob agitação constante adicionam-se os reagentes devidamente pesados em balança analítica. Após a dissolução total dos reagentes, transfere-se o conteúdo do erlenmeyer para uma proveta de 1000mL e completa-se o volume com água destilada até o volume desejado. A solução deve ser devidamente armazenada em frasco âmbar em geladeira, devidamente etiquetada com o nome da solução, data do preparo e nome de quem preparou.

MS Micronutrientes (100X)

Em um erlenmeyer de 500mL adiciona-se aproximadamente 250mL de água destilada. Acomoda-se em um agitador magnético e sob agitação constante adicionam-se os reagentes devidamente pesados em balança analítica. Após a dissolução total dos reagentes, transfere-se o conteúdo do erlenmeyer para uma

proveta de 500mL e completa-se o volume com água destilada. A solução deve ser devidamente armazenada em frasco âmbar em geladeira, devidamente etiquetada.

MS Ferro (200X)

Em um erlenmeyer de 500mL adiciona-se aproximadamente 450mL de água destilada. Acomoda-se em um agitador magnético e sob agitação constante e adiciona o Na₂EDTA e dissolve-o completamente, adicionar o FeSO₄.H₂O. Após a dissolução total, transfere-se o conteúdo do erlenmeyer para uma proveta de 500mL e completa-se o volume com água destilada. A solução deve ser devidamente armazenada em frasco âmbar em geladeira, devidamente etiquetada.

MS Vitaminas (100X)

Em um erlenmeyer de 500mL adiciona-se aproximadamente 450mL de água destilada. Acomoda-se em um agitador magnético e sob agitação constante adicionam-se os reagentes devidamente pesados em balança analítica. Após a dissolução total dos reagentes, transfere-se o conteúdo do erlenmeyer para uma proveta de 500mL e completa-se o volume com água destilada. A solução deve ser devidamente armazenada em frasco âmbar em geladeira, devidamente etiquetada.

Cálcio (66X)

Em um erlenmeyer de 1000mL, adiciona-se aproximadamente 500mL de H₂O destilada. Acomoda-se em um agitador magnético e sob agitação constante adicionam-se o reagente devidamente pesado em balança analítica. Após a dissolução total, transfere-se o conteúdo do erlenmeyer para uma proveta de 1000mL e completa-se o volume com água destilada até o volume desejado. A solução deve ser devidamente armazenada em frasco âmbar em geladeira, devidamente etiquetada.

	Meio MS	Meio MS/2
Macronutrientes (50X)	20mL/L	10 mL/L
Micronutrientes (100X)	10 mL/L	5 mL/L
Vitaminas (100X)	10 mL/L	5 mL/L
Cálcio (66X)	15 mL/L	7,5 mL/L

Ferro (200X)	5 mL/L	2,5 mL/L
Mio-inositol	100mg/L	50 mg/L
Sacarose	30g/L	25g/L
Ágar	7g/L	7g/L
Água destilada q.s.p.	1L	1L

Ajustar pH para 5,70

APENDICE

RESULTADOS DAS CARACTERIZAÇÕES MACRO E MICROMORFOLÓGICAS e TINTORIAIS

Capítulo 1.

Tabela1. Caracterização das linhagens Meio MMM + fonte de carbono, 48h, 28°C

Bactéria	Fonte de carbono (0,1%)			Fonte de carbono (2%)			Fonte de carbono (10%)			
	Forma	Elevação	Margem	Forma	Elevação	Margem	Forma	Elevação	Margem	
SLIM 03	Glicose	Circular	Convexa	Inteira	Circular (0)	Convexa (0)	Inteira (0)	Circular	Convexa	Inteira
	Galactose	Puntiforme	Convexa	Inteira	Puntiforme (1)	Umbilicada (1)	Inteira (0)	Puntiforme	Umbilicada	Inteira
SLIM 04	Glicose	Irregular	Monticular	Lobada	Irregular (2)	Monticular (2)	Lobada (1)	Irregular	Monticular	Lobada
	Galactose	Irregular	Monticular	Lobada	Irregular (2)	Monticular (2)	Lobada (1)	Irregular	Monticular	Lobada
MRBS 12	Glicose	Rizóide	Elevada	Ondulada	Rizóide (3)	Elevada (3)	Ondulada (2)	Rizóide	Elevada	Ondulada
	Galactose	Puntiforme	Elevada	Ondulada	Puntiforme (1)	Elevada (3)	Ondulada (2)	Puntiforme	Elevada	Ondulada

Tabela 2. Caracterização das linhagens em diferentes meios

Bactéria	Meio sólido	0,2%	2%	10%
SLIM 03	MM + glicose	48h, (-), ♠, ★	24h, (+), ♠, ★	24h, (+), ♠, ★
	MM + galactose	24h, (-), ●, ★	24h, (+), ●, ★	24h, (+), ●, ★
	Glicose	48h, (-), ♠, ★	48h, (-), ♠, ★	48h, (-), ♠, ★
	Galactose	48h, (-), ♠, ★	24h, (-), ♠, ★	48h, (+), ♠, ★
SLIM 04	MM + glicose	24h, (-), ♠, ☾	48h, (+), ♠, ☾	24h, (+), ♠, ★
	MM + galactose	24h, (-), ●, ☾	24h, (-), ●, ★	24h, (+), ●, ★
	Glicose	Sem crescimento	48h, (-), ●, ☾	Sem crescimento
	Galactose	24h, (-), ●, ★	24h, (-), ●, ★	24h, (-), ●, ★
MRBS 12	MM + glicose	48h, (-), ●, ☾	48h, (-), ●, ☾	24h, (-), ●, ☾
	MM + galactose	48h, (-), ●, ☾	24h, (-), ●, ☾	24h, (-), ●, ☾
	Glicose	48h, (-), ●, ☾	48h, (-), ●, ☾	24h, (-), ●, ☾
	Galactose	48h, (-), ●, ☾	24h, (-), ●, ☾	24h, (-), ●, ☾

Legenda: 24h (0) , 48h (1), 72h (2); sem viscosidade (-) (0), com viscosidade (+) (1); branca ● (0), amarelada ♠ (1), creme ◆ (2); brilhosa ★ (0), opaca ☾ (1).

Tabela 3. Classificação micromorfológica e tintoriais.

Linhagem	Identificação	Gram	Micromorfologia	Cápsula	Tamanho comprimento (µm)	Tamanho espessura (µm)
SLIM 03	<i>Pseudomonas sp.1</i> (0)	Negativa (0)	Bacilos curtos (0)	Ausente (0)	1,0	0,5
SLIM 04	<i>Pseudomonas sp.2</i> (0)	Negativa (0)	Bacilos curtos (0)	Ausente (0)	2,5	0,6
MRBS 12	<i>Alcaligenes faecalis</i> (1)	Negativa (0)	Bacilos curtos (0)	Ausente (0)	0,7	< 0,5

Capítulo 2.

Tabela 1. Caracterização das linhagens Meio MMM com fonte de carbono, 48h, 28°C

Bactéria	Fonte de carbono (0,1%)				Fonte de carbono (2%)			Fonte de carbono (10%)		
	Forma	Elevação	Margem		Forma	Elevação	Margem	Forma	Elevação	Margem
SLIM 17	Glicose	Irregular	Umbilicada	Lobada	Irregular (2)	Umbilicada (1)	Lobada (1)	Irregular	Umbilicada	Lobada
	Galactose	Irregular	Umbilicada	Lobada	Irregular (2)	Umbilicada (1)	Lobada (1)	Irregular	Umbilicada	Lobada
RIZO 02	Glicose	Irregular	Monticulada	Ondeada	Irregular (2)	Monticulada (2)	Ondeada (3)	Irregular	Monticulada	Ondeada
	Galactose	Irregular	Monticulada	Ondeada	Irregular (2)	Monticulada (2)	Ondeada (3)	Irregular	Monticulada	Ondeada
RIZO 11	Glicose	Irregular	Montoculada	Lobada	Irregular (2)	Montoculada (2)	Lobada (1)	Irregular	Montoculada	Lobada
	Galactose	Puntiforme	Montoculada	Lobada	Puntiforme (1)	Montoculada (2)	Ondeada (3)	Puntiforme	Montoculada	Ondeada
RIZO 35	Glicose	Irregular	Montoculada	Ondeada	Irregular (2)	Montoculada (2)	Ondeada (3)	Irregular	Montoculada	Ondeada
	Galactose	Irregular	Montoculada	Ondeada	Irregular (2)	Umbilicada (1)	Ondeada (3)	Irregular	Montoculada	Ondeada

Tabela 2. Caracterização das linhagens em diferentes meios

Bactéria	Meio sólido	0,2%	2%	10%
SLIM 17	MM + glicose	24h, (-), ♦, ℄	24h, (+), ♦, ℄	24h, (+), ♦, ℄
	MM + galactose	48h, (-), ♦, ℄	48h, (-), ♦, ★	24h, (+), ●, ★
	Glicose	24h, (-), ♦, ℄	48h, (-), ♦, ℄	72h, (+), ♦, ℄
	Galactose	48h, (-), ♦, ℄	48h, (-), ♦, ℄	48h, (-), ♦, ℄
RIZO 02	MM + glicose	24h, (-), ♦, ★	24h, (+), ♦, ★	24h, (+), ♦, ★
	MM + galactose	24h, (-), ♦, ★	48h, (-), ♦, ★	24h, (+), ♦, ★
	Ágar Glicose	48h, (-), ♦, ★	24h, (+), ♦, ★	48h, (+), ♦, ★
	Ágar galactose	24h, (-), ♦, ★	24h, (-), ♦, ★	24h, (-), ♦, ★
RIZO 11	MM + glicose	24h, (+), ♠, ★	24h, (+), ♠, ★	24h, (+), ♠, ★
	MM + galactose	24h, (-), ♠, ★	24h, (+), ♠, ★	24h, (+), ♠, ★
	Glicose	24h, (-), ●, ★	24h, (-), ●, ★	Sem crescimento
	Galactose	48h, (-), ●, ★	48h, (-), ♠, ★	48h, (-), ♠, ★
RIZO 35	MM + glicose	24h, (+), ♠, ★	24h, (+), ♠, ★	24h, (+), ♠, ★
	MM + galactose	24h, (-), ♠, ★	24h, (+), ♠, ★	24h, (+), ♠, ★
	Glicose	48h, (-), ♠, ★	24h, (+), ♠, ★	24h, (+), ♠, ★
	Galactose	24h, (-), ♠, ★	24h, (+), ♠, ★	24h, (+), ♠, ★

Legenda: 24h (0) , 48h (1), 72h (2); sem viscosidade (-) (0), com viscosidade (+) (1); branca ● (0), amarelada ♠ (1), creme ♦ (2); brilhosa ★ (0), opaca ℄ (1).

Tabela 3. Classificação micromorfológica e tintoriais.

Linhagem	Identificação	Gram	Micromorfologia	Cápsula	Tamanho comprimento (µm)	Tamanho espessura (µm)
SLIM 17	<i>Bacillus sp.1</i> (0)	Positiva (1)	Bacilos (1)	Ausente (0)	2,5	0,5
RIZO 02	<i>Bacillus sp.2</i> (0)	Positiva (1)	Bacilos (1)	Presente (1)	2,0 (com cápsula 3,0)	0,5 (com cápsula 1,5)
RIZO 11	<i>Bacillus sp.3</i> (0)	Positiva (1)	Bacilos (1)	Presente (1)	2,5 (com cápsula 4,0)	0,5 (com cápsula 2,5)
RIZO 35	<i>Bacillus sp.4</i> (0)	Positiva (1)	Bacilos (1)	Presente (1)	2,0 (com cápsula 3,0)	0,5 (com cápsula 1,0)

Feira de Santana, 29 de maio de 2009.