



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS MOLECULARES

**“CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA E GENÉTICA DE
BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE ARROZ (*Oryza sativa*).”**

LÍVIA FABIANA BRAGA

Anápolis, 2012

LÍVIA FABIANA BRAGA

**“CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA E GENÉTICA DE
BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE ARROZ (*Oryza sativa*).”**

Dissertação de Mestrado apresentada à Banca Examinadora, do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Moleculares, da Universidade Estadual de Goiás, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química Orgânica.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Cláudia Cristina Garcia Martin Didonet.

Anápolis, 2012

AGRADECIMENTOS

- À Professora Dr^a. Claudia Cristina Garcia Martin Didonet, que além da orientação desse trabalho, é sinônimo de paciência e humildade, demonstrando que a formação de Mestres significa muito mais que bagagem científica. Deixo aqui meus sinceros agradecimentos por toda a sua contribuição intelectual, profissional e psicológica depositada durante o curso.
- Ao Professor Gilberto Lúcio, pela amizade e incentivo, sendo fundamental para a concretização deste sonho, pela dedicação, contribuindo significativamente para a formação de pesquisador, pautando sempre as barreiras a serem vencidas.
- Aos amigos do Laboratório de Microbiologia de Micro-organismos: Marcos, Ailton, Bruna e Thiago pela ajuda ao longo do curso. Em especial, ao meu amigo Fênix que foi mais que um irmão, com quem tive o privilégio de conviver, que me deu apoio todo esse tempo e me ajudou ao logo deste trabalho.
- Aos químicos: Francisco e Tarcísio pelo incentivo, amizade e paciência.
- Aos meus pais pelos eternos incentivos em todo o meu caminho.
- À CAPES pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES	viii
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	4
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
1. A Cultura de Arroz.....	5
2. Bactérias Promotoras de Crescimento em Plantas.....	6
2.1. Gênero <i>Pseudomonas</i>	7
2.2. Gênero <i>Bacillus</i>	8
2.3. Gênero <i>Xanthomonas</i>	9
3. Interação Planta Bactéria.....	9
4. Bactérias Produtoras de Fitohormônios.....	11
5. Micro-organismos Solubilizadores de Fosfatos.....	13
6. Bactérias Fixadoras de Nitrogênio.....	14
7. A importância de Técnicas Moleculares no Estudo de Diversidade.....	16
MATERIAIS E MÉTODOS	18
1. Material Biológico.....	18
2. Armazenamento e Manutenção das Bactérias.....	18
3. Caracterização Morfofisiológica.....	18
3.1. Caracterização Morfológica das Colônias Bacterianas.....	19
3.2. Teste de Motilidade.....	19
3.3. Coloração de Gram.....	19
3.4. Teste de Citrato.....	20
3.5. Teste de Urease.....	21

3.6. Teste de Redução de Nitrato.....	21
3.7. Teste de Protease.....	22
3.8. Teste de Crescimento em Fonte de Carbono.....	23
3.9. Teste de Catalase.....	23
3.10. Teste de Capacidade de Crescimento em Meio Livre de Nitrogênio.....	24
4. Caracterização Molecular.....	24
4.1. Extração do DNA.....	24
4.2. Análise do DNA Extraído e dos Fragmentos da PCR.....	25
4.3. Caracterização Genética por Análise da Região BOX-PCR.....	26
4.3.1. Análise dos Dados.....	26
4.4. Caracterização Genética por Análise da Região 16S rDNA.....	27
4.4.1. Amplificação do Gene 16S rDNA.....	27
4.4.2. Purificação do Amplificado do Gene 16S rDNA.....	28
4.4.3. Sequenciamento do DNA.....	28
4.4.4. Edição e Comparação em Banco de Dados.....	29
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
1. Caracterização Morfológica das Colônias Bacterianas.....	31
2. Teste de Motilidade.....	33
3. Coloração de Gram.....	33
4. Teste de Citrato.....	35
5. Teste de Urease.....	36
6. Teste de Redução de Nitrato.....	38
7. Teste de Protease.....	39
8. Teste de Crescimento em Fonte de Carbono.....	40
9. Teste de Catalase.....	43
10. Teste de Capacidade de Crescimento em meio livre de Nitrogênio.....	44
11. Caracterização Molecular dos Fragmentos de PCR da região BOX.....	48

12. Caracterização Molecular dos Fragmentos de PCR da região 16S rDNA.....	52
13. Sequenciamento do DNA.....	53
CONCLUSÕES.....	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
ANEXO I.....	73
ANEXO II.....	77
ANEXO III.....	19

LISTA DE ABREVIACÕES

AIA – ácido indol acético

BPCP - bactérias promotoras de crescimento em plantas

CO₂ - dióxido de carbono

DNA - ácido desoxirribonucleico

dNTPs - desoxirribonucleotídeos fosfatados

EDTA – *ethylenediamine tetraacetic acid*

FBN - fixação biológica de nitrogênio

g - gramas

H⁺ - íon hidrogênio

H₂O - água

H₂O₂ - peróxido de hidrogênio

ha - *hectare*

HCl - ácido clorídrico

kb - kilopares de bases

kg - kilogramas

KCl - cloreto de potássio

KNO₃ - nitrato de potássio

L - litros

M - mol

MgCl₂ - cloreto de magnésio

mL - mililitros

mM - milimolar

mm - milímetro

mmol - milimolar

N₂ - gás nitrogênio

NaCl - cloreto de sódio

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

ng - nanogramas

NH₃ - amônia

NH₄⁺ - íon amônio

nir- gene que codifica para a enzima redutase de nitrato

NO₂⁻ - íon nitrito

NO₃⁻ - íon nitrato

O₂ - oxigênio gasoso

P.A. - para análise

pb - pares de bases

PCR – *polymerase chain reaction*

pH - potencial hidrogeniônico

pmol - picomol

rDNA- DNA ribossomal

RNAse - ribonuclease

rpm - rotações por minuto

SDS - dodecil sulfato de sódio

sp.- várias espécies

spp.- espécie não determinada

TBE - tampão *tris/borate/EDTA*

ton/ha - toneladas por *hectare*

Tris - tris (hidroximetil) aminometano

UV - ultravioleta

V - volts

µg - micrograma

µL - microlitro

µM – micromol

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Visualização de bacilos gram-positivos e bacilos gram-negativos na técnica de coloração de gram em objetiva de imersão (100x).....	34
Figura 2: Identificação da atividade de citrato liase das bactérias isoladas de arroz em meio de cultura sólido Citrato de Simmons.....	35
Figura 3: Identificação da atividade de urease das bactérias isoladas de arroz em meio de cultura sólido Uréia Base.....	37
Figura 4: Formação de halo de degradação observado em meio Mínimo sólido acrescido de proteínas do leite 4% para os isolados positivos.....	39
Figura 5: Teste de catalase positivo, com formação de O ₂ (bolhas) para as bactérias isoladas de arroz.....	43
Figura 6: Teste de fixação biológica de nitrogênio com formação de película em meio de cultura semi-sólido NFB livre de nitrogênio das bactérias isoladas de arroz.....	45
Figura 7: Características bioquímicas das bactérias gram positivas.....	46
Figura 8: Perfil eletroforético dos 20 isolados bacterianos amplificados por PCR da região BOX (<i>primer</i> BOX A1R).....	48
Figura 9: Dendrograma definido pelo método de agrupamento UPGMA utilizando a coeficiente de similaridade de Jaccard com base nos fragmentos amplificados por BOX PCR de 20 bactérias isoladas de arroz.....	49
Figura 10: Dendrograma definido pelo método de agrupamento UPGMA utilizando a coeficiente de similaridade Jaccard da assimilação dos testes de fontes de carbono, das características bioquímicas e das características moleculares referente às 20 bactérias isoladas de arroz.....	51
Figura 11: Perfil eletroforético dos 20 isolados bacterianos amplificados por PCR da região 16S rDNA (<i>primers</i> Y1 e Y3).....	52

Figura 12: Dendrograma definido pelo método UPGMA (SNEATH, 1973) para a análise molecular filogenética de 15 isolados de plantas de arroz pelos dados de sequenciamento da região 16S rDNA comparados à 8 sequências de bactérias utilizados como grupos de comparação deste gene, disponíveis no banco de dados NCBI..... 56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características morfológicas de 20 bactérias isoladas de arroz, a partir da observação das colônias em meio solido King B.....	32
Tabela 2: Teste de crescimento bacteriano em 13 fontes de carbono.....	42
Tabela 3: Características bioquímicas de 20 bactérias isoladas de arroz...	47
Tabela 4: Bactérias isoladas de plantas de arroz, sequenciadas parcialmente para o gene 16S rDNA, e identificação por homologia com sequências deste gene para as bactérias contidas no banco de dados (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).....	54

RESUMO

O arroz no Brasil está entre os grãos mais cultivados, sendo o cereal mais consumido na dieta humana. As pesquisas de micro-organismos que proporcionem benefício ao crescimento do arroz protegendo o meio ambiente e com menor custo de produção é de grande importância. O objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização morfofisiológica e genética de vinte bactérias isoladas de arroz que posteriormente podem vir a ser usadas como bactéria promotora de crescimento de plantas (BPCP). Para o estudo foram observadas as características morfofisiológicas das colônias quanto à capacidade de utilização de 13 fontes de carbono e testes quanto à presença de enzimas (catalase, citrato liase, redutora de nitrato e urease). Também foi realizado a análise genética por PCR dos genes 16S rDNA e região BOX das 20 bactérias. Ainda foram sequenciados parcialmente o gene 16S rDNA de 17 bactérias. Os resultados de 15 bactérias foram analisados por similaridade utilizando o coeficiente de Jaccard. Pelos dados morfológicos foram observados 2 grupos para as bactérias estudadas. Pela análise de agrupamento utilizando os dados bioquímicos de utilização das fontes de carbono as bactérias foram agrupadas em 8 grupos. Quanto à presença das enzimas, todas foram catalase positivas, 45% das bactérias foram citrato positivas, 65% redutoras de nitrato, 20% urease positivas, 40% hidrolases de proteínas e 85% potenciais fixadoras biológicas de nitrogênio. Por estes resultados foi possível observar a grande diversidade metabólica das bactérias estudadas. Para a região BOX pode-se caracterizar 5 grupos entre os vinte isolados demonstrando a variabilidade genética das bactérias associadas à planta de arroz. Através da análise do sequenciamento do gene 16S rDNA foram caracterizados 3 gêneros com predominância do gênero *Bacillus sp.* nas bactérias estudadas. Esta caracterização poderá auxiliar na seleção de bactérias candidatas a serem utilizadas para inoculação em ensaios *in vitro* e a campo para a cultura do arroz no Cerrado goiano.

Palavras-chave: Arroz, Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal, Caracterização bioquímica e Caracterização molecular.

ABSTRACT

Rice is among the most cultivated cereals in Brazil. Besides, rice is the most important cereal in the human diet worldwide. Research projects with focus on beneficial micro-organisms to rice growth, providing environmental protection and allowing lower cost of production are of great importance. The objective of this study was to characterize genetic and morphophysiological twenty bacteria isolated from rice which can further be used as plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). In this study it were observed the morphological and physiological characteristics of the colonies regarding their capacity of utilization of thirteen carbon sources and the presence of enzymes (catalase, citrate lyase, nitrate reduction and urease). Genetic analyses of the 20 bacteria by BOX-PCR and 16S rDNA amplification were also performed. In addition, the partial sequencing of the 16S rDNA was also carried out for 17 bacteria. The results of 15 bacteria were analyzed by similarity clustering using the Jaccard coefficient. According to the morphological data it was observed the formation of 2 groups. Clustering analysis using the biochemical data based on carbon sources use by the bacteria showed the distribution of the bacteria into eight groups. According to the presence of enzymes, all bacteria were catalase positive, 45% citrate positive, 65% reducing nitrate, 20% urease positive, 40% hydrolases of proteins and 85% potential biological nitrogen-fixing. From these results it was possible to observe a great metabolic diversity among the studied bacteria. BOX-PCR results showed the distribution of the isolates into five groups showing the genetic variability of the bacteria associated with the rice plant. 16S rDNA sequencing analysis resulted in the description of three bacterial genera associated to rice plants, indicating the predominance of the genus *Bacillus* sp.. This characterization may assist in the selection of bacteria candidates to be used in trial assays under in vitro and field conditions for the crop of rice in of Goiás savanna.

Key-words: Rice, Plant Growth Promotion Rhizobacteria, Biochemical Characterization and Molecular Characterization.

INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa L.*) é um dos cereais mais cultivados no Brasil e está entre os três principais (arroz, milho e soja) que somados representam 91% da produção anual de grãos (IBGE, 2012), sendo considerado um dos alimentos mais consumidos no planeta.

O cultivo do arroz requer solos com grandes quantidades de nutrientes para seu crescimento, desenvolvimento e produção (CHOUDHURY & KENNEDY, 2004) e uma alternativa para o aumento da produtividade da cultura de arroz com qualidade ambiental se encontra na promoção do crescimento vegetal por micro-organismos associados à planta (MADIGAN *et al.*, 2010).

Dentre os micro-organismos que habitam a rizosfera das plantas, encontram-se as bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCP). Estas bactérias habitam a rizosfera podendo exercer uma influência positiva sobre o crescimento das plantas (FIGUEIREDO *et al.*, 2012). As plantas resultantes desse tipo de interação podem ser maiores, mais vigorosas, com maior produtividade e mais saudáveis (RADWAN, MOHAMED & REIS, 2004) devido à proteção microbiológica promovida pelas mesmas.

A promoção de crescimento vegetal por estes micro-organismos pode ser resultado tanto de ações indiretas, como o controle biológico por competição de nutrientes e indução de resistência sistêmica no hospedeiro (GRIGOLETTI, SANTOS & AUER, 2000), como de ações diretas, como disponibilização de nutrientes para a planta (ANANDHAM *et al.*, 2007), fixação de nitrogênio atmosférico (KUSS, 2006) e a produção de fitohormônios reguladores de crescimento vegetal (PEDERSOLI, 1967).

Em relação ao uso de inoculantes bacterianos, ainda são escassos os trabalhos com arroz, porém é consenso que as BPCP podem produzir efeitos positivos na promoção do crescimento vegetal (IKEDA, 2010).

Já foram isoladas de arroz BPCP pertencentes aos gêneros *Burkholderia* (GUIMARÃES *et al.*, 2000), *Azospirillum* (RODRIGUES *et al.*, 2000), *Rhizobium* (SILVEIRA, 2008) e *Sphingomonas* (VIDEIRA, 2008) no entanto a utilização desses micro-organismos como inoculantes ou na formulação de biofertilizantes ainda necessita de estudos detalhados, principalmente em condições de campo.

Para realização de projetos de melhoramento de plantas e produção de biofertilizantes deve-se levar em conta a necessidade de estudos prévios de seleção e caracterização genética dos micro-organismos associados às plantas que possam gerar benefícios no seu desenvolvimento e produtividade, antes de se pensar em projetos *in vitro* propriamente ditos (CRUZ; REDAZZI; CARNEIRO, 2004).

A partir do incremento das técnicas molecular como a utilização da reação em cadeia da polimerase – (PCR- *Polymerase Chain Reaction*), houve a geração de um alto conteúdo de informação, especialmente para comparações de parentais próximas, possibilitando que estirpes promotoras de crescimento vegetal possam ser analisadas, estudadas e avaliadas a fim de aprimorar cada vez mais o estudo da associação entre bactérias e gramíneas (MURRAY, GRANNER & RODWELL, 2007).

Assim, a identificação e caracterização destas bactérias fornecerão subsídios para o entendimento da interação bacteriana com os diferentes genótipos do arroz. E a partir deste entendimento visa-se estabelecer uma estratégia que beneficie tanto o manejo dos micro-organismos como

biofertilizantes, quanto à produção da cultura, pela associação dos microorganismos e o arroz.

OBJETIVOS

1. Objetivo Geral

Realizar a caracterização morfofisiológica e genética de vinte bactérias isoladas de arroz (*Oryza sativa L.*).

2. Objetivos Específicos

- Determinar as características morfofisiológicas dos isolados.
- Caracterizar bioquimicamente os isolados para obtenção de sua diversidade metabólica.
- Caracterizar geneticamente os isolados de arroz, usando os marcadores moleculares 16S rDNA e BOX rDNA (regiões repetitivas).
- Identificar os isolados a partir da técnica de sequenciamento parcial do gene 16S rDNA.
- Determinar a diversidade genética dos isolados e agrupá-los por meio da análise por similaridade entre eles.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. A Cultura de Arroz.

O arroz (*Oryza sativa*) é uma gramínea monocotiledônea, inclusa na família *Poaceae*, classe *Liliopsida* e ordem *Poales* (OLIVEIRA, 2003). A espécie *Oryza sativa*, à qual pertence à maioria das variedades de arroz cultivadas no mundo, originou-se no sudoeste da Ásia e hoje é cultivado em todo o mundo, suportando uma grande diversidade ambiental (VIEIRA, 1999).

No Brasil está entre os três cereais mais cultivados – arroz, milho e soja – que somados representam 91% da produção anual de grãos. No que se refere ao arroz, em 2011, foram produzidos 13,4 milhões de toneladas de grãos (IBGE, 2012) sendo considerado um dos alimentos mais consumidos pela população.

A maior parte da produção de arroz é diretamente consumida pelo ser humano, provendo alimento básico para mais da metade da população mundial. Entretanto, com o permanente crescimento da população, com a perspectiva de alcançar aproximadamente 8,3 bilhões de pessoas até o ano 2025, a necessidade de expansão de áreas para agricultura intensiva, aliada ao incremento e aumento da produção de alimentos é uma necessidade perante a possível escassez de alimentos decorrente deste “inchaço populacional” (BOCKMAN, 1997).

Calcula-se que para continuar suprindo a demanda alimentar gerada pelo aumento populacional nos próximos 30 anos, será necessário aumentar a produção em 60% em relação à atual (LADHA & REDDY, 2003), a fim de que a produção dos grãos se torne equivalente às necessidades de consumo. Contudo, o aumento na produção de arroz requer a interação de vários fatores atrelados ao aumento na disponibilidade de nutriente para a planta (PACHECO, 2008).

O cultivo do arroz requer solos com grandes quantidades de nutrientes para seu crescimento, desenvolvimento e produção. Para a produção de uma tonelada de grãos de arroz é necessário aproximadamente 32 a 47 kg de nitrogênio (CHOUDHURY & KENNEDY, 2004), sendo este elemento químico o mais consumido pela planta, podendo a sua ausência limitar a produção do arroz (RAVEN, RAY & SUSAN, 1992).

Entretanto, muitos solos brasileiros são deficientes deste elemento (CHOUDHURY & KENNEDY, 2004), então para suprir a demanda nutricional da planta, a agricultura moderna utiliza intensivamente fertilizantes industriais nitrogenados para assegurar alta produtividade (TAIZ & ZEIGER, 2004), que além de serem obtidos de fontes não renováveis, e potencialmente poluentes ambientais, representam uma significativa parcela dos custos de produção da cultura (BOCKMAN, 1997).

Além das técnicas de adubação mineral, outros processos constituem fontes capazes de fornecer grandes quantidades de nutrientes ao arroz. A decomposição da matéria orgânica do solo e a FBN realizada por micro-organismos associados ao vegetal proporcionam benefício ao crescimento das gramíneas além de não prejudicar o meio ambiente e gerar menores custos de produção (RAVEN, RAY & SUSAN, 1992; GUIMARÃES, BALDANI & BALDANI, 2003).

2. Bactérias Promotoras de Crescimento em Plantas.

Dentre os micro-organismos que habitam a rizosfera das plantas, encontram-se as bactérias promotoras de crescimento em plantas - BPCP. Estas bactérias habitam a rizosfera podendo exercer uma influência positiva sobre o crescimento das plantas (FIQUEIREDO *et al.*, 2010). As plantas resultantes

desse tipo de interação podem ser maiores, mais vigorosas, com maior produtividade e mais saudáveis (RADWAN, MOHAMED & REIS, 2004) devido à proteção microbiológica promovida pelas mesmas.

2.1. Gênero *Pseudomonas*

As bactérias do gênero *Pseudomonas* podem atuar como BPCP e são caracterizadas morfológicamente como bacilos gram-negativos. Ferreira e colaboradores (2009) isolaram um grupo de bactérias de solo e de raízes de trigo com característica de colônias com pouca elasticidade, coloração creme e tamanho aproximado de colônia >2 mm associado a outras características como a presença de fluorescência nas colônias. Este conjunto de características foi atribuído à isolados bacterianos pertencentes ao gênero *Pseudomonas*. Este gênero engloba mais de 100 espécies conhecidas e identificadas (WOESE, 1987; STACKEBRANDT, MURRAY & TRUE PER., 1988; KERSTERS *et al.*, 1996) dentre elas *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescense* e *P. putida*.

Atualmente são citadas 196 espécies e 18 subespécies no gênero *Pseudomonas spp.*, (EUZEBY, 2012). Embora algumas espécies do gênero *Pseudomonas* apresentem fitopatogenicidade, muitos membros desse grupo, como as espécies *P. fluorescens* e *P. putida*, têm sido relacionados a efeitos positivos em vegetais (JI *et al.*, 2006), o que caracteriza estas bactérias como promissoras BPCP.

Segundo Mello (2012), dentre as bactérias BPCP o gênero *Pseudomonas spp.* é o mais estudado, devido à capacidade deste micro-organismo de suprimir patógenos, de ter ocorrência de forma natural em vegetais, tendo também versatilidade nutricional, além da sua capacidade de produção de antibióticos (JETIYANON & KLOEPPER, 2002), sideróforos

(DOBBELAERE; VANDERLEYDEN; OKON, 2003) e hormônios de crescimento vegetal (PEDERSOLI, 1967) que contribuem para o equilíbrio e desenvolvimento da planta.

2.2. Gênero *Bacillus*

Com relação ao gênero *Bacillus* são reconhecidas 51 espécies, dentre elas bactérias patogênicas como *Bacillus anthracis* e *B.cereus* e também bactérias promotoras de crescimento em plantas como a espécie *Bacillus amyloliquefaciens*. Estes micro-organismos são bacilos gram-positivos ou gram-variáveis podendo ser observados na forma de bactérias gram-negativas, aeróbicos ou anaeróbicos facultativos, na sua maioria móveis e catalase positivos (MURRAY *et al.*, 2000), sendo capazes de sobreviver em condições adversas de dessecação, temperatura e pH devido a capacidade de produzir esporos (JAWETZ, ALDEBERG & MELNICK, 1998).

Morfologicamente apresentam 2 - 4 mm de diâmetro de colônia, aspecto variando de liso, mucoide a rugoso, bordas onduladas ou estendidas e ocasionalmente com aparência de cultura mistas (REALPE, HERNÁNDEZ & AGUDELO, 2002). Estes micro-organismos são conhecidos na literatura por sua capacidade de assimilação de nitrogênio (IDRISS *et al.*, 2002), metabolização de enzimas presentes no ciclo do nitrogênio como *citrato liase* e *nitrato redutase* (PRIEST *et al.*, 1987) e também metabolismo de proteínas (GIONGO, 2006) e fosfatos (TURNER & BACKMAN, 1991), podendo considerar este gênero eficaz na promoção do crescimento vegetal.

2.3. Gênero *Xanthomonas*

O gênero *Xanthomonas* é conhecido por bactérias gram negativas, com formato baciliforme e crescimento lento, com tamanho médio entre 0,5 X 1,2 μm (BIRCH, 2001). As células ocorrem individualmente, podendo ocasionalmente ocorrer em pares ou em pequenas cadeias, tendo sua mobilidade promovida por um único flagelo polar (TAYLOR *et al.*, 1961).

São aeróbias estritas, oxidase negativa, catalase positiva, formam colônias amarelas e convexas, de bordas lisas, mucoides, sendo seu crescimento favorecido por temperaturas variáveis de 25-28 °C (TAYLOR *et al.*, 1961 & BIRCH, 2001).

3. Interação Planta-Bactéria.

As interações planta-bactéria podem ser divididas em três categorias: simbiótica, patogênica e associativa (ROMEIRO, 2012). Embora existam 3 categorias esta interação irá depender da sobrevivência e persistência do micro-organismo, podendo colonizar a superfície das plantas, caracterizando a colonização epifítica; ou ocupando espaços dentro dos tecidos das plantas, sendo denominada colonização endofítica (BRENCIC & WINANS, 2005).

As plantas podem estar associadas a micro-organismos em todos os seus estágios de desenvolvimento e crescimento. Estes por sua vez podem influenciar ativamente no aumento do crescimento vegetal e reduzir sintomas de fitopatologias. Gray & Simth (2005), relataram que aproximadamente 7 a 15% da superfície total das raízes são ocupadas por células microbianas, concluindo também que seria impossível o desenvolvimento vegetal sem o auxílio dos micro-organismos. Entretanto, apesar da importância dos micro-organismos no

desenvolvimento de vários vegetais, trabalhos utilizando micro-organismos como biofertilizantes em arroz ainda são recentes.

Um exemplo bastante estudado associado ao desenvolvimento vegetal é a simbiose, que se caracteriza pela interação endofítica entre rizóbios e leguminosas. Esta simbiose endofítica se inicia no reconhecimento específico de sinais moleculares produzidos pela planta e pela bactéria, gerando o desenvolvimento de nódulos nas raízes (SPAINK, 2000) onde o endossimbionte atua como fixador de nitrogênio (FREITAS *et al.*, 2007).

Já nas gramíneas não são observadas as estruturas simbióticas especializadas, como os nódulos nas raízes (PACHECO, 2008). Contudo, os micro-organismos promotores de crescimento em plantas têm sido encontrados dentro de tecidos de algumas gramíneas em relação associativa (SILVA *et al.*, 2004). Enquanto a bactéria contribui diretamente com o nitrogênio fixado para seu hospedeiro, a planta fornece carboidratos aos micro-organismos servindo como fonte de energia (RADWAN, MOHAMED & REIS, 2004).

A relação associativa entre as BPCP e o arroz pode ser observada a partir da promoção de diversos mecanismos, tais como: indução da expressão de genes responsáveis pelo crescimento dos pêlos radiculares (ARAUJO, MUNHOZ & HUNGRIA, 1996; SILVA & MELLONI, 2011), mudanças nos níveis de fitohormônios (OLIVEIRA *et al.*, 2008; PEDRINHO, 2009), fixação biológica de nitrogênio (IKEDA, 2010; PEREIRA & BRASIL, 2012) e solubilização de fosfatos (SILVA & VIDOR, 2000).

Desde os relatos de Döbereiner e Ruschel (1958), ao isolar bactérias da espécie *Beijerinckia fluminense* oriundas da rizosfera de cana-de-açúcar, décadas se passaram e cada vez mais, novas espécies de BPCP têm sido isoladas de raízes e das partes aéreas de gramíneas (DÖBEREINER & DAY, 1976) e de

outras plantas como cafeeiros (JIMENEZ *et al.*, 1997; SANTOS *et al.*, 2006) e abacaxizeiros (TAPIA *et al.*, 2000).

Dashi (1998) relata um efeito positivo no aumento do crescimento das plantas de 5 a 30%, em diversas culturas como arroz, milho, algodão e canola após o tratamento das sementes com BPCP.

4. *Bactérias Produtoras de Fitohormônios.*

As BPCP associadas às gramíneas podem trazer benefícios para as plantas com as quais se associam através da produção de fitohormônios como a auxina, citocinina e giberelina (PEDERSOLI, 1967). Estes hormônios vegetais são reguladores naturais de crescimento das plantas e irão influenciar diretamente nos processos fisiológicos estimulando o crescimento do vegetal (PEDRINHO, 2009).

A partir de diversos relatos na bibliografia podemos afirmar que os gêneros *Bacillus* sp., *Burkholderia* sp., *Klebsiella* sp., (IKEDA, 2010), *Azospirillum* spp., (SILVA, 2010), *Sphingomonas* spp., (VIDEIRA, 2008), *Rhizobium leguminosarum* (SILVEIRA, 2008) e *Pseudomonas* sp. (MARQUES *et al.*, 2008) podem, quando associados às plantas, atuar na promoção do crescimento vegetal.

O mecanismo de promoção de crescimento vegetal por microorganismos endofíticos ainda necessita de mais estudos para um melhor entendimento dos fatores envolvidos, contudo todos os autores destacaram a influência da produção de fitohormônios pelas bactérias como um fator importante a ser estudado.

As auxinas são hormônios que proporcionam o alongamento celular atuando assim no crescimento da planta. Essa substância é produzida principalmente no meristema apical (gema) do caule e transportada através das células do parênquima até as raízes através de transporte unidirecional seguindo sempre em direção à extremidade das raízes (PEDERSOLI, 1967; RAVEN, RAY & SUSAN, 1992). O ácido indol acético (AIA) é a forma predominante das auxinas, sendo encontrada em 80% das bactérias isoladas da rizosfera segundo Galdiano e colaboradores (2011).

A promoção do crescimento de raízes e caules é o principal efeito da auxina (TAIZ & ZEIGER, 2004), além de apresentar influência direta na germinação de sementes através do alongamento das células recém-formadas nos meristemas. Contudo o efeito deste fitohormônio é variável, dependendo da sua concentração. Em alguns tecidos as auxinas controlam a divisão celular, mas em concentrações muito altas as auxinas causam efeito antagônico inibindo o alongamento celular e, portanto, o crescimento de todo o vegetal (PEDRINHO, 2009).

As citocininas são conhecidas por estimular a divisão celular (citocinese) e atuam também retardando o envelhecimento das plantas. São produzidas nas raízes e transportadas para todas as partes da planta através do xilema (PEDRINHO, 2009). Quando associadas às auxinas as citocininas atuam sobre a formação de células precursoras do sistema vascular e desempenham papel importante no aumento da sensibilidade dessas células à auxina, estimulando indiretamente o processo de diferenciação dos vasos e desenvolvimento vegetal (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

As giberelinas são hormônios produzidos principalmente nas raízes e nos brotos foliares, que atuam estimulando o crescimento de caules e folhas, mas têm pouco efeito sobre o crescimento das raízes. Atuam juntamente com as

auxinas no desenvolvimento dos frutos e desempenham junto com as citocininas importante papel no processo de germinação das sementes (TAIZ & ZEIGER, 2004).

5. *Micro-organismos Solubilizadores de Fosfatos.*

Os micro-organismos solubilizadores de fosfatos atuam na disponibilização de formas inorgânicas de fosfatos, através da solubilização do fosfato orgânico pela acidificação biológica dos micro-organismos desempenhando um papel importante no aumento do teor de fósforo na solução do solo, aumentando a absorção deste nutriente pelas plantas, resultando em melhor crescimento e maior rendimento das culturas (SILVA & VIDOR, 2000).

O uso de micro-organismos solubilizadores de fosfato em inoculantes ou o manejo de suas populações no solo constituem alternativas para a melhoria do suprimento de fósforo para as plantas (KERBAUY, 2004). No entanto, o desenvolvimento dessas tecnologias e de processos que maximizem a solubilização requer melhor conhecimento, não só das condições que influem no crescimento, mas também dos mecanismos de solubilização utilizados pelos micro-organismos (ANANDHAM *et al.*, 2007).

Souchie e colaboradores (2005), verificaram que micro-organismos da espécie *Pseudomonas sp.*, apresentam correlação positiva quanto à solubilização de fosfatos, o mesmo foi verificado por Hara e Oliveira (2005), que observaram a solubilização de fosfato de cálcio e fosfato de alumínio por micro-organismos do gênero *Rhizobium spp.*

Segundo Gomes e colaboradores (2003), a inoculação de bactérias do gênero *Bacillus sp.* em sementes de alface dos cultivares Verdinha e Verônica

resultou no aumento da matéria fresca comercializável da hortaliça, associando este fato à solubilização de fosfatos. Turner & Backman (1991), utilizando uma estirpe de *Bacillus* sp. solubilizadora de fosfato, obtiveram promoção do crescimento de 3,5% a 17% em plantas de amendoim.

6. Bactérias Fixadoras de Nitrogênio.

Uma alternativa para o aumento da produtividade da cultura de arroz é a inoculação de bactérias promotoras de crescimento vegetal nas sementes de interesse, para que estas bactérias realizem a FBN, processo em que microorganismos procariotos são capazes de assimilar o N_2 atmosférico e convertê-lo a uma forma assimilável (NH_3) pelas plantas (MADIGAN *et al.*, 2010).

Embora, presente em abundância na atmosfera (78%), o nitrogênio não está prontamente disponível para as plantas. Neste caso a obtenção de nitrogênio só é possível quando as moléculas se apresentam na forma de íon nitrato (NO_3^-) ou íon amônio (NH_4^+), no entanto estes organismos eucariontes são incapazes de absorver o N_2 e convertê-lo a uma forma assimilável (COSTA, 1965; HUNGRIA, CAMPOS & MENDES, 2000).

A forma mais comumente absorvida é a de nitrato, já que o nitrogênio amoniacal liberado pela decomposição da matéria orgânica do solo é rapidamente convertido a nitrato, podendo também ser absorvido na forma de amônio quando em condições de pH muito ácido, altas concentrações de fenóis ou anóxia (MADIGAN *et al.*, 2010).

Na fixação biológica, as bactérias diazotróficas utilizam seu complexo enzimático denominado nitrogenase, para transformar o N_2 em amônia, tornando-o assimilável à planta (STROSCHEIN, 2007), desempenhando um

papel relevante no processo agrícola (GUIMARÃES, BALDANI & BALDANI, 2003).

Em geral, espécies de bactérias diazotróficas associativas têm sido isoladas de raízes e partes aéreas de gramíneas de pastagem e de grãos. No caso de arroz, diversas bactérias foram isoladas em associação com a planta, como por exemplo, os gêneros *Herbaspirillum seropedicae* (FERREIRA, 2008; PACHECO, 2008), *Burkholderia brasilensis* (SABINO, 2003) e *Pseudomonas sp.* (REZENDE, OLIVEIRA & DIDONET, 2011).

A associação das bactérias diazotróficas com o arroz não ocorre com a formação de uma estrutura especializada para a fixação do nitrogênio (nódulos) como no caso da interação de rizóbio com leguminosas. As bactérias podem invadir ou não o tecido da planta através de ferimentos na epiderme, pontos de emissão de raízes secundárias e estômatos distribuindo-se em diversas partes da planta. Ao colonizar a planta, a bactéria se beneficia através dos produtos da fotossíntese e ao entrarem em contato com o N₂, o fixam e o transferem para a planta na forma assimilável (FERREIRA, 2008).

Efeitos positivos da inoculação destas bactérias diazotróficas têm sido observados por diversos estudos, os quais também relataram consequente incremento na produção dos grãos (CAVALLET *et al.*, 2000; DIDONET; DIDONET; GOMES, 2003; DALLA SANTA *et al.*, 2004; RICCI *et al.*, 2005). Segundo Guimarães e colaboradores (1998), dependendo da variedade do arroz utilizada, o incremento na produção de grãos pode chegar a 62%, quando inoculada com uma estirpe selecionada.

7. A importância de Técnicas Moleculares no Estudo de Diversidade.

Até 1970, a taxonomia era baseada, principalmente, nas propriedades morfofisiológicas e bioquímicas dos micro-organismos, deste modo a idéia de sequenciamento de cromossomos inteiros parecia uma técnica improvável. No entanto, foi a partir do desenvolvimento de técnicas de amplificação gênica, particularmente a PCR (SAIKI *et al.*, 1988) e das técnicas de sequenciamento direto do DNA amplificado (INNIS *et al.*, 1988), que se teve início uma verdadeira revolução na taxonomia e filogenia de procariotos (TOLEDO, 2008).

Os estudos atuais sobre esta técnicas dão ênfase ao gene 16S rDNA na determinação de relações filogenéticas das estirpes bacterianas. Este gene apresenta características conservativas ao longo da evolução e podem indicar como os micro-organismos estão relacionados durante a evolução de milhares de anos (WOESE, 1987).

A amplificação da região 16S rDNA é uma confiável técnica para a identificação da diversidade bacteriana. Ela consegue definir a posição dos procariotos em nível de gênero, além de possuir uma boa base de dados para comparação de sequências do rDNA no *National Center for Biotechnology Information* - NCBI (VIDEIRA, 2008).

A amplificação de outros genes por PCR poderá garantir a precisão e a confiabilidade do esquema filogenético dos isolados bacterianos, uma vez que supera a limitação do gene 16S rDNA na resolução filogenética em grau de gêneros e espécies (MEINTANIS *et al.*, 2008).

A técnica de PCR com o *primer* BOX é utilizada para amplificar regiões conservadas e repetitivas do DNA cromossômico, que ocorrem em geral no espaço intergênico, para detectar a diversidade genética de estirpes distintas de bactérias (IKEDA, 2010). A região BOX do rDNA bacteriano consiste em

três subunidades específicas, BOX-A, BOX-B, e BOX-C, sendo a subunidade BOX-A altamente conservada entre diversas espécies de bactérias podendo inferir positivamente na identificação das espécies semelhantes (MARTIN *et al.*, 1992).

A grande vantagem do uso deste *primer* específico, é que em apenas uma reação, pode se obter um número elevado de bandas, permitindo a detecção de polimorfismo e caracterização molecular dos isolados (CHUEIRE *et al.*, 2000).

A utilização da PCR de genes específicos das bactérias é atualmente uma poderosa ferramenta o tem tornado possível a geração de um alto conteúdo de informação, especialmente para comparações de parentais próximas (MURRAY, GRANNER & RODWELL, 2007).

Sendo assim, o uso do sequenciamento do gene que codifica a subunidade menor do ribossomo (16S) é uma ferramenta importante para determinar a posição taxonômica de estirpes de bactérias, sendo estabelecido como um método padrão de análise (IKEDA, 2010).

Atualmente, várias sequências completas de muitas espécies já são conhecidas e registradas em bancos genéticos, como o NCBI. Desta forma, pesquisas tem utilizado o sequenciamento total ou parcial do gene 16S rRNA para estudos de filogenia, visto que a sequência do gene 16S rDNA corresponde a regiões altamente conservadas do DNA bacteriano (AMANN; LUDWIG; ACHLEIFER, 1995).

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Material Biológico.

Foram utilizadas vinte bactérias da coleção de bactérias endofíticas isoladas do arroz (*Oryza sativa L.*) do Laboratório de Bioquímica de Microorganismos da UEG (Universidade Estadual de Goiás), UnuCET, Anápolis, GO.

2. Armazenamento e Manutenção das Bactérias.

As vinte bactérias selecionadas para o estudo foram cultivadas em meio sólido King B (KING, WARD & RANEY, 1954) e mantidas à temperatura de 30°C até o seu crescimento e análise da sua pureza. Em seguida foram inoculadas em meio King B líquido, posteriormente as bactérias foram transferidas para micro-tubos e armazenadas à temperatura de 4°C em solução de glicerol 40%. Estes materiais foram estocados em duplicata para a realização dos testes de caracterização morfofisiológica e molecular.

3. Caracterização Morfofisiológica.

A caracterização morfofisiológica está relacionada à expressão das características morfológicas, características relacionadas à motilidade, ao sistema enzimático e à variabilidade morfofisiológica para utilização de nutrientes pelos isolados bacterianos.

3.1. Caracterização Morfológica das Colônias Bacterianas.

A partir da observação das colônias bacterianas isoladas foi possível analisar suas características morfológicas. Foram analisados critérios de tamanho (grande ou puntiforme); forma (circular, irregular ou rizóide); bordas (lisa, lobada, denteada ou ondulada); superfície (lisa, rugosa, pregueada, raiada); consistência (cremosa, viscosa, granulosa ou seca); transparência (opaca, translúcida ou transparente); coloração (amarelo ouro, amarelo claro, vermelho, rosada, branca, castanha ou alaranjada) e brilho (fosco ou brilhante) (UFBA, 2012a).

3.2. Teste de Motilidade.

Esta característica fisiológica está relacionada com a capacidade de locomoção dos micro-organismos e indiretamente associada à produção de flagelos. As vinte bactérias foram inoculadas na superfície do meio semi-sólido NFB (DÖBEREINER; ANDRADE; BALDANI, 1999) e seu crescimento foi observado visualmente ao final de 72 horas onde a formação de turbidez ao longo da linha de inoculação foi considerada sinal característico de motilidade segundo Teixeira, Ferreira e Santos (2012).

3.3. Coloração de Gram.

A coloração de gram é um método de coloração de bactérias que permite a separação de isolados bacterianos em gram-positivos e gram-negativos e a determinação da morfologia e do tamanho das amostras analisadas. Este método é baseado na capacidade das paredes celulares de bactérias gram-positivas de reterem o corante cristal violeta no citoplasma durante um

tratamento com etanol-acetona, enquanto que as paredes celulares de bactérias gram-negativas não o fazem. As colônias isoladas das vinte bactérias foram inoculadas em meio semi-seletivo King B e com o auxílio da alça de repicagem esterilizada foram transferidas para uma lâmina de vidro limpa já acrescida de uma gota de NaCl 0,85%. Foi realizado o esfregaço por toda a extensão da lâmina que foi fixada por secagem na chama do bico de bunsen, garantindo uma fixação uniforme em toda a lâmina (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). O esfregaço foi submetido à coloração de gram na seguinte sequência: cristal violeta (violeta de metila, 4g; oxalato de amônia, 4g; álcool etílico, 100 mL; álcool metílico, 100 mL; água destilada, 600 mL) por 1 minuto; lavagem com água; solução de lugol (iodeto de potássio, 4,5g; iodo metálico, 3g; água destilada, 450 mL, lugol concentrado: água) por 1 minuto; lavagem com água; lavagem com etanol-acetona 1:1 (v:v) por 20 segundos; lavagem com água; solução de safranina (safranina, 2,5g; água destilada, 500mL) por 30 segundos; lavagem com água como descrito pelo Ministério da Saúde (2001).

Após a coloração a lâmina foi seca e levada ao microscópio em objetiva com aumento de 100x, onde pode ser observada a forma das células bacterianas e a presença da coloração em tons rosa para as bactérias gram-negativas e violeta para as gram-positivas.

3.4. Teste de Citrato.

Este teste determina se a bactéria é capaz de utilizar o citrato de sódio como única fonte de carbono para o metabolismo e crescimento. As bactérias selecionadas foram inoculadas na forma de estrias na superfície do meio sólido citrato de Simmons (TEIXEIRA, FERREIRA & SANTOS, 2012) e armazenadas em estufa a 30°C por 72 horas. As culturas citrato positivo foram identificadas pela presença de crescimento, na superfície do meio e pela

observação do desenvolvimento da coloração azul decorrente da degradação de citrato pela enzima citrato liase com alcalinização do meio de cultura. Nas bactérias com reação citrato negativas a cor do meio mantém-se verde e não apresentam crescimento no meio de cultura (TEIXEIRA, FERREIRA & SANTOS, 2012).

3.5. Teste de Urease.

Este teste tem a finalidade de detectar a presença da enzima uréase. Enzima responsável por catalisar a degradação da uréia, produzindo CO_2 , H_2O e amônia, que reagem formando carbonato de amônia, alcalinizando o meio de cultura. A capacidade de degradação de uréia pelas bactérias testadas foi avaliada utilizando o meio uréia (CHRISTENSEN, 2012). As bactérias foram inoculadas na forma de estrias na superfície do meio uréia e armazenadas em estufa a 30°C por 72 horas como descrito por Ikeda (2010). A prova foi revelada positiva pela alcalinização do meio proveniente da degradação da uréia, apresentando coloração rosa intenso, enquanto na prova negativa não há alteração da cor do meio, que permanece alaranjado, ou pode-se observar a acidificação do meio indicado pela cor amarelo (UFBA, 2012b; COGO, 2008).

3.6. Teste de Redução de Nitrato.

Este teste foi realizado para detecção da presença da enzima redutase de nitrato, que reduz esta molécula em óxido nítrico produzindo oxigênio (NEYRA & HAGEMAN, 1976). As bactérias foram inoculadas em tubos de ensaio contendo meio de cultura semi-sólido NFB acrescido de nitrato de potássio (KNO_3) 1g.L^{-1} e foram armazenados na temperatura de 30°C por 72

horas. Após as 72 horas os tubos foram agitados vigorosamente para confirmação da presença de óxido nitroso. As culturas positivas foram representadas pela formação de bolhas devido à fermentação anaeróbica que transformou o nitrato (NO^{3-}) em óxido nitroso e a ausência de bolhas considerado negativa, segundo Justino e colaboradores (2006). As bactérias podem ser consideradas *nir+* ou *nir-* de acordo com a presença ou ausência do gene que codifica para a enzima redutase de nitrato no metabolismo bacteriano.

3.7. *Teste de Protease*

A capacidade de crescimento bacteriano foi avaliada segundo Hungria e colaboradores (1994). Para a avaliação da atividade da enzima hidrolítica de proteínas do leite foi adicionado proteína do leite (leite em pó 2%) em meio de cultura mínimo sólido e avaliado o crescimento das colônias a produção de um halo de inibição translúcido característico para presença da enzima proteolítica. O crescimento foi avaliado por um período de 96 horas e o diâmetro da colônia e do halo foi medido com régua milimétrica. As bactérias que não apresentaram crescimento foram avaliadas como negativas para assimilação da fonte de carbono.

A atividade enzimática extracelular foi avaliada mediante a relação entre o diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia e expressa como índice enzimático (HANKIN & ANAGNOSTAKIS, 1975). Desse modo, quanto maior o índice maior é a atividade enzimática no meio.

3.8. *Teste de Crescimento em Fonte de Carbono.*

Para observar a amplitude metabólica das bactérias em estudo, foram utilizadas 13 fontes de carbono. A capacidade de crescimento bacteriano foi avaliada segundo Hungria e colaboradores (1994), utilizando as seguintes fontes de carbono: ácido maleico, ácido málico, ácido nicotínico, amido de milho, arabinose, celulose, frutose, glicose, manitol, mio-inositol, proteínas do leite, sacarose e sorbitol. As placas foram confeccionadas em triplicata para cada fonte de carbono. As bactérias foram crescidas em meio King B líquido por 24 horas. O meio de cultura sólido base utilizado foi o meio mínimo (HUNGRIA *et al.*, 1994) sendo acrescido de 10 mmol.L⁻¹ de cada fonte de carbono. As fontes amido, celulose e proteínas do leite foram adicionadas nas concentrações de 4%. As placas foram divididas em vinte quadrantes e as bactérias cultivadas previamente no meio de cultura King B foram transferidas para as placas de petri com as fontes de carbono através de um carimbo replicador de colônias, que depositou aproximadamente 3 µL das culturas bacterianas em cada quadrante. O crescimento das colônias nos quadrante foi avaliado pelo período de 96 horas.

3.9. *Teste de Catalase.*

Este teste está relacionado à presença da enzima catalase nos isolados bacterianos, que tem por finalidade decompor o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. Uma porção de cada uma das vinte bactérias foi previamente transferida para uma placa dividida em vinte quadrantes, de forma que todas as bactérias pudessem ser analisadas, e em seguida foi adicionado 50 µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3%. O teste foi realizado segundo Ikeda (2010), onde a reação se caracterizou pela formação de bolhas de oxigênio em até 2 minutos após a adição do H₂O₂ resultando teste positivo.

3.10. Teste de Capacidade de Crescimento em Meio Livre de Nitrogênio.

Este teste é relacionado à capacidade de fixar nitrogênio atmosférico pelas bactérias em meio de cultura livre deste nutriente (TEIXEIRA, MELO & VIEIRA, 2005). As colônias foram inoculadas em meio de cultura líquido King B, incubadas em agitador a 120 rpm, na temperatura ambiente durante 48 horas. Após apresentarem crescimento positivo, 30 μL foram inoculados em frascos ampola contendo aproximadamente 4mL de meio de cultura semi-sólido NFB livre de nitrogênio e o resultado foi observado em aproximadamente 48 horas. A formação de halo característico na superfície do meio de cultura foi indicativa de que as bactérias realizaram a FBN, e as bactérias que não apresentaram o halo característico foram consideradas negativas para esta característica (KUSS *et al.*, 2007).

4. Caracterização Molecular.

4.1. Extração do DNA.

O DNA dos 20 isolados foi extraído como descrito por Ausebel, Brent e Kingston (1999), com modificações. As bactérias foram cultivadas em tubos de 5,0 mL contendo meio líquido King B e mantidas sob agitação de 120 rpm durante 24 horas à temperatura ambiente. Foram utilizados 3mL de cultura bacteriana que foram centrifugadas a 13.000 rpm durante 2 minutos e então adicionados 600 μL de solução de lise de DNA (50 μM Tris pH 7,6; 20 mM de EDTA; 400 mM de NaCl; 1% SDS) e incubados por 10 minutos a 80°C. Após esta etapa as amostras foram transferidas para o banho de gelo por 5 minutos e adicionado 3 μL de solução RNase (24 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e incubada a 37°C por 15 minutos. Foram acrescentados 200 μL de NaCl 5M na mistura que foi homogeneizada por inversão sendo acondicionada em banho de gelo por 5

minutos. A mistura então foi centrifugada a 13.000 rpm durante 3 minutos e o sobrenadante transferido para um novo tubo já contendo 600 µL de isopropanol (P.A.) a temperatura ambiente e levado ao banho de gelo por 10 minutos. A mistura foi centrifugada a 13.000 rpm durante 15 minutos e o sobrenadante descartado, em seguida ressuspensa em 600 µL de etanol 70% e centrifugada a 13.000 rpm por 2 minutos sendo o etanol descartado. O precipitado foi seco à temperatura ambiente durante aproximadamente 24 horas, em seguida, ressuspensa em 30 µL água ultrapura estéril e estocado a -20°C para ser utilizado em análises posteriores.

4.2. Análise do DNA extraído e dos fragmentos da PCR.

Para as análises do DNA obtido nas extrações e nas ampliações por PCR foi realizado a eletroforese em gel de agarose. O perfil eletroforético do material genético foi determinado em gel de agarose 0,8% em tampão TBE 1X (SAMBROOK, FRITSCH & MANIATIS, 1989) e tampão de corrida FSUDS (azul de bromofenol 0,25%, SDS 0,1%, Ficoll[®] 20% em T₁₀E₁) sendo adicionado às amostras de DNA na proporção de 7:3 (FSUDS: DNA). A corrida eletroforética foi realizada em TBE 1X durante 40 minutos a 90 V.

O gel de agarose foi corado com brometo de etídio (0,5 µg·mL⁻¹) e lavado em água destilada. As bandas de DNA foram visualizadas em transiluminador UV acoplado a um sistema de fotodocumentação *MultiDoc-it*[®] (UVP). O marcador de tamanho molecular utilizado foi 1kb DNA Ladder[®] (BIOLABS).

4.3. Caracterização Genética por Análise da Região BOX-PCR.

Para a amplificação por PCR da região BOX presente nas bactérias foi utilizado o *primer* BOX A1R (5'-CTACGGCAAGGCGACG-3'), sintetizado pela Invitrogen® (Life Technologies).

O sistema de reação de amplificação utilizado foi: água milli-Q estéril 13,4 µL; dNTPs (estoque com 10 mM de cada base) 0,4 µL; tampão de PCR 10X (HCl 100 mM; KCl 500 mM) 2 µL; MgCl₂ (50 mM) 1,2 µL; *primer* BOX A1R (50 pmolµL⁻¹) 0,8 µL; Taq DNA polimerase *Invitrogen*® (5 UµL⁻¹) 0,2 mL; DNA (50 ng. µL⁻¹) 2 µL, em um volume final de 20 µL. Sendo o DNA quantificado em nanodrop digital.

A amplificação foi realizada usando os seguintes ciclos: 1 ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 6 min; 30 ciclos de desnaturação (40 segundos a 90°C), anelamento (1 minuto a 62°C) e extensão (5 minutos a 72°C); 1 ciclo de extensão final a 72°C por 15 minutos, com o uso do termociclador *Biocycler*® de acordo com Kaschuk e colaboradores (2006).

Os fragmentos amplificados foram analisados por eletroforese e fotografados em documentador digital.

4.3.1. Análise dos Dados.

Após a amplificação, foi construída uma matriz binária, com os dados obtidos da análise dos fragmentos amplificados para a região BOX. Para cada posição de migração dos fragmentos foram atribuídos os valores 1 ou 0, indicando presença ou ausência de fragmento. Os isolados foram agrupados pelo método das médias das distâncias por UPMG. Os valores gerados para cada isolado foram comparados e suas semelhanças estimadas pelo coeficiente de

Jaccard, onde $J = a/(n-d)$, sendo “a” o número de combinações com a presença dos fragmentos, menos as combinações de ausência dos fragmentos, “d” é o número de combinações de ausência de fragmentos e “n” é o número de combinações possíveis. Para estas análises foi utilizado o software NTSYSpc[®] (versão 2.02i, 1986-1998 Applied Biostatistics) que gerou um dendrograma de similaridade entre as bactérias analisadas, permitindo avaliar a diversidade dos isolados.

Com auxílio do software do fotodocumentador digital os fragmentos da amplificação foram analisados, estimando seus valores em pares de bases, comparados ao padrão 1kb DNA Ladder[®]. Estes valores foram dispostos em tabela para avaliação da presença e disposição dos fragmentos.

4.4. Caracterização Genética por Análise da Região 16S rDNA.

4.4.1. Amplificação do Gene 16S rDNA.

A amplificação do gene 16S rDNA, do material genético extraído das bactérias selecionadas foram utilizados os *primers* Y1 (5'-TGGCTCAGAACGAACGCTGG -3') Y2 (5'-CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT - 3') e o Y3 (5'-TACCTTGTTACGACTTCACCCCAGTC-3') (CHUEIRE *et al.*, 2003).

A reação de amplificação foi conduzida com os seguintes volumes: água milli-Q estéril 13,4 μL ; dNTPs (estoque com 10 mM de cada base) 0,4 μL ; tampão de PCR 10X (HCl 100 mM; KCl 500 mM) 2 μL ; MgCl_2 (50 mM) 1,2 μL ; oligonucleotídeo Y1 (50 $\text{pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 0,4 μL ; oligonucleotídeo Y3 (50 $\text{pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 0,4 μL ; DNA (50 ng. μL^{-1}) 2 μL ; Taq DNA polimerase *Invitrogen*[®] (5 U μL^{-1}) 0,2 mL, em um volume final de 20 μL .

A amplificação foi realizada usando os seguintes ciclos: 1 ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos; 28 ciclos de desnaturação (1 minuto a 94°C), anelamento (30 segundos a 62°C) e extensão (40 segundos a 72°C); 1 ciclo de extensão final a 72°C por 5 minutos, com o uso do termociclador *Biocycler*[®].

Os fragmentos amplificados foram analisados por eletroforese e fotografados em documentador digital.

4.4.2. Purificação do amplificado do gene 16S rDNA.

Para uma reação de PCR da região 16S rDNA com volume final de 40 µL foram acrescentados 20 µL de acetato de amônia (7,5M) e 120 µL de etanol PA (98%) e foram centrifugados por 20 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e ao restante foram adicionados 500 µL de etanol 80%. Após 1 minuto em etanol 80% os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm por 5 minutos. O *pellet* resultante foi ressuspenso em 10 µL de água ultrapura e deixado em temperatura ambiente por 2 horas. Após a purificação, os produtos da PCR foram analisados por eletroforese e fotografados em documentador digital (IKEDA, 2010).

4.4.3. Sequenciamento do DNA.

Para as bactérias S2 e S22 foram sequenciadas utilizando os *primers* Y1 e Y2, que amplifica um fragmento de cerca de 290pb e para as demais bactérias os *primers* Y1 e Y3 com fragmento em torno de 700 pb cada.

O sequenciamento da região 16S rRNA foi realizado pelo método de terminação de cadeia, utilizando a incorporação de dideoxynucleotídeos fluorescentes, em sequenciador automático de DNA (SANGER; NICKLEN e COULSON, 1977).

Os produtos da reação de sequenciamento foram purificados pela adição de 1 µL de acetato de amônio 7,5 M e 27,5 µL de etanol absoluto. e centrifugado por 20 min a 13.000 rpm. O etanol foi descartado e o sobrenadante foi seco em bomba de vácuo. Foi então, dissolvido em 4µL de *Formamide Loading Dye (Applied Biosystems)*, desnaturado por 2 minutos a 96°C e submetido à eletroforese em um sequenciador automático de DNA da ABI-PRISM 377 (*Applied Biosystems*).

Na reação foram utilizadas de 50 a 100 ng do produto da PCR purificado, 0,25 µM do *primer* Y3, 2µL da mistura para sequenciamento *Big Dye (BigDye[®] Terminator v1.1 CycleSequencing Kit Life Technologies[®])* e água ultrapura necessária para completar um volume final de 10 µL. As mesmas condições foram aplicadas para o *primer* Y2 e Y1. A amplificação foi realizada em termociclador, seguindo uma desnaturação inicial a 94 °C por 2 min.; 30 ciclos de 20 seg. a 94 °C, 15 seg. a 62 °C e 1 min. a 72 °C (IKEDA, 2010).

4.4.4. Edição e Comparação em banco de dados.

A edição das sequências obtidas foi realizada utilizando o programa BioEdit versão 5.0 (HALL, 2005) onde as sequências obtidas foram alinhadas e uma sequência consenso foi gerada.

As sequências consenso foram submetidas ao banco de dados NCBI na opção *BLAST nucleotide*, o qual permite detectar similaridade de uma

sequência biológica com sequências caracterizadas já existentes. Para análise das sequências, pois compara sequências de nucleotídeos com um banco de dados de sequências de nucleotídeos.

As sequências consenso também foram submetidas ao programa MEGA versão5 para construção de um dendrograma de similaridade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Caracterização Morfológica das Colônias Bacterianas.

A identificação dos microrganismos foi realizada através da determinação de características morfológicas e bioquímicas, como já descritas na metodologia.

As características morfológicas comuns entre todos isolados foram tamanho da colônia < 5 mm, coloração creme, transparência opaca e brilho fosco. Variações foram observadas quanto à forma da superfície, as bordas e a elevação das colônias. Com maior frequência as colônias apresentaram: borda ondulada (65%), superfície rugosa (65%), consistência seca (65%) e elevação plana (65%) (Tabela 1).

A partir desta caracterização dois grupos distintos puderam ser observados, entretanto estas características morfológicas são comuns a vários grupos de micro-organismos e, portanto, características subjetivas, importantes apenas para aproximação da determinação taxonômica de bactérias, assim como relatado por Fonseca e colaboradores (2000), que descreveram colônias puntiformes, circulares, de coloração creme, de superfície elevada e borda lisa referindo-se às espécies *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas putida*.

Tabela 1: Características morfológicas de 20 bactérias isoladas de arroz, a partir da observação das colônias em meio sólido King B.

Isolado	Forma	Borda	Superfície	Consistência	Elevação
S2	I	ON	R	S	PL
S4	I	ON	R	S	PL
S5	I	ON	R	S	PL
S6	I	ON	R	S	PL
S6A	I	ON	R	S	PL
S8A	I	ON	R	S	PL
S8B	I	ON	R	S	PL
S17	I	ON	R	S	PL
S97	I	ON	R	S	PL
S105	I	ON	R	S	PL
S32	I	ON	R	S	PL
S35	I	ON	R	S	PL
S37	I	ON	R	S	PL
S39	I	ON	R	S	PL
S22	CI	L	L	CR	E
S25	CI	L	L	CR	E
S26	CI	L	L	CR	E
S29	CI	L	L	CR	E
S41	CI	L	L	CR	E
S63	CI	L	L	CR	E

I: Irregular, CI: Circular, ON: Ondulada, L: Lisa, R: Rugosa, CR: Cremosa, S: Seca, PL: Plana, E: Elevada.

Segundo Realpe, Hernández e Agudelo (2002), colônias da espécie *Bacillus ssp.* normalmente apresentam colônias de 2 a 4 mm de diâmetro, aspecto liso, mucoide ou rugoso, bordas onduladas ou estendidas e ocasionalmente com aparência de cultura mistas, como foi observado em nosso estudo.

2. Teste de Motilidade.

A motilidade das bactérias foi avaliada durante 72 horas, sendo observado que os vinte isolados possuíam capacidade de mobilidade indicando a presença de flagelos. No meio de cultura NFB semi-sólido foi observado o desenvolvimento das bactérias que cresceram deslocando-se da linha de inoculação, concluindo assim a sua capacidade de locomoção.

Segundo Idriss e colaboradores (2002), a espécie *Bacillus amyloliquefaciens* é conhecida pela presença dos flagelos peritríqueos, responsáveis pela habilidade de locomoção de algumas das espécies do gênero *Bacillus ssp.* Já a estrutura de locomoção da espécie *Pseudomonas putida* foi descrita como um flagelo polar, caracterizado por uma estrutura distinta que gira geralmente no sentido inverso, mas com a mesma funcionalidade de locomoção (CHUN *et al.*, 2001).

3. Coloração de Gram.

Quanto ao formato das células observado pela coloração de gram (Figura 1) as 20 bactérias foram identificadas como bastonetes sendo que 13 bactérias apresentaram coloração violeta característico de bactéria gram-positiva (S5, S6, S8A, S8B, S17, S22, S26, S29, S32, S35, S37, S63, e S105) e 7 bactérias apresentaram coloração rosada característica de bactéria gram-negativa (S2, S4, S6A, S25, S39, S41 e S97).

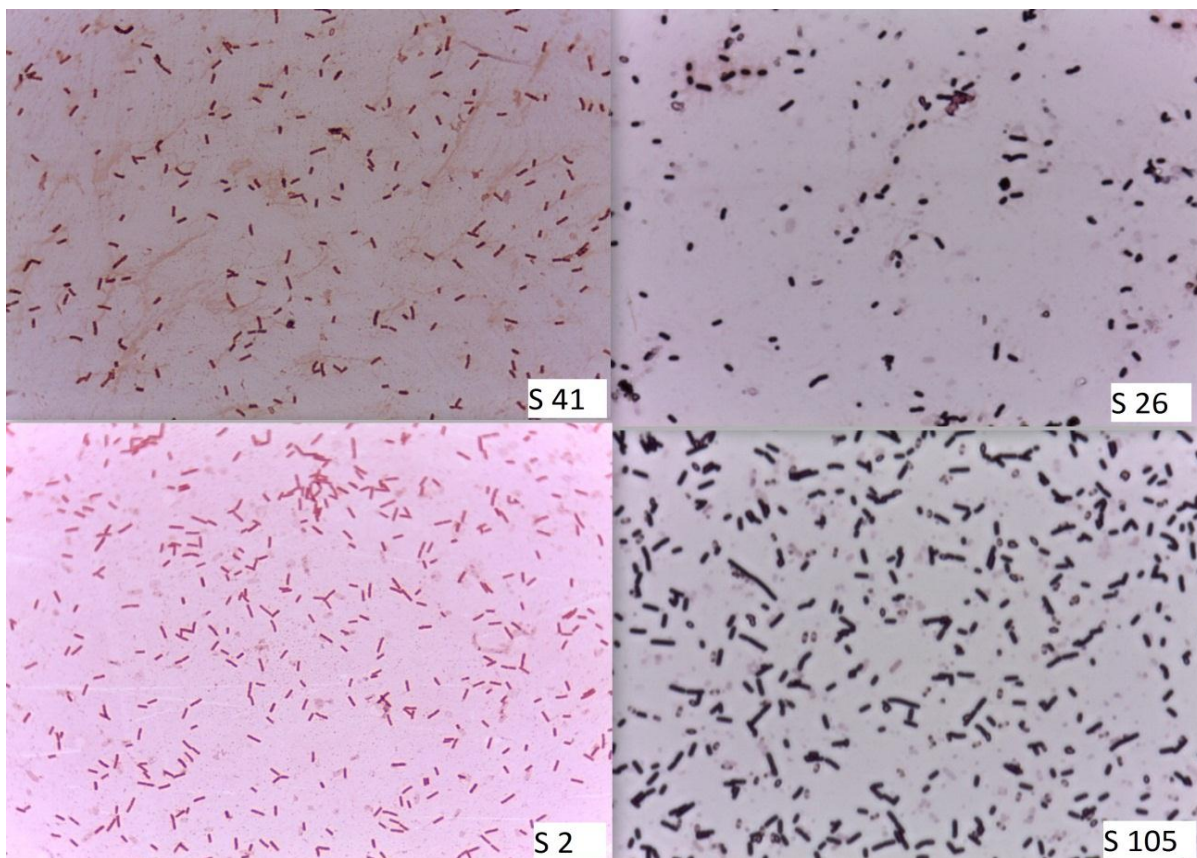


Figura 1: Visualização de bacilos gram-positivos e bacilos gram-negativos na técnica de coloração de gram em objetiva de imersão (100x). S2 e S41: bacilos gram-negativos. S26 e S105 bacilos gram-positivos.

Palleroni (2010), afirma que a família *Pseudomonas sp.* é classificada a partir da coloração de gram como bastonetes gram-negativos. Segundo Priest e colaboradores (1987), as bactérias do gênero *Bacillus sp* também apresentam essa mesma característica quanto a composição da parede celular, contudo também são descritos na literatura *Bacillus spp.* gram-variáveis, ou seja, microorganismos com característica de parede celular gram-positiva (MURRAY *et al.*, 2000).

4. Teste de Citrato.

O teste de utilização de citrato (Figura 2) foi positivo para os isolados S4, S8A, S17, S22, S26, S29, S35, S63 e S97 indicando a presença da enzima denominada citrato liase, que permite a utilização desta fonte de carbono como substrato para a bactéria. Uma vez dentro da célula, o citrato é degradado produzindo oxaloacetato e acetil-CoA, estes produtos se combinam com o sódio fornecido pelo citrato de sódio e alcaliniza o meio de cultura consequentemente alterando a coloração do meio de cultura para azul (TEIXEIRA, FERREIRA & SANTOS, 2012).

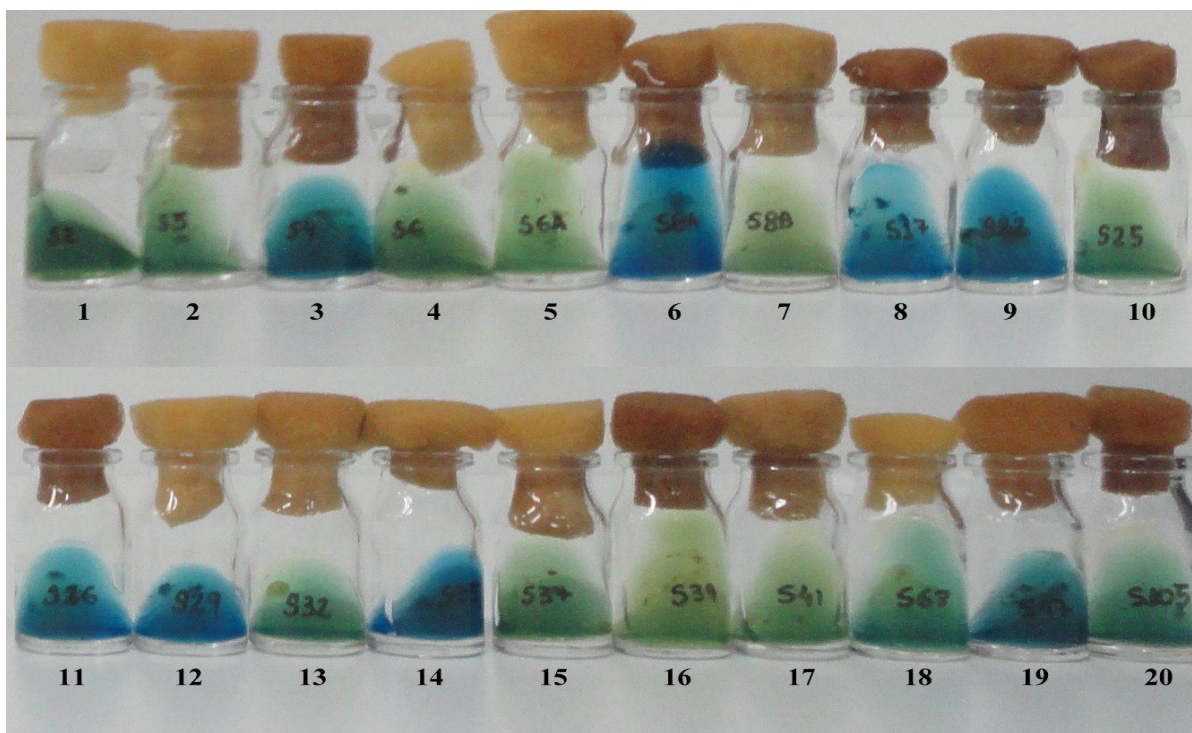


Figura 2: Identificação da atividade de citrato liase das bactérias isoladas de arroz em meio de cultura sólido Citrato de Simmons. (+) cor azul e (-) cor verde. Bactérias: 1- Isolado S2; 2- Isolado S4; 3- Isolado S5; 4- Isolado S6; 5- Isolado S6A; 6- Isolado S8A; 7- Isolado S8B; 8- Isolado S17; 9- Isolado S22; 10- Isolado S25; 11- Isolado S26; 12- Isolado S29; 13- Isolado S32; 14- Isolado S35; 15- Isolado S37; 16- Isolado S39; 17- Isolado S41; 18- Isolado S63; 19- Isolado S97; 20- Isolado S105.

Os demais isolados foram classificados como citrato negativos, pois não foram capazes de utilizar o citrato como fonte de carbono.

5. Teste de Urease.

No teste de urease (Figura 3) os isolados S2, S32, S41 e S63 apresentaram resultado positivo, pois alteraram a cor original do meio alaranjado para um tom rosa intenso. Em contrapartida os isolados negativos alteraram a cor do meio para amarelo, isto se justifica pela produção de metabólitos ácidos, tornando o indicador amarelo. Quando a uréia é desdobrada pela enzima urease, moléculas de amônia e dióxido de carbono acumulam-se no meio de cultura tornando-o alcalino e este aumento de pH faz com que o indicador vermelho de fenol passe de alaranjado a rosa, sendo uma reação positiva para a presença de enzima urease. A ausência da coloração rosa indicou uma reação negativa (COGO, 2008).

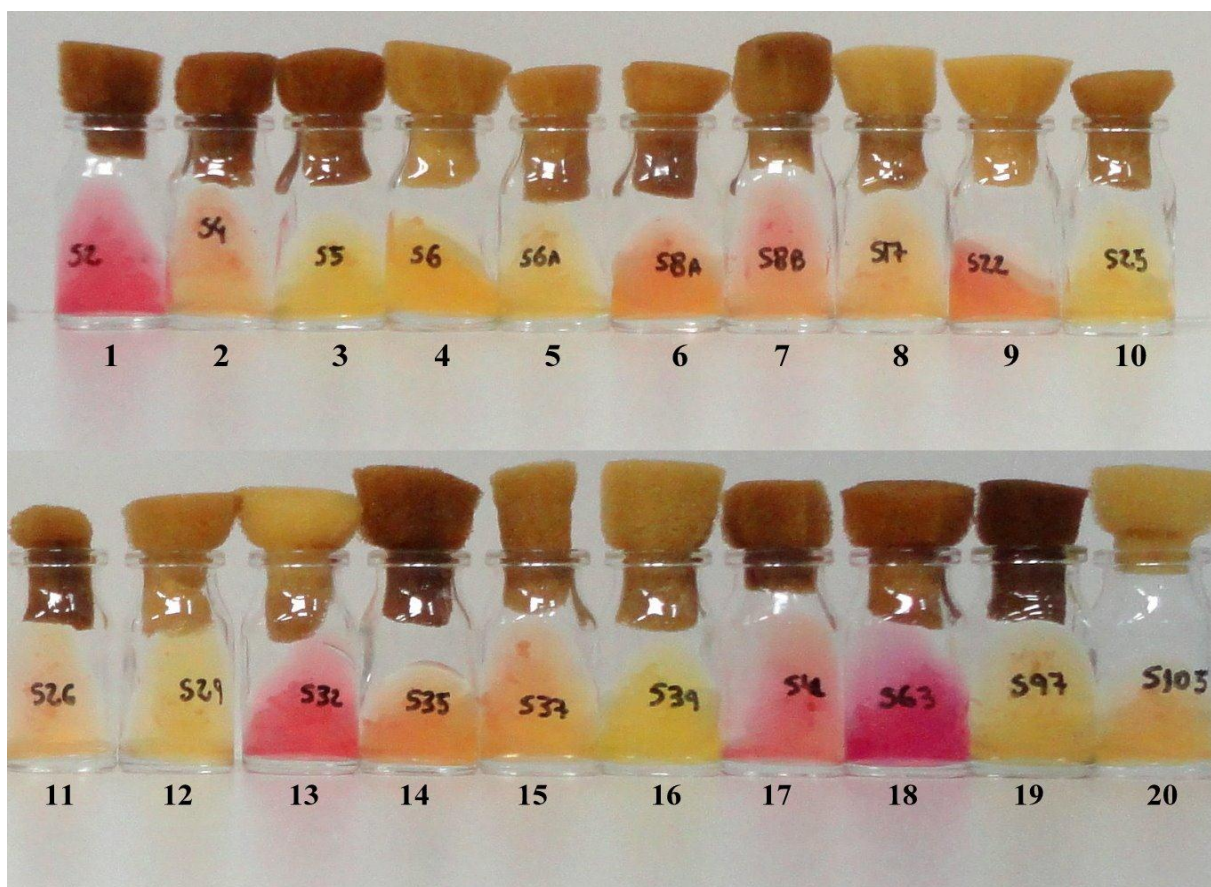


Figura 3: Identificação da atividade de urease das bactérias isoladas de arroz em meio de cultura sólido Uréia Base.(+) rosa e (-) amarelo. Bactérias: 1- Isolado S2; 2- Isolado S4; 3- Isolado S5; 4- Isolado S6; 5- Isolado S6A; 6- Isolado S8A; 7- Isolado S8B; 8- Isolado S17; 9- Isolado S22; 10- Isolado S25; 11- Isolado S26; 12- Isolado S29; 13- Isolado S32; 14- Isolado S35; 15- Isolado S37; 16- Isolado S39; 17- Isolado S41; 18- Isolado S63; 19- Isolado S97; 20- Isolado S105.

Segundo Sousa (2004), a classificação das estirpes de *Pseudomonas* é problemática devido à falta de um sistema taxonômico apurado, porém em seus estudos, descreve bactérias apresentando resultados de citrato positivo e urease negativa. Resultados semelhantes foram encontrados por Magnani (2005), que ao analisar duas espécies de *Pseudomonas ssp.* chegou a mesma conclusão afirmando a presença da enzima *citrato liase* e ausência da enzima urease.

De acordo com Priest e colaboradores (1987) a enzima *citrato liase* faz parte do metabolismo de bactérias da espécie *Bacillus amyloliquefaciens*, o

que proporciona a utilização deste nutriente como fonte de carbono por estas bactérias. Ao mesmo tempo estes micro-organismos não possuem metabolismo de uréia, o que impossibilita a atuação dessa espécie na hidrólise deste nutriente (MURRAY *et al.*, 2000).

6. Teste de Redução de Nitrato.

Quanto ao teste de redução de nitrato, os isolados S4, S6, S6A, S8A, S8B, S22, S25, S26, S32, S35, S37, S97 e S105 apresentaram resultado positivo para a presença de atividade da enzima redutase de nitrato. Este resultado, onde 65% dos isolados de plantas de arroz apresentaram capacidade de metabolizar nitrato, pode indicar que estas estão atuando no processo assimilatório de nitrogênio do meio ambiente. O mesmo foi relatado para 81% dos isolados bacterianos coletados de milho por Ikeda (2010).

Em seus estudos Rocha e colaboradores (2007), destaca o gênero *Pseudomonas* entre as principais bactérias desnitrificantes. Segundo Priest e colaboradores (1987) a espécie *Bacillus amyloliquefaciens* também participa do metabolismo de nitrato onde o reduz a nitrito.

Para Döbereiner (1990), a produção da enzima redutase de nitrato não pode ser atribuída à fixação de N_2 , mas sim a um efeito da bactéria na eficiência do uso do fertilizante nitrogenado, ou seja, as bactérias que não possuem a enzima redutase de nitrato podem fixar N_2 , mesmo na presença de altas concentrações de nitrato no solo ou na planta, fato que favorece a complementação da fertilização nitrogenada com FBN.

7. Teste de protease

No teste de crescimento bacteriano em fontes de carbono, no qual foi adicionado proteína do leite (leite em pó 4%), foi observado que as bactérias positivas para este teste (S6, S25, S29, S35, S37, S41, S63 e S105) também produziram um halo de inibição translúcido característico para presença da enzima proteolítica. Foram observados os halos de degradação e calculado o índice enzimático considerando o diâmetro do halo dividido pelo diâmetro da colônia que apresentaram os índices: S6 (1,72); S25 (1,72); S29 (1,87); S35 (1,8); S37 (1,6); S41 (1,45); S63 (1,4) e S105 (1,33). Por estes resultados os isolados S29 e S35 apresentaram os maiores índices enzimáticos de 1,87 e 1,8, respectivamente indicando que possuem maior capacidade de hidrólise da proteína do leite (Figura 4).



Figura 4: Formação de halo de degradação observado em meio mínimo sólido acrescido de proteínas do leite 4% para os isolados positivos. Bactérias: 1- Isolado S6; 2 - Isolado S25; 3 - Isolado S29; 4 - Isolado S35; 5 - Isolado S37; 6 - Isolado S41; 7 - Isolado S63; 8 - Isolado S105.

Giongo (2006), observou em três linhagens bacterianas *de Bacillus sp.* a atividade proteolítica dos isolados, semelhante à descrita neste estudo,

correlacionando diferentes temperaturas ao tamanho do halo de degradação que variaram estatisticamente entre os isolados. Santos e colaboradores (2010) obtiveram resultados similares com *Bacillus licheniformis* isolados de substratos de manguê.

8. Teste de Crescimento em Fonte de Carbono.

O teste de crescimento em fonte de carbono utilizando a sacarose demonstrou que todas as bactérias avaliadas possuem a enzima sacarase, ou seja, são capazes de degradar a sacarose em glicose e frutose. Quando a fonte adicionada foi o amido, 90% dos micro-organismos apresentaram resultado positivo sendo que as bactérias S26 e S63 foram as únicas que não conseguiram metabolizar esta fonte de carbono. Na presença de frutose, 45% dos isolados apresentaram crescimento. Quando se utilizou celulose e proteína do leite foi observada resposta positiva para 40% dos isolados, na presença de ácido málico 30% dos isolados apresentaram crescimento. Para a presença de inositol e sorbitol 35% dos isolados apresentaram capacidade de crescimento. Já para a utilização de ácido maleico, ácido nicotínico e arabinose esta capacidade foi de 25% e para glicose 20% das bactérias apresentaram resultado positivo. No entanto quando adicionado manitol ao meio mínimo nenhum dos isolados apresentou capacidade de crescimento indicando que as bactérias selecionadas não possuem as enzimas do metabolismo desta fonte de carbono.

Segundo Priest e colaboradores (1987) a espécie *Bacillus amyloliquefaciens* é dotada do metabolismo de degradação de frutose, glucose, glicerol, lactose, maltose, manose, rafinose, sacarose e sorbitol, e é a partir destes nutrientes que a bactéria vai fornecer energia para a planta. Enquanto o gênero *Pseudomonas* possui em seu metabolismo enzimático 95 fontes de

carbono assimiláveis, concluindo assim a amplitude metabólica deste micro-organismo (CHUN *et al.*, 2001).

Com a construção do dendrograma baseado nas fontes de carbono (Tabela 2) foi possível confirmar a grande amplitude metabólica referente a assimilação dos 13 diferentes fontes de carbono, concluindo uma similaridade entre 8 grupos (similaridade maior que 0,58). Os dados de crescimento em diferentes fontes de carbono, agrupados no dendrograma sugerem que os isolados em conjunto apresentaram grande amplitude metabólica, em no máximo 8 fontes, como apresentado pelo isolado S22. Valores maiores ou iguais a 0,50 indicam alta similaridade entre as bactérias. Assim, segundo esse conceito, quanto a assimilação de fontes de carbono distintas a similaridade analisada entre os micro-organismos pode ser considerada alta.

Tabela 2: Teste de crescimento bacteriano em 13 fontes de carbono.

ISOLADO	Sacarose	Amido	Frutose	Proteína do Leite	Celulose	Ácido Málico	Sorbitol	Inositol	Ácido Maleico	Ácido Nicotínico	Arabinose	Glicose	Manitol
S2	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
S4	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
S5	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-
S6	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-
S6A	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
S8A	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
S8B	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-
S17	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
S22	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
S25	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-
S26	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S29	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S32	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S35	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
S37	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
S39	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-
S41	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S63	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-
S97	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
S105	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-

(+) crescimento, (-) ausência de crescimento.

9. Teste de Catalase.

No teste de catalase, todas as amostras apresentaram resultado positivo (Figura 5). Segundo Ikeda (2010), algumas reações bioquímicas, tais como o teste da catalase, podem ser comuns a diversas bactérias não apresentando assim, capacidade discriminatória. Contudo, Rezende, Oliveira e Didonet (2011), descrevem que o teste de catalase com resultado positivo é um dos requisitos para a identificação do gênero *Pseudomonas*, destacando também a necessidade de outros testes moleculares para confirmação da classificação.

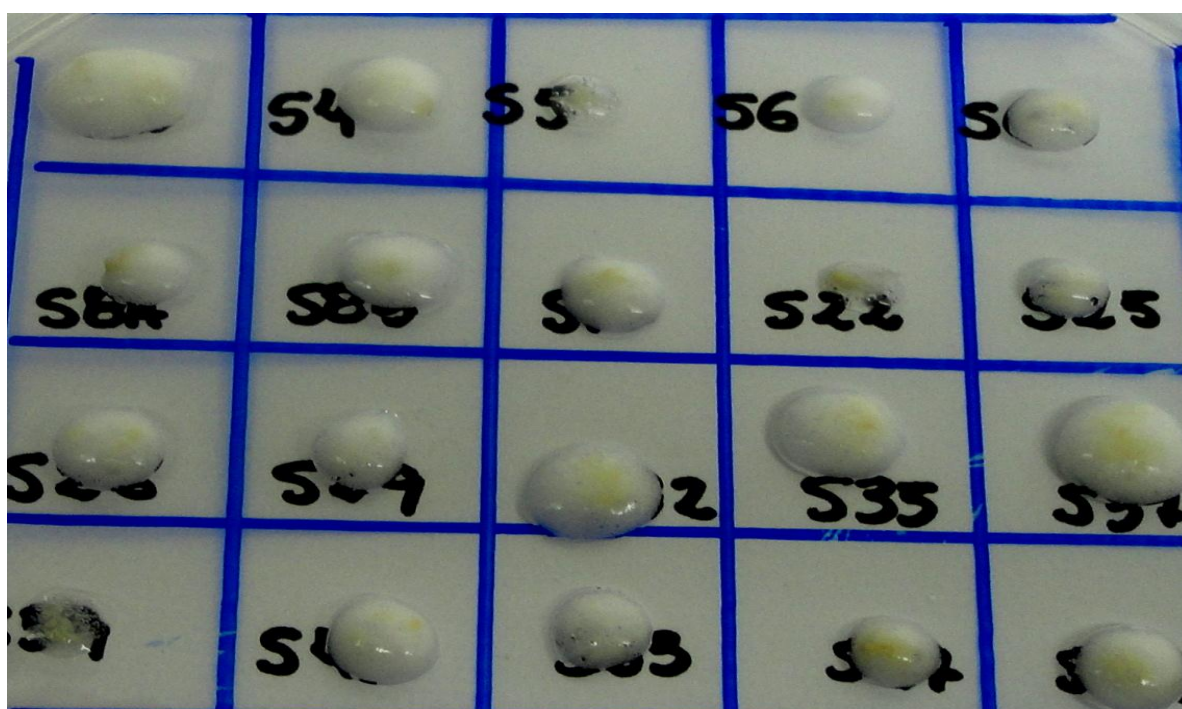


Figura 5: Teste de catalase positivo, com formação de O_2 (bolhas) para as bactérias isoladas de arroz. Bactérias da esquerda para a direita e de cima para baixo: S2, S4, S5, S6, S6A, S8A, S8B, S17, S22, S25, S26, S29, S32, S35, S37, S39, S41, S63, S97 e S105.

A presença da enzima catalase permite a bactéria resistir à oxidação causada pelos metabólitos tóxicos do oxigênio (espécies reativas de oxigênio), podendo ser considerada um mecanismo de proteção desenvolvido pela bactéria. Portanto espécies de bactéria que tem esta enzima como componente de sua

maquinaria metabólica tem uma vantagem adaptativa em relação às demais (SILVA, 2010).

10. Teste de Capacidade de Crescimento em Meio Livre de Nitrogênio.

Pelo teste de crescimento em meio livre de nitrogênio (Figura 6) verificou-se que os isolados S2, S4, S6, S6A, S8A, S8B, S17, S22, S25, S26, S29, S32, S35, S37, S39, S41, S63 e S105 formaram uma película em meio de cultura semi-sólido NFB, indicando a possível capacidade de fixar N_2 em condições micro-aerofílicas, o que deverá ser confirmado com teste para a atividade da enzima nitrogenase. Somente os isolados S5 e S97 não formaram película sendo consideradas incapazes de metabolizar o nitrogênio atmosférico. A alteração de cor no meio está relacionada à mudança do pH pela produção de metabólitos e nada interfere na formação da película (FERNANDES *et al.*, 2012). Segundo Ikeda (2010), a formação da película é indicadora apenas do crescimento bacteriano, pois, quando os isolados formadores de película foram submetidos ao teste da atividade da nitrogenase estes nem sempre apresentaram resultado positivo.

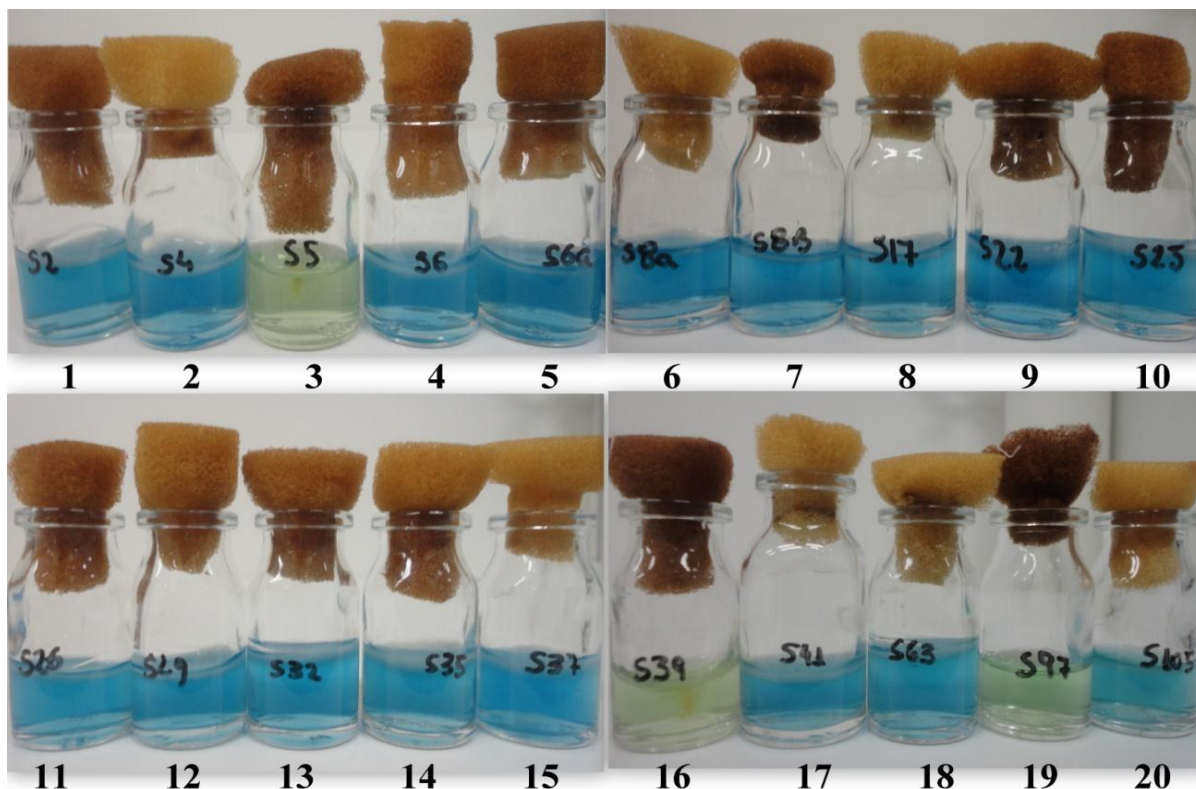


Figura 6: Teste de fixação biológica de nitrogênio com formação de película em meio de cultura semi-sólido NFB livre de nitrogênio das bactérias isoladas de arroz. Bactérias: 1- Isolado S2; 2- Isolado S4; 3- Isolado S5; 4- Isolado S6; 5- Isolado S6A; 6- Isolado S8A; 7- Isolado S8B; 8- Isolado S17; 9- Isolado S22; 10- Isolado S25; 11- Isolado S26; 12- Isolado S29; 13- Isolado S32; 14- Isolado S35; 15- Isolado S37; 16- Isolado S39; 17- Isolado S41; 18- Isolado S63; 19- Isolado S97; 20- Isolado S105.

Em um teste realizado com 98 isolados, todos apresentaram uma película característica na superfície do meio, contudo, somente duas amostras apresentaram o resultado para o teste da atividade da enzima nitrogenase (IKEDA, 2010). Deste modo, só poderemos afirmar que estes isolados que formaram película são fixadores de nitrogênio depois de realizar o teste da atividade desta enzima, mesmo que este já tenha sido relatado para as bactérias dos gêneros *Bacillus* (IDRISS *et al.*, 2002) e *Pseudomonas* (HATAYAMA, *et al.*, 2005) a capacidade de fixação de nitrogênio.

Em relação à caracterização bioquímica, foi observada a diversidade metabólica dos micro-organismos, visto que a maior parte dos micro-organismos metabolizou maioria das fontes de nutrientes testadas. As bactérias caracterizadas como *nir*⁺ são consideradas efetivas na promoção do crescimento vegetal, assim, quanto mais ampla as vias enzimáticas presentes nos micro-organismos, maior o benefício esperado (MURRAY, GRANNER & RODWELL, 2007). Pelos resultados dos testes de atividade para as bactérias gram-positivas foi possível observar atividade da enzima *citrato liase* (57% dos isolados), da enzima urease (14%), da enzima redutase de nitrato (71%); de hidrolases de proteína do leite (43%), e possível atividade fixadora biológica de nitrogênio (93%). Foi observado que as bactérias gram-positivas apresentavam simultaneamente pelo menos duas destas atividades (Figura 7).

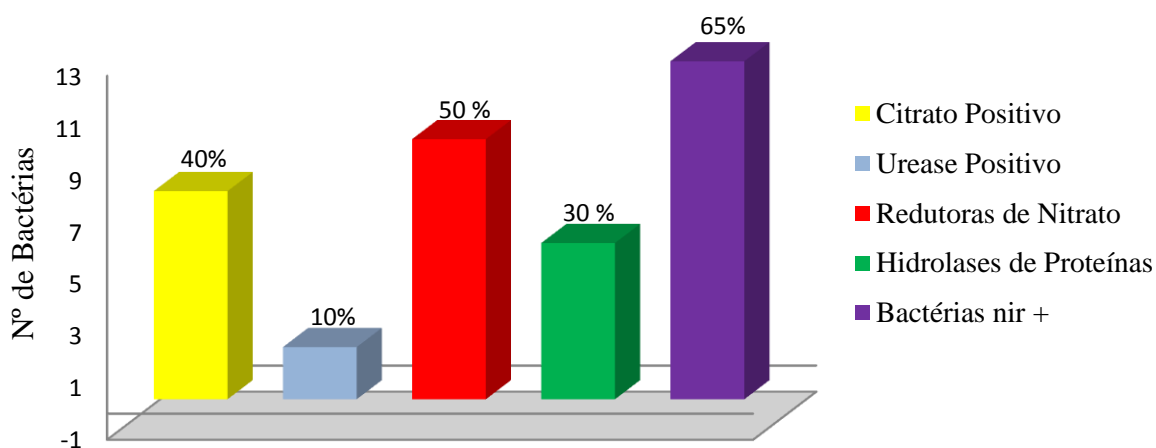


Figura 7: Características bioquímicas das bactérias gram-positivas.

Ao todo os micro-organismos tanto gram-positivos quanto gram-negativos apresentaram atividade de catalase positivo (100%), citrato positivo (45%), redutores de nitrato (65%), urease positivo (20%), hidrolase de proteínas (40%) e potenciais fixadoras biológicas de nitrogênio (85%).

Os micro-organismos que apresentaram atividade enzimática citrato liase também foram caracterizados como gram-positivos, com exceção da bactéria S97 que foi considerada gram-negativa. Os micro-organismos urease positivo (S2, S32 e S41) não apresentaram atividade da enzima citrato liase, como observado habitualmente para os gêneros *Bacillus* (PRIEST *et al.*, 1987) e *Pseudomonas* (SOUSA, 2004). Sendo considerado o isolado S63 uma exceção, pois se apresentou positivo para urease e positivo para citrato.

Tabela 3: Características bioquímicas de 20 bactérias isoladas de arroz.

Isolado	Citrato	FBN	Gram	Nitrato	Urease
S2	-	+	-	-	+
S4	+	+	-	+	-
S5	-	-	+	-	-
S6	-	+	+	+	-
S6A	-	+	-	+	-
S8A	+	+	+	+	-
S8B	-	+	+	+	-
S17	+	+	+	-	-
S22	+	+	+	+	-
S25	-	+	-	+	-
S26	+	+	+	+	-
S29	+	+	+	-	-
S32	-	+	+	+	+
S35	+	+	+	+	-
S37	-	+	+	+	-
S39	-	+	-	-	-
S41	-	+	-	-	+
S63	+	+	+	-	+
S97	+	-	-	+	-
S105	-	+	+	+	-

Teste da enzima urease (IKEDA, 2010), teste de citrato (TEIXEIRA, FERREIRA & SANTOS, 2012), teste de fixação biológica de nitrogênio - FBN (KUSS *et al.*, 2007), teste de gram (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006) e teste de redução de nitrato (JUSTINO *et al.*, 2006).
(+) Resultado positivo, (-) Resultado negativo.

As bactérias caracterizadas como *nir+*, pela possível atividade redutase de nitrato, foram associadas simultaneamente a produção do halo de degradação no teste de proteína do leite como fonte de carbono. Foi possível observar que oito micro-organismos positivos para atividade de protease (Figura 4) também foram considerados *nir+* (Figura 6). Ao passo que os três isolados avaliados como *nir-* foram também classificados como urease positivo.

11. Caracterização Molecular dos Fragmentos de PCR da região BOX.

Das amostras amplificadas, as 20 apresentaram bom perfil de amplificação por BOX-PCR (Figura 8). No perfil de bandejamento dos fragmentos foi possível observar no máximo 9 bandas e no mínimo 6, com diferentes tamanhos e com 5 diferentes perfis entre as amostras.

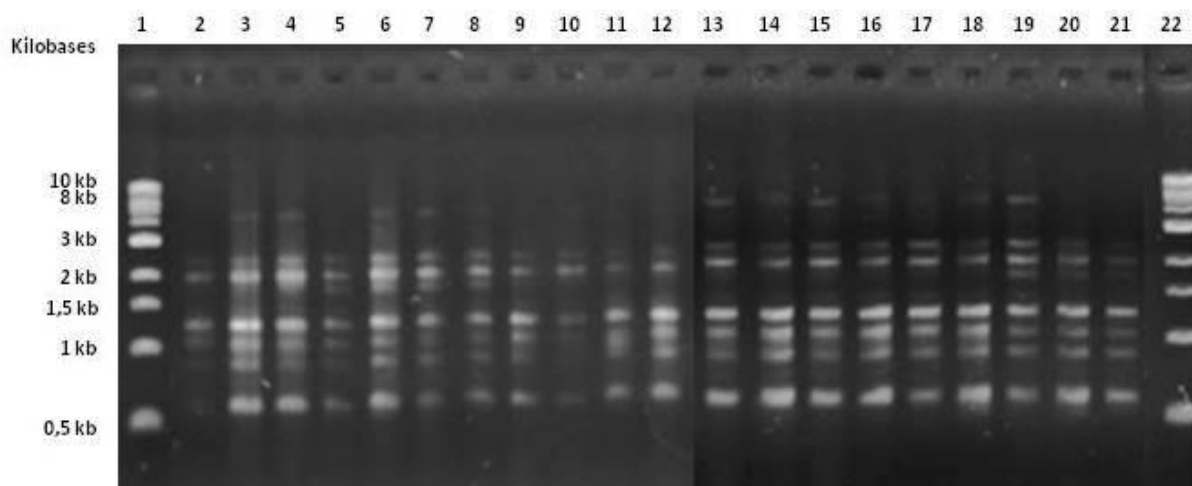


Figura 8: Perfil eletroforético dos 20 isolados bacterianos amplificados por PCR da região BOX (*primer* BOX A1R). Gel de Agarose (0,8%). Marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (BIOLABS). Linha 1- 1kb DNA Ladder; Linha 2 - Isolado S2; Linha 3 - Isolado S4; Linha 4 - Isolado S5; Linha 5 - Isolado S6; Linha 6 - Isolado S6A; Linha 7 - Isolado S8A; Linha 8 - Isolado S8B; Linha 9 - Isolado S17; Linha 10 - Isolado S22; Linha 11 - Isolado S25; Linha 12 - Isolado S26; Linha 13 - Isolado S29; Linha 14 - Isolado S32; Linha 15 - Isolado S35; Linha 16 - Isolado S37; Linha 17 - Isolado S39; Linha 18 - Isolado S41; Linha 19 - Isolado S63; Linha 20 - Isolado S97; Linha 21 - Isolado S105; Linha 22 - 1kb DNA Ladder.

Os índices de similaridade (Figura 9) variaram de 0,72 a 1,00 podendo-se concluir que há alta similaridade entre os isolados bacterianos de arroz estudados. A similaridade analisada entre os micro-organismos pode ser considerada máxima com valor 1,00, para cinco grupos (Figura 9).

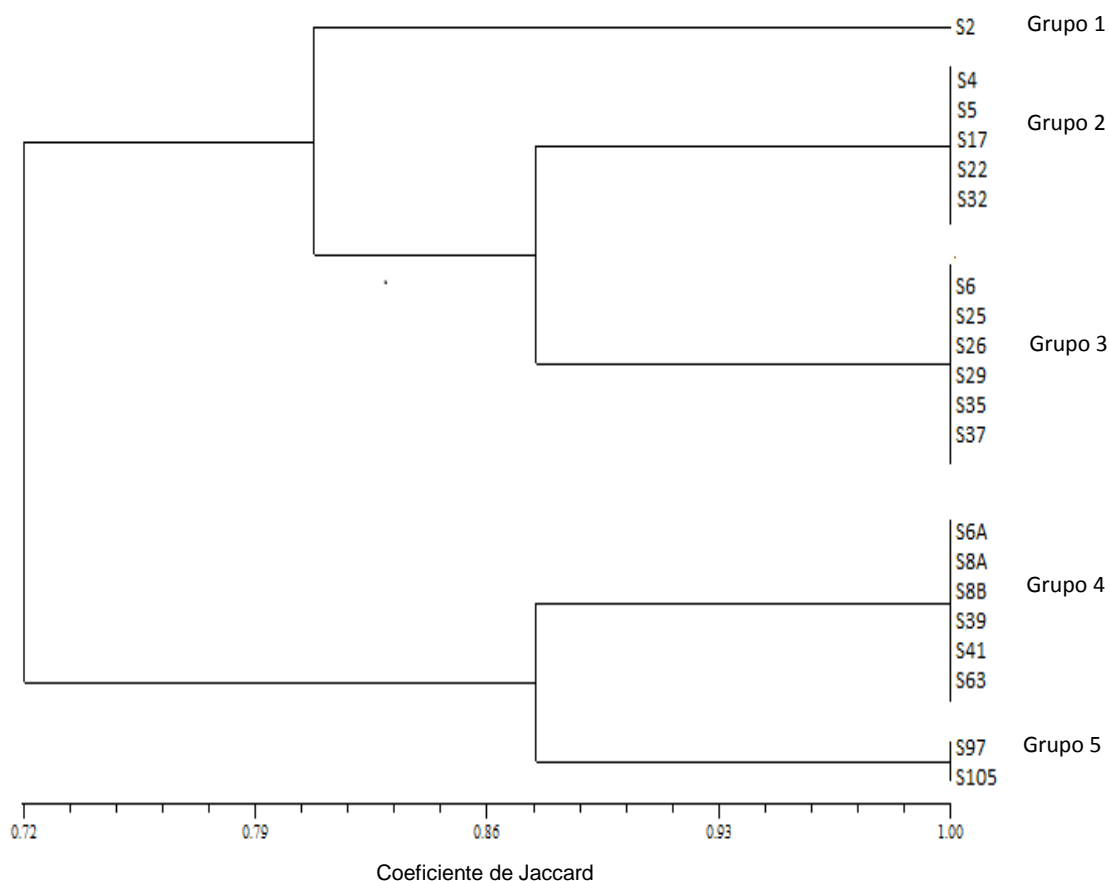


Figura 9: Dendrograma definido pelo método de agrupamento UPGMA utilizando a coeficiente de similaridade de Jaccard com base nos fragmentos amplificados por BOX PCR de 20 bactérias isoladas de arroz.

Em seus estudos Cherif e colaboradores (2002), relataram a presença de 6 a 10 fragmentos em 52 estirpes de seis espécies do grupo *Bacillus cereus*. Da mesma forma, a partir dos dados obtidos podemos inferir que as amostras são diferentes entre si e que há heterogeneidade para esta região repetitiva nas amostras analisadas.

Ao avaliar os fragmentos da região BOX Muedi, Fourie e McLaren (2011), observaram que os fragmentos variaram em tamanho de 400 a 3000 pb para as regiões repetitivas de bactérias da espécie *Pseudomonas syringae*, o que permitiu identificar a estreita relação do grupo de bactérias estudadas.

Os fragmentos obtidos por PCR da região BOX observados para as bactérias estudadas apresentaram tamanhos entre 5882,72 pares de bases (pb) a 569,17 pb.

Os isolados S4, S5, S17, S22 e S32 apresentam um padrão com similaridade de 100% entre si como observado no dendrograma acima. Estes isolados apresentaram 8 bandas bem definidas e com tamanhos aproximados 5882,72 pb, 2346,16 pb, 1943,28 pb, 1209,08 pb, 1006,46 pb, 919,25 pb, 842,265 pb e 569,17 pb respectivamente.

Das bactérias estudadas os isolados S6A, S8A, S8B, S39, S41, S63 também apresentaram 8 bandas com tamanhos aproximados de 5882,72 pb, 2346,16 pb, 1943,28 pb, 1670,87 pb, 1209,08 pb, 1006,46 pb, 842,265 pb e 569,17 pb (Anexo II).

Com um perfil diferente os isolados S6, S25, S26, S29, S35 e S37 se distinguem pela ausência da primeira (5882,72 pb) e quarta banda (1670,87 pb). Já nos isolados S97 e S105 foi observado a ausência das bandas de 5882,72 pb e 919,25 pb. O isolado S6, contudo foi o que apresentou a característica mais peculiar, comparado aos demais, ele se distingue pela ausência de bandas de 5882,72 pb, de 1670,87 pb e de 919,25 pb, que estão presentes na maioria dos isolados.

O BOX-A 1R se mostrou bastante eficiente na discriminação dos isolados por amplificar diferentes fragmentos (Figura 8). Quando comparados os bandeamentos eles se apresentam bem distintos, permitindo a diferenciação

entre espécies de um mesmo gênero (LEMOS, 2009). Em nosso estudo também foi possível observar diferentes perfis para os isolados indicando que os microorganismos possam pertencer a gêneros ou espécies diferentes, mas esta hipótese só poderá ser comprovada depois da análise por sequenciamento do gene 16S rDNA.

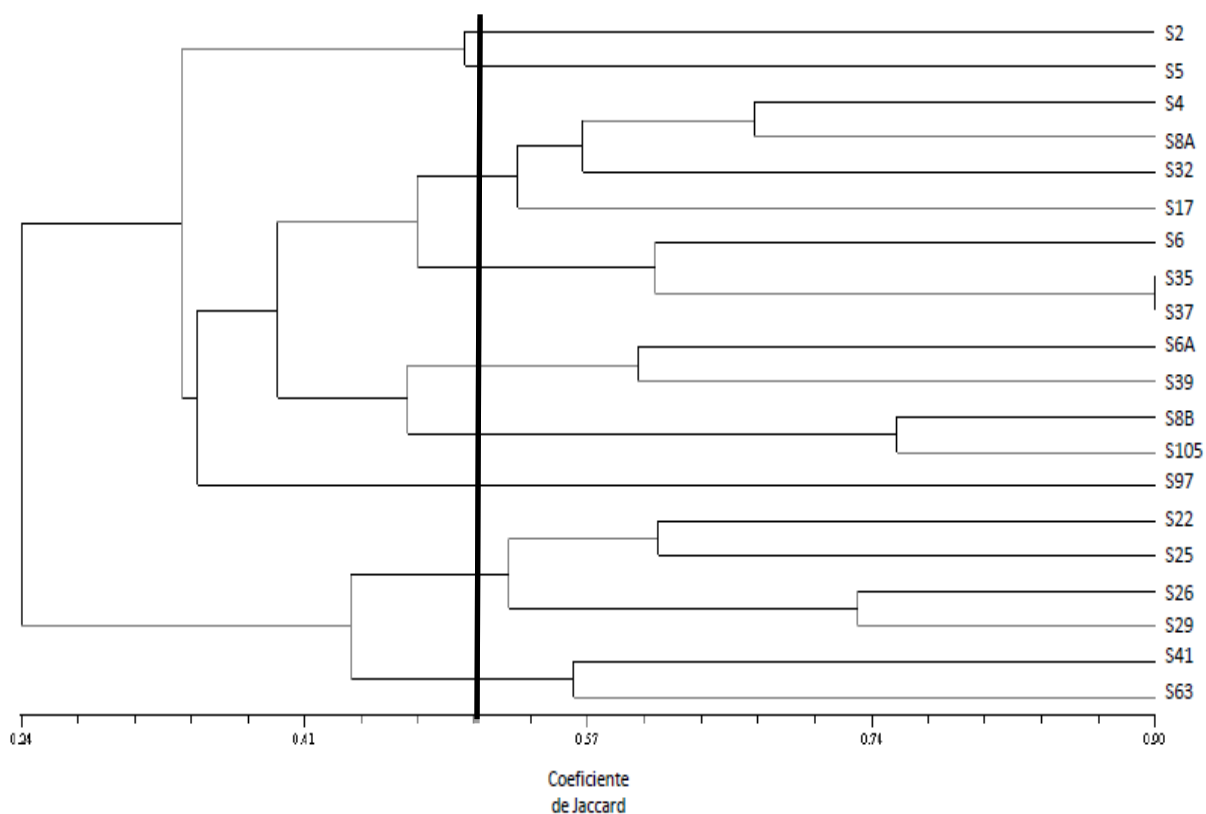


Figura 10: Dendrograma definido pelo método de agrupamento UPGMA utilizando a coeficiente de similaridade Jaccard da assimilação dos testes de fontes de carbono, das características bioquímicas e das características moleculares referentes às 20 bactérias isoladas de arroz.

A partir do dendrograma relacionando as características enzimáticas, assimilação de fontes de carbono e características moleculares (Figura 10) pode-se observar a presença de diversidade da coleção bacteriana, podendo ser correlacionado 6 grupos com similaridade superior a 0,5.

12. Caracterização Molecular dos Fragmentos de PCR da região 16S rDNA.

O gene 16S rRNA é considerado conservado entre as bactérias, mas ao mesmo tempo apresenta variabilidade internas e quantidade de informações suficientes para revelar relações filogenéticas entre as espécies (CHUEIRE *et al.*, 2003).

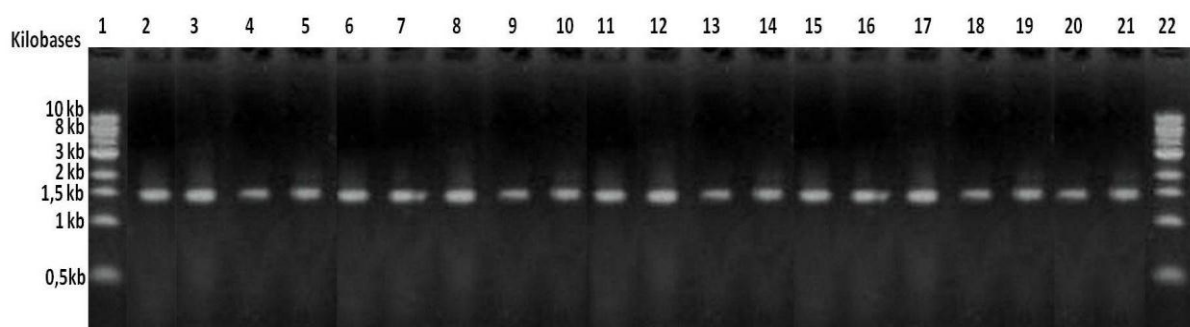


Figura 11: Perfil eletroforético dos 20 isolados bacterianos amplificados por PCR da região 16S rDNA (*primers* Y1 e Y3). Gel de Agarose (0,8%). Marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (BIOLABS). Linha 1- 1kb DNA Ladder; Linha 2 - Isolado S2; Linha 3 - Isolado S4; Linha 4 - Isolado S5; Linha 5 - Isolado S6; Linha 6 - Isolado S6A; Linha 7 - Isolado S8A; Linha 8 - Isolado S8B; Linha 9 - Isolado S17; Linha 10 - Isolado S22; Linha 11 - Isolado S25; Linha 12 - Isolado S26; Linha 13 - Isolado S29; Linha 14 - Isolado S32; Linha 15 - Isolado S35; Linha 16 - Isolado S37; Linha 17 - Isolado S39; Linha 18 - Isolado S41; Linha 19 - Isolado S63; Linha 20 - Isolado S97; Linha 21 - Isolado S105; Linha 22 - 1kb DNA Ladder.

A amplificação do gene 16S rDNA foi realizada em todos os isolados, sendo possível observar um fragmento de 1500pb (Figura 11). Na maioria das bactérias o gene 16S rDNA tem tamanho aproximado de 1500pb. Segundo Toledo (2008), as reações de amplificação da região que codifica o gene 16S rDNA das estirpes de rizóbios estudadas resultaram em fragmentos de em torno de 1,5kb.

Para Pedrinho (2009), a quantificação e visualização do produto de PCR 16S rDNA ao avaliar espécies de *Pseudomonas sp.*, *Herbaspirillum sp.*,

Bacillus sp. entre outros isolados, também observou fragmentos da reação de amplificação da região 16S rDNA de 1500 pb.

13. Sequenciamento do DNA

A diversidade pode ser identificada pelos dados do sequenciamento da região entre aproximadamente 340 e 1390 pares de base do gene 16S, a qual revelou entre 17 isolados do grupo, a presença de três gêneros já descritos como endofíticos promotores de crescimento vegetal: *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas* (Tabela 4).

Após o sequenciamento parcial das amostras, a análise pelo “blast” (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), demonstrou um alto índice de diversidade entre as bactérias que puderam ser classificadas taxonomicamente. Os resultados obtidos entre as sequências amplificadas e as sequências descritas no banco de dados mostraram similaridade acima de 88% o que indica confiabilidade para os resultados (Tabela 4).

Tabela 4: Bactérias isoladas de plantas de arroz, sequenciadas parcialmente para o gene 16S rDNA, e identificação por homologia com sequências deste gene para as bactérias contidas no banco de dados (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Isolados	Pares de bases		Similaridade		
	(pb)	Espécies *	e-value	Acession nº	% ID
S2	343	<i>Bacillus megaterium</i>	8e-129	NR_043401.1	94
S4	1429	<i>Xanthomonas translucens</i>	0	NR_036968.1	88
S5	1374	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0	NR_041455.1	97
S6	810	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0	NR_041455.1	99
S6A	1365	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0	NR_041455.1	98
S8A	1337	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0	NR_041455.1	88
S17	1384	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0	NR_041455.1	97
S22	920	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	0	NR_041715.1	89
S26	1388	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0	NR_041455.1	98
S29	1367	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0	NR_041455.1	98
S32	799	<i>Bacillus subtilis</i>	0	NR_027552.1	99
S37	1359	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0	NR_041455.1	98
S39	1292	<i>Pseudomonas rhizosphaerae</i>	0	NR_029063.1	88
S41	1379	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0	NR_041455.1	97
S63	1376	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0	NR_041455.1	98
S97	1392	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0	NR_041455.1	97
S105	1379	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0	NR_041455.1	98

O isolado bacteriano S2 foi sequenciado com os *primers* Y1 e Y2, que fornece um fragmento de amplificação com cerca de 300 pares de bases, e a identificação apresentou a menor similaridade com o gênero *Bacillus*. Este isolado deverá ser sequenciado novamente utilizando os primers Y1 e Y3, para confirmação da espécie. Já os demais isolados foram sequenciados com os

primers Y1 e Y3, o que possibilitou a amplificação de uma sequência maior de nucleotídeos.

Dos 20 isolados utilizados no trabalho apenas 17 tiveram o gene 16S rDNA parcialmente sequenciado parcialmente o gene 16S rDNA. Foram identificados dois isolados como pertencentes ao gênero *Pseudomonas* e os 15 restantes como bactérias do gênero *Bacillus*. Os isolados S22 e S39 apresentaram uma similaridade de 89% e 88% respectivamente, com as sequências de espécies de *Pseudomonas*, indicando que estes resultados devem ser confirmados com um novo sequenciamento desta região para confirmar a identificação da espécie. Mas a análise do agrupamento filogenético corroborou para a hipótese que estes isolados pertencem ao gênero *Pseudomonas*. Já pelos dados obtidos para os demais isolados considerados do gênero *Bacillus* a similaridade foi superior a 88%.

Resultados semelhantes foram obtidos por Ikeda (2010), que identificaram uma diversidade abundante e complexa de endofíticos do milho. Através da extração total do DNA dos micro-organismos de cultivar de arroz e posteriormente sequenciamento do gene 16S rDNA identificaram quatro gêneros: *Pantoea*, *Bacillus*, *Burkholderia* e *Klebsiella*. Constatando alta variabilidade entre os isolados em todos os parâmetros avaliados, confirmando que populações com elevado grau de diversidade morfofisiológica e genética se estabelecem endofiticamente com o milho.

Muthukumarasamy e colaboradores (2006), isolaram e caracterizaram linhagens selvagens de arroz inundado da Coreia, identificando-os a partir do sequenciamento da região 16S rDNA do genoma bacteriano, desta forma isolados dos gêneros *Burkholderia sp.*, *Herbaspirillum sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Azospirillum sp* e *Gluconacetobacter sp.*, foram isolados e identificados

concluindo a diversidade de micro-organismos diazotróficos presentes em variedades de arroz irrigado.

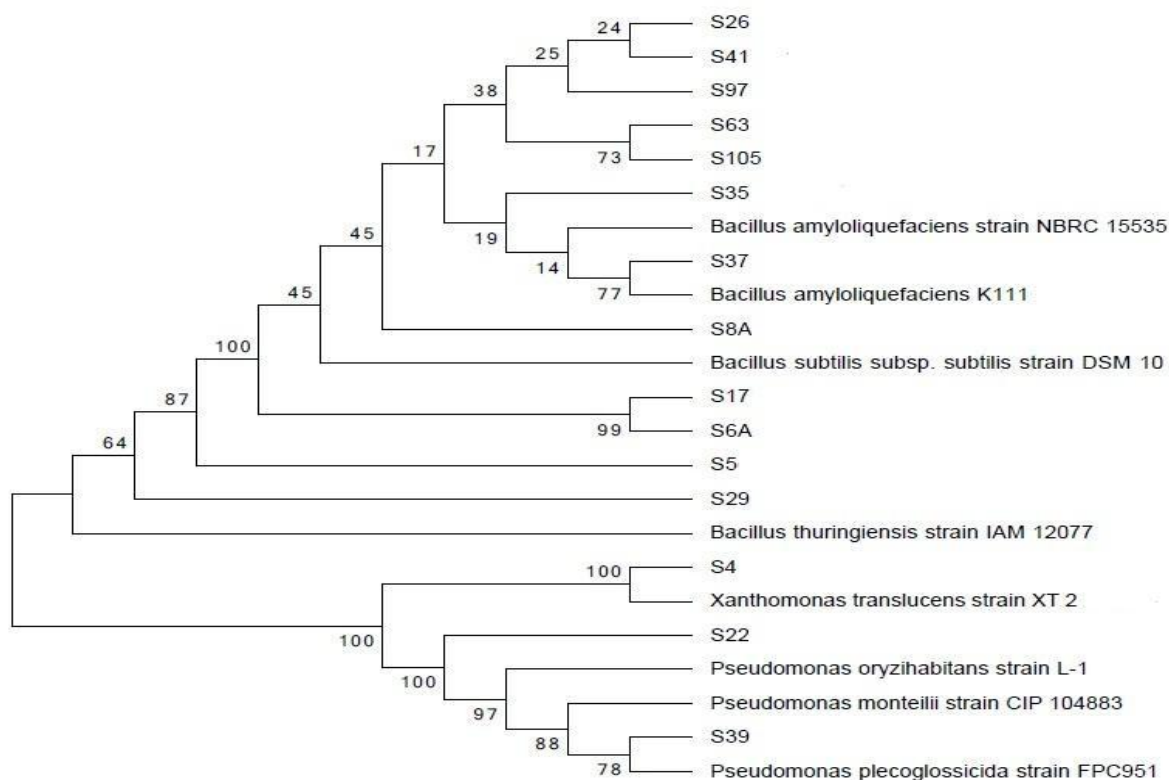


Figura 12: Dendrograma definido pelo método UPGMA (SNEATH, 1973) para a análise molecular filogenética de 15 isolados de plantas de arroz pelos dados de sequenciamento da região 16S rDNA comparados à 8 sequências de bactérias utilizados como grupos de comparação deste gene, disponíveis no banco de dados NCBI. A árvore ótima com a soma do comprimento dos ramos = 0.44575258 é mostrada na figura acima. A porcentagem de árvores replicadas onde a taxa associada de agrupados no teste de *bootstrap* foram de 1000 réplicas (FELSENSTEIN, 1985). As distâncias evolutivas foram calculadas utilizando o método de Nei Tajima (TAJIMA & NEI, 1984) sendo estas unidades do número de substituições de bases por local. A análise envolveu 23 sequências de nucleotídeos. Todas as posições que com lacunas foram eliminadas. Houve um total de 567 posições no conjunto de dados final. As análises foram realizadas no programa MEGA5 (TAMURA *et al.*, 2011).

Nesta análise (Figura 12) foram comparados as sequências obtidas da região 16S rDNA com as disponíveis no banco de dados NCBI, sendo utilizadas sequências comparativas (8 bactérias *out group*), com alta similaridade obtidas pelo BLAST. Por estes resultados houve uma separação nítida entre os dois gêneros obtidos *Bacillus* e *Pseudomonas*. Entre os isolados considerados do gênero *Bacillus*, a diversidade foi considerada alta, sendo que dos 5 grupos com similaridade maior que 50%, três foram observados para este gênero. A maior parte dos isolados foi considerado *Bacillus amyloliquefaciens*.

Há poucos relatos da presença de bactérias do gênero *Bacillus* associado à raiz de arroz e não há relatos da presença da espécie de *B. amyloliquefaciens*, o que demonstra a necessidade de estudos da microbiota endofítica associada ao arroz.

Com o desenvolvimento deste trabalho, foi possível observar a diversidade metabólica e genética de bactérias isoladas de plantas de arroz cultivadas no Cerrado. A diversidade de bactérias endofíticas associadas arroz no Bioma Cerrado é pouco estudada e este estudo traz novas perspectivas para o estudo da ecologia e entendimento das interações planta/bactérias neste ecossistema. Estes resultados poderão ainda ser utilizados na seleção de bactérias promotoras de crescimento vegetal para serem utilizadas como inoculantes para a cultura do arroz no Cerrado goiano.

CONCLUSÕES

- Os micro-organismos endofíticos selecionados, isolados de plantas de arroz apresentam morfologia distinta, possibilitando a divisão dos mesmos em dois grupos.
- Os testes bioquímicos dos micro-organismos revelam ampla diversidade metabólica.
- Os micro-organismos apresentam atividade de enzimas do ciclo do nitrogênio indicando que estas podem se associar as plantas e promover o crescimento vegetal.
- A técnica de BOX-PCR é eficiente na caracterização dos isolados separando-os em 5 grupos e demonstrando a variabilidade genética destas bactérias.
- Não é possível a distinção entre os isolados somente pela técnica de PCR dos genes 16S rDNA.
- A partir do sequenciamento parcial do gene 16S rDNA foi possível observar a distinção de 5 grupos pelo dendrograma de similaridade pelo método da máxima verossemelhança, podendo demonstrar a variabilidade genética entre os isolados de arroz.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; ACHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiology Reviews**, Washington, v.59, p.143-169, 1995.

ANANDHAM, R.; CHOI, K. H.; GANDHI, P. I.; YIM, W. J.; PARK, S. J.; KIM, K. A.; MADHAIYAN, M. Evaluation of shelf life and rock phosphate solubilization of *Burkholderia sp.* in nutrient-amended clay, rice bran and rock phosphate-based granular formulation. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, New York, v.23, n.8, p.1121-1129, 2007.

ARAÚJO, R. F.; MUNHOZ, R. E. V.; HUNGRIA, M. Início da Nodulação em Sete Cultivares de Feijoeiro Inoculadas com Duas Estirpes de *Rhizobium*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.31, n.6, p.435-346, 1996.

AUSEBEL, F.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E. Short Protocols in Molecular Biology. **John Wiley & Sons**, New York, v.3, n.4, p.1-11, 1999.

BIRCH, R. G. *Xanthomonas albilineans* and the antipathogenesis approach to disease control. **Molecular Plant Pathology**, London, v.2, n.1, p.10-15, 2001.

BOCKMAN, O.C. Fertilizers and biological nitrogen fixation as sources of plant nutrients: perspectives for future agriculture. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.19, n.4, p.11-14, 1997.

BRENCIC, A.; WINANS, S.C. Detection of and Response to Signals Involved in Host-Microbe Interactions by Plant-Associated Bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v.69, n.9, p.155-194, 2005.

CAVALLET, L. E.; PESSOA, A. C. S.; HELMICH, J. J.; HELMICH, P. R.; OST, C. F. Produtividade do milho em resposta à aplicação de nitrogênio e inoculação das sementes com *Azospirillum spp.* **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.4, n.1, p.129-132, 2000.

CHANG, H. C.; WEI, Y. F.; DIJKSHOORN, L.; VANECHOUTTE, M.; TANG, C. T.; CHANG, T. C. Species-Level Identification of Isolates of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* Complex by Sequence Analysis of the 16S-23S rRNA Gene Spacer Region. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.43, n.4, p.1632-1639 2005.

CHERIF, A.; BORIN, S.; RIZZI, A.; OUZARI, H.; BOUDABOUS, A.; DAFFONCHIO, D. Characterization of a repetitive element

polymorphism polymerase chain reaction chromosomal marker that discriminates *Bacillus anthracis* from related species. **Journal of Applied Microbiology**, v.93, n.3, p.456-462, 2002.

CHOUHDURY, A. T. M. A.; KENNEDY, I. R. Prospects and potentials for systems of biological nitrogen fixation in sustainable rice production, **Biology and Fertility of Soils**, Berlim, v.39,n.7, p.219-227, 2004.

CHRISTENSEN, W. B. **Urea Agar Base**. Disponível em: <http://www.microtradeuk.com/images/U.pdf?osCsid=e502e88fb6ddc77f7d9ab484a4584c2f>. Acesso em: Jan/2012.

CHUEIRE, L. M. O.; NISHI, C. Y. M.; LOUREIRO, M. F.; HUNGRIA, M. Identificação das estirpes de *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* utilizadas em inoculantes comerciais para as culturas da soja e do feijoeiro pela técnica de PCR com “primers” aleatórios ou específicos. **Tropical Agriculture**, Mato Grosso, v.4, n.9, p.80-95, 2000.

CHUEIRE, L. M. O. E.; BANGEL, V.; MOSTASSO, F. L.; CAMPO, R. J.; PEDROSA, F. O.; CHUN, J.; RHEE, M.; HAN, J.; BAE, K. S. *Arthrobactersiderocapsulatus* Dubinina and Zhdanov 1975^{AL} is a later subjective y non y mof *Pseudomonas putida* (Trevisan 1889) Migula 1895^{AL}. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, United Kingdom, v. 51, n.2, p.169-170, 2001.

COGO, L. L. **Caracterização molecular de genes de virulência de isolados clínicos de *Helicobacter pylori* determinação da atividade antimicrobiana *in vitro* de diferentes fitoterápicos utilizados na medicina popular brasileira**. (2008). 107f. Dissertação (Doutorado em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná, UFP, Curitiba, 2008.

COSTA, C. **Botânica Ilustrada**. 3ed. Belo Horizonte: Editora do Brasil, 320p, 1965.

CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J. & CARNEIRO, P.C.S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 1ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 480p, 2004.

DALLA SANTA, O.R, SOCCOL, C.R., JUNIOR, P.R., HERNÁNDEZ, R.H, ALVAREZ, G.L.M, DALLA SANTA, H.S. and PANDEY, A. Effects of inoculation of *Azospirillum sp.* in maize seeds under field conditions. **Journal of Food Agriculture and Environment**, Finland, v.2, n.1, p.238-242, 2004.

DASHI, N. Plant growth promoting rhizobacteria accelerate nodulation and increase nitrogen fixation activity by field grown soybean (*Glycine max L. Merr*) under short season conditions. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.200, n.13, p.205-213, 1998.

DIDONET, A.D.; DIDONET, C. C. G.M.; GOMES, G. F. Avaliação de Linhagens de Arroz de Terras Altas Inoculadas com *Azospirillum lipoferum* Sp59b e *A. brasilense* Sp245. **Comunicado Técnico 69**, Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, 2003.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Washington, v.22, n.2, p.107-149, 2003.

DÖBEREINER, J.; RUSCHEL, A.P. Uma nova espécie de *Beijerinckia*. **Revista de Biologia**, Lisboa, v.1, n.2, p.261-272, 1958.

DÖBEREINER, J.; DAY, J.M. Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and nitrogen-fixing sites, **Plant and Soil**, Dordrecht, v.141, n.14, p.18-23, 1976.

DÖBEREINER, J. Avanços recentes na pesquisa em fixação biológica de nitrogênio no Brasil. **Estudos Avançados**, Ribeirão Preto, v.4, n.8, p.144-152, 1990.

DÖBEREINER, J.; ANDRADE, V. O.; BALDANI, V. L. D. **Protocolos para Preparo de Meios de Cultura da Embrapa Agrobiologia**. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 110), Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 38p, 1999.

FERNANDES JR, P. I.; AIDAR, S. T.; MORGANTE, C. V.; GAVA, C. A. T.; ZILLI, J. E.; MARTINS, L. M. V. **Diversidade Fenotípica de Bactérias Diazotróficas Associadas à Gramínea Tolerante à Dessecação *Tripogonspicatus* na Caatinga**. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/911537>. Acesso em: Jan/2012.

FERREIRA, J. S. **Inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* em Duas Variedades de Arroz Irrigado: Qualidade do Inoculante e Necessidade da Reinoculação**. 2008. 85f. Dissertação (Doutorado em Ciências e Agronomia) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, UFRRJ, Seropédica, 2008.

FERREIRA, E. P. B.; VOSS, M.; SANTOS, H.P.; POLLI, H.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Diversidade de *Pseudomonas fluorescentes* em diferentes sistemas de manejo do solo e rotação de culturas. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v.4, n.2, p.140-148, 2009.

FELSENSTEIN, J. **Confidence limit son phylogenies: An approach using the bootstrap.** *Evolution* 39:783-791. 1985.

FIGUEIREDO, M. V.; SELDIN, L.; ARAUJO, F.F.; MARIANO, R. L. R. **Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Fundamentals and Applications** (2010). Disponível em: www.springer.com/9783642136115-c1.pdf. Acesso em: Jan/2012.

FONSECA, M. C. C.; ZAGO, V. C. P.; FERREIRA, E. P. B.; CÂMARA, A. F. S.; RUMJANEK, N. G. Isolamento e Caracterização Morfológica de *Pseudomonas spp.* Fluorescentes Nativas em Sistemas de Produção Agrícola. **Comunicado Técnico 43**, Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goias, GO, 2000.

FREITAS, A. D. S.; VIEIRA, C. L.; SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P.; LYRA, M. C. C. P. Caracterização de rizóbios isolados de jacatupé cultivado em solo salino do estado de Pernambuco, Brasil. **Bragantia**, Campinas, v.66, n.3, p.497-504, 2007.

GALDIANO JR, R.F.; PEDRINHO, E. A. N.; CASTELLANE, T. C. L.; LEMOS, E. G. M. Auxin-producing bacteria isolated from the roots of *Cattleya walkeriana*, an endangered brazilian orchid, and their role in acclimatization. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.35, n.2, p.729-737, 2011.

GIONGO, J. L. **Caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de *Bacillus sp.*** 2006. 95f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Agronomia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, PUCRS, Porto Alegre, 2006.

GOMES, A. M. A.; MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; MESQUITA, J. C. P. Isolamento, seleção de bactérias e efeito da utilização de *Bacillus spp.* na produção de mudas orgânicas de alface. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.21, n.4, p.699-703, 2003.

GRAY, E.J.; SMITH, D. L. Intracellular and extracelular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. **Soil Biology And Biochemistry**, Oxford, v.37, n.2, p.395-412, 2005.

GRIGOLETTI JR, A.; SANTOS, A. F.; AUER, G. Perspectivas do Uso do Controle Biológico Contra Doenças Florestais. **Embrapa florestas**, Colombo, v.30, n.12, p. 435-344, 2000.

GUIMARÃES, S. L.; GRAÇA, C. O.; SILVA, R. A.; SANTOS, C. C. R.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Efeito da inoculação

de bactérias diazotróficas endofíticas na cultura de arroz sob condições de campo. **Fertbio98**. Interrelação Fertilidade, Biologia do Solo e Nutrição de Plantas: Consolidando um Paradigma. Caxambu, 11 a 16 de Outubro, Resumo 737, p. 791, 1998.

GUIMARÃES, S. L.; SABINO, D. C. C.; FERREIRA, J. S.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. Efeito da inoculação de estirpes de *Burkholderia spp.* em 3 cultivares de arroz inundado crescidas em condições gnotobióticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, n.5, p.657-662, 2000.

GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em arroz de sequeiro. **Agronomia**, Rio de Janeiro, v.37, n.2, p.25-30, 2003.

HALL, T. **BioEdit – Biological sequence alignment editor for Windows95/98/NT/2K/XP**.(2005). Disponível em: <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>. Acesso em: Jan/2012.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzymes production by fungi. **Mycologia**, v. 67, n. 3, p. 597-607, 1975.

HARA, F. A. S.; OLIVEIRA, L. A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos de Iranduba, Amazonas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, n.7, p.667-672, 2005.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T.; SUHET, A. R.; PERES, J. R. R. Fixação biológica do nitrogênio na soja. In: ARAÚJO, R. S.; HUNGRIA, M. (Ed.). **Microorganismos de importância agrícola**, Brasília, Embrapa-SPI, p.1-236, 1994.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I.E. Fixação biológica do nitrogênio com a cultura de soja. **Workshop Nitrogênio na sustentabilidade de sistemas intensivos de produção agropecuária**, p. 51-75, Dourados-MS, 2000.

IDRISS, E. E.; MAKAREWICZ, O.; FAROUK, A.; ROSNER, K.; GREINER, R.; BOCHOW, H.; RICHTER, T.; BORRISS, R. Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect. **Microbiology**, United Kingdom, v.48, n.3 p.2097-2109. 2002.

IKEDA, A. C.; **Morfofisiológica e Genética de Bactérias Endofíticas Isoladas de Raízes de Diferentes Genótipos de Milho**. 2010. 100f. Dissertação (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Paraná, UFP, Curitiba, 2010.

INNIS, M. A.; MYAMBO, K. B.; GELFAND, D. H.; BROW, M. A. D. DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction amplified DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA, v.85, n.1, p.9436-9440, 1988.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **IBGE**, 2012. Acesso Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: jan/2012.

JAWETZ, M.; ADEBERG, B.; MELNICK, E. **Microbiologia Médica**. 20.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 1998.

JETIYANON, K.; KLOEPPER, J. W. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria for induction of systemic resistance against multiple plant diseases. **Biological Control**, New York, v.24, n.3, p.285-291, 2002.

JI, P.; CAMPBELL, H.L.; KLOEPPER, J.W.; JONES, J.B.; SUSLOW, T.V.; WILSON, M. Integrated biological control of bacterial speck and spot of tomato under field conditions using foliar biological control agents and plant growth-promoting rhizobacteria. **Biological Control**, New York, v.36, n.3, p.358-367, 2006.

JIMENEZ, S. T.; FUENTES, R. L. E.; TAPIA, H. A.; MASCARUA, E. M. A.; MARTINEZ, R. E.; CABALLERO, M. J. *Coffea arabica L.*, a new host plant for *Gluconacetobacter diazotrophicus* and isolation of other nitrogen-fixing acetobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, n.1, p.3676-3683, 1997.

JOHNSON, Y. A.; NAGPAL, M.; KRAHMER, M. T.; FOX, K. F.; FOX, A. Precise molecular weight determination of PCR products of the rRNA intergenic spacer region using electrospray quadruple mass spectrometry for differentiation of *B. subtilis* and *B. atrophaeus*, closely related species of bacilli. **Journal of Microbiological Methods**, New York, v.40, n.1, p.241-254, 2000.

JUKES T.H.; CANTOR C.R. **Evolution of protein molecules**. In MUNRO H. N editor, Mammalian Protein Metabolism. Academic Press, New York, p. 21-132, 1969.

JUSTINO, G. C.; CAMBRAIA, J.; OLIVA, M. A.; OLIVEIRA, J. A. Absorção e redução de nitrato em duas cultivares de arroz na presença de alumínio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.3, p.1985-1990, 2006.

KASCHUK, G.; HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S.; CAMPO, R.J. Genetic diversity of rhizobia associated with common bean grown under the no-tillage

and conventional systems in South Brazil. **Applied Soil Ecology**, USA, v.32, n.2, p.210-220, 2006.

KERBAUY, G. B.; **Fisiologia Vegetal**. São Paulo: Guanabara koogan, 2004.

KERSTERS, K.; LUDWIG, W.; VANCANNEYT, M.; VOS, P.; GILLIS, M.; SCHLEIFER, K. H. Recent changes in the classification of the *Pseudomonas*: an overview. **Systematic and Applied Microbiology**, United Kingdom, v.19, p.465-477, 1996.

KING, E. O.; WARD, M. K.; RANEY, D. E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, USA, v.44, n.2, p.301-307, 1954.

KUSS, A. V. **Fixação de nitrogênio por bactérias diazotróficas em cultivares de arroz irrigado**. 2006. 110f. Dissertação (Doutorado em Ciências do Solo) - Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Santa Maria, 2006.

KUSS, A. V.; KUSS, V. V.; LOVATO, T.; FLORES, M. L. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indol acético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.10, p.1459-1465, 2007.

LADHA J. K.; REDDY, P. M.. Nitrogen fixation in rice systems: state of knowledge and future prospects, **Plant and Soil**, Dordrecht, v.252, n.1, p.151-167, 2003.

LEMOS, M. T. O.; **Prospecção de Rizobactérias Promotoras de Crescimento em Quatro Espécies Arbóreas Nativas do Brasil**. 2009. 59f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Universidade Estadual Paulista, UNESP, Jaboticabal, 2009.

MADIGAN, J. M.; MARTINKO, P. V.; DUNLAP, D. P. CLARK, M. T. **Microbiologia de Brock**. 12ed, Porto Alegre: Artmed, 2010.

MAGNANI, G. S. **Diversidade de Bactérias Endofíticas em Cana-de-Açúcar**. 2005. 93f. Dissertação (Mestrado em Ciência - Bioquímica) - Universidade Federal do Paraná, UFP, Curitiba, 2005.

MARQUES, A. S. A.; MARCHAISON, A.; GARDAN, L.; SAMSON, R. BOX-PCR-based identification of bacterial species belonging to *Pseudomonas syringae* - *P. viridiflava* group. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.31, n.1, p.106-115, 2008.

MARTIN B.; HUMBERT O.; CAMARA M.; GUENZI E.; WALKER J.; MITCHELL T.; ANDREW P.; PRUDHOMME M.; ALLOING G.; HAKENBECK R.; MORRISON D. A.; BOULNOIS G. J.; CLAVERYS J.P. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*, **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.20, n.2, p.3479-3483, 1992.

MARTINATI, J. C.; PACHECO, F. T. H.; MIRANDA, V. F. O.; TSAI, S. M. 16S-23S rDNA: Polymorphisms and their use for Detection and Identification of *Xylella fastidiosa* Strains. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.38, n.1, p.159-165, 2007.

MEINTANIS, C.; CHALKOU, K. I.; KORMAS, K.; LYMPEROPOULOU, D. S.; KATSIFAS, E. A.; HATZINIKOLAOU D. G. KARAGOUNI, A. D. Application of rpoB sequence similarity analysis, REP-PCR and BOX-PCR for the differentiation of species within the genus *Geobacillus*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.46, n.5, p.395-401, 2008.

MELLO, I. S. **Rizobactérias**. Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura_e_meio_ambiente/arvore/CONTAG01_53_210200792814.html. Acesso em: Abr/2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Técnica de Coloração de Gram**. Brasília, p 1- 67, 2001.

MOREIRA, F. M. M.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 1ed. Lavras: Editora da UFLA, 2006.

MUEDI, H. T. H.; FOURIE, D.; MCLAREN, N. W. Characterization of bacterial brown spot pathogen from dry bean production areas of South Africa. **African Crop Science Journal**, Kampala, v.19, n.4, p.357-367, 2011.

MUTHUKUMARASAMY, R.; GOVINDARAJAN, M.; VADIVELU, M.; REVATHI, G. N-fertilizer saving by the inoculation of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* sp. in micro propagated sugarcane plants. **Microbiological Research**, United Kingdom, v.161, p.238-245, 2006.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; KABAYASHI, G. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2000.

MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; RODWELL, V. W. **Harper: Bioquímica Ilustrada**. 27ed, São Paulo: Mc Graw-Hill, 2007.

NEYRA, C. A.; HAGEMAN, R. H. Relationships between carbon dioxide, malate, and nitrate accumulation and reduction in corn (*Zea mays* L.) seedlings. **Plant Physiology**, United Kingdom, v.58, n.7, p.726-730, 1976.

OLIVEIRA, E. C. **Introdução á Fisiologia Vegetal**. 2ed, São Paulo: Ed. da Universidade Federal de São Paulo, 2003.

OLIVEIRA, L. M.; PAIVA, R.; ALOUFA, M. A. I.; CASTRO, E. M.; SANTANA, J. R. F.; NOGUEIRA, R. C. Efeitos de citocininas sobre a anatomia foliar e o crescimento de *Annona glabra* L. durante o cultivo *in vitro* e *ex vitro*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.5, p. 1447-1451, 2008.

PACHECO, F. **Sequenciamento, identificação e análise de genes de arroz envolvidos na interação com *Herbaspirillum seropedicae***. 2008. 77f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Paraná, UFP, Curitiba, 2008.

PALLERONI, N. J. The *Pseudomonas* Story. **Environmental Microbiology**, United Kingdom, v.12, n.6, p.1377-1383, 2010.

PEDERSOLI, J. L. **Botânica**. 5ed, Belo Horizonte: Lê, 1967.

PEDRINHO, E. A. N. **Isolamento e Caracterização de Bactérias Promotoras de Crescimento em Milho (*Zea mays* L.)**. 2009. 87f. Dissertação (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Estadual Paulista, UNESP, Jaboticabal, 2009.

PEREIRA, M. D.; BRASIL, M. S. **Caracterização morfofisiológica de rizóbio nativo de leguminosa forrageira do pantanal sul mato-grossense**. Disponível em: <http://www.propp.ufms.br/gestor/titan.php?target=openFile&fileId=621>. Acesso em: Jan/2012.

PRIEST, F. G.; GOODFELLOW, M.; SHUTE, L. A.; BERKELEY, R. C. W. *Bacillus amyloliquefacien ssp.nov.norn. rev. Intern. Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, United Kingdom, v.37, n.1, p.234-245, 1987.

RADWAN, T. E. E.; MOHAMED, Z. K.; REIS, V. M. Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.10, p.987-994, 2004.

RAVEN, P. H.; RAY, F. E.; SUSAN, E. E. **Biologia Vegetal**. 2ed, São Paulo: Guanabara Koogan, 1992.

REALPE, M. H.; HERNÁNDEZ, C. A.; AGUDELO, C. I. Especies Del Género *Bacillus*: morfología macroscópica y microscópica. **Biomédica**, Colombia, v.22, n.2. p 106-109. 2002.

REIS JR, F. B.; REIS, V. M.; TEIXEIRA, K. R. S. Restrição do 16S-23S DNAr intergênico para avaliação da diversidade de *Azospirillum amazonense* isolado de *Brachiaria spp.*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.3, p.431-438, 2006.

REZENDE, S. S.; OLIVEIRA, M. E. S. de; DIDONET, C. C. G. M. **Bactérias Diazotróficas do gênero *Pseudomonas*: isolamento, diversidade e caracterização em plantas de arroz no cerrado de Goiás**. Disponível em: <http://www.prp.ueg.br/06v1/conteudo/pesquisa/inicien/eventos/sic2007/flashsic2007/arquivos/resumos/> Acesso em: Dez/2011.

RICCI, M. S. F.; COSTA, J. R.; REIS, V. M.; SILVA, M. F.; RODRIGUES, L. F. C. Promoção de Crescimento de Mudanças de Café (*Coffea arabica*) Inoculadas com *Azospirillum brasilense* Estirpe Cd. **Circular Técnico 11**, Embrapa Agrobiologia, Seropédica, Rio de Janeiro, p.1-6, 2005.

ROCHA, M. V. P.; MENDES, J. S.; GIRO M. E. A; GONÇALVES, L. R. B. Estudo da Estabilidade do Biossurfactante Produzido por *Pseudomonas aeruginosa* em Suco de Caju. Campinas, **ABPG - Associação Brasileira de P&D em Petróleo e Gás**, v.4, p.1-8, 2007.

RODRIGUES, O.; DIDONET, A. D.; GOUVEIA, J. A.; SOARES, R. C. Nitrogen translocation in wheat inoculated with *Azospirillum* and fertilized with nitrogen. Brasília. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n.5, p. 1473-1481, 2000.

ROMEIRO, R. S. **Organismos procariotas e promoção de crescimento em plantas**. Disponível em: <http://www.seres.iciag.ufu.br/Siciac-Romeiro%5B1%5D.pdf>. Acesso em: Jan/2012

SABINO, D. C. C. **Metabolismo de nitrogênio em plantas de arroz (*Oryza sativa L.*) em associação com bactérias diazotróficas endofíticas**. 2003. 65f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, UFRRJ, Seropedica, 2003.

SAIKI, R. K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; ARNHEIM, N. 1986. Enzymatic amplification of P-globin genomic sequence and restriction site analysis for diagnosis of sickle-cell anemia. **Science**, USA, v.230, n.1, p.1350-1354, 1988.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning a laboratory manual. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, New York, v.2, n.1, p.843-859, 1989.

SANTOS, C. C. R.; PERIN, L.; BALDANI, J. I.; REIS, V. M. Isolamento de *Gluconacetobacter spp.* em diferentes tipos de solos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.1, p.85-92, 2006.

SANTOS, I. L. V. L.; LIMA BATISTA, A. C. L.; ANDRADE, R. F. S.; SILVA, C. R. C.; SILVA, M. C. F. Prospecção da Presença de Proteases e Amilases nos Microrganismos *Rhizopus arrhizus* UCP 402, *Bacillus licheniformis* UCP 1008 e *Geobacillus tearothermophilus* UCP 1520. **X Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão – JEPEX**, UFRPE: Recife, 2010.

SHAVER, Y.J.; NAGPAL, M. L.; FOX, K. F.; RUDNER, R.; FOX, A. Variation in 16S-23S rRNA intergenic spacer regions among *Bacillus subtilis* 168 isolates. **Molecular Microbiology**, United Kingdom, v.42, n.1, p.101-9, 2001.

SILVA, D. M.; FRIES, M. R.; ANTONIOLLI, Z.; AITA, C.; VOSS, M.; JACQUES, R.; SEMINOTTI, J.; CARVALHO, C. A. Bactérias diazotróficas em solo cultivado com arroz irrigado (*Oryza sativa L.*). **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.10, n. 4, p. 467-474, 2004.

SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. Solubilização de Fostatos por Microrganismos na Presença de Fontes de Carbono. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, v.24, p.11-319, 2000.

SILVA, M. F. **Isolamento e caracterização bioquímica e molecular de bactérias do gênero *Azospirillum* de raízes de plantas de milho (*Zea mays*).** 2000. 96f. Trabalho de Graduação (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual de Goiás, UEG, Anápolis, 2010.

SILVA, T. F.; MELLONI, R. Densidade e Diversidade Fenotípica de Bactérias Diazotróficas não Simbióticas em Solos da Reserva Biológica Serra dos Toledos, Itajubá (MG). **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, v.35, n.1, p.359-371, 2011.

SILVEIRA, E. L. **Inoculações de Bactérias Promotoras de Crescimento no Cultivo de Arroz em Solução Nutritiva.** 2008. 99f. Dissertação (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) - Universidade Estadual Paulista, UNESP, São Paulo, 2008.

SMART, C. D.; SCHNEIDER, B.; BLOMQUIST, C. L.; GUERRA, L. J.; HARRISON, N. A.; AHRENS, U.; LORENZ, K. H.; SEEMÜLLER, E.; KIRKPATRICK, B. C. Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, n.8, p.2988-2989, 1996.

SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R. **Numerical Taxonomy**. Freeman, San Francisco. 1973.

SONG, L.; KATO, N.; LIU, C.; MATSUMIYA, Y.; KATO, H.; WATANABE, K. Rapid identification of 11 human intestinal *Lactobacillus* species by multiplex PCR assays using group-and species-specific primers derived from the 16S-23S rRNA intergenic spacer region and its flanking 23S rRNA. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.187, n.43, p.167-173, 2000.

SOUCHIE, E. L.; ROSARIO AZCÓN, R.; BAREA, J. M.; SAGGIN JR, O. J.; SILVA, E M. R. Solubilização de Fosfatos em Meios Sólido e Líquido Por Bactérias e Fungos do Solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, n.11, p.1149-1152, 2005.

SOUSA, A. F. **Identificação, Caracterização e Estudo do Crescimento e da Capacidade de Desnitrificação de uma Bactéria Marinha Isolada de um Filtro Biológico**. 2004. 94f. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aplicada) - Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, FPUP, Porto, 2004.

SPAINK, H. P. Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. **Annual Review of Microbiology**, USA, v.54,n.1, p.257-288, 2000.

STACKEBRANDT, E.; MURRAY, R. G. E.; TRUE PER, H. G. Proteobacteria classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the “purple bacteria and their relatives”. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Washington, v.38,n.2, p. 321-325, 1988.

STROSCHEIN, M. R. D. **Caracterização de Bactéria Fixadora de Nitrogênio em *Lupinus albus***. 2007. 83f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Santa Maria, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3ed, Porto Alegre: Artmed, 2004.

TAJIMA, F.; NEI, M. Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. **Molecular Biology and Evolution**, v.1, n.1, p.269-285, 1984.

TAMURA K., PETERSON D., PETERSON N., STECHER G., NEI M., AND KUMAR S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using

Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution (In Press)**, 2011.

TAPIA, H. A.; BUSTILLOS, C. M. R.; JIMÉNEZ, S. T.; CABALLERO M. J.; FUENTES, R. L. E. Natural endophytic occurrence of *Acetobacter diazotrophicus* in pineapple plants. **Microbial Ecology**, USA, v.39,n.1, p.49-55, 2000.

TAYLOR, E. H.; BRADBURY, J. F.; PREECE, T. F. *Xanthomonas compestris* pv. *begoniae*. **Description of Fungi and Bacteria**, London, v.1, n.70, 1981.

TEIXEIRA, J. R.; FERREIRA, A. S.; SANTOS, M. A. **Isolamento de Bactérias Diazotróficas do Solo e de Raízes de *Gossypiumhirsutum*, *Saccharum officinarum* e *Zea mays* Cultivados em Solos do Cerrado**. Disponível em: <http://www.seer.ufu.br/index.php/horizontecientifico/article/view/4130/3077>. Acesso em: Jan/2012.

TEIXEIRA, M. A.; MELO, I. S. de; VIEIRA, R. F. **Ocorrência de bactérias diazotróficas endofíticas na mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)**. (Embrapa Meio Ambiente. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 34). Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 19p, 2005.

TOLEDO, B. F. B. **Identificação de Estirpes de Rizóbios por Sequenciamento Parcial dos Genes 16S *rDNAE nifH***. 2008. 139f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas)-Universidade Estadual Paulista, UEP, Jaboticabal, 2008.

TURNER, J.T.; BACKMAN, P.A. Factors relating to peanut yield increases after seed treatment with *Bacillus subtilis*. **Plant Disease**, Michigan, v.75, n.4, p.347- 353, 1991.

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA. **Isolamento de microrganismos**. Disponível em: <http://www.microbiologia.ufba.br/aulas/Provas%20bioquimicas.doc>. Acesso em: jan/2012a.

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA. **Isolamento de microrganismos**. Disponível em: www.microbiologia.ufba.br/aulas/provas%20bioquimicas.doc. Acesso em: jan/2012b.

VIDEIRA, S. S. **Taxonomia Polifásica de Bactérias Diazotróficas do Gênero *Sphingomonas spp.* e Efeito da Inoculação em Plantas de Arroz**. 2008. 140f. Trabalho de Pós Graduação (Pós Graduação em Agronomia) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, UFRRJ, Seropédica, 2008.

VIEIRA, N. R. A. **A cultura do arroz no Brasil**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 1999.

XU, D.; COTÊ, J. C. Phylogenetic relationships between *Bacillus* species and related genera inferred from comparison of 39 end 16S rDNA and 59 end16S–23S ITS nucleotide sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Great Britain, v.53, p.695-704, 2003.

WOESE, C.R. Bacterial evolution. **Microbiology Review**, v.51, n.2, p.221-271, 1987.

ANEXO I

MEIOS DE CULTURA

1. Meio King B (KING, WARD & RANEY, 1954)

Peptona	20 g
Fosfato de Potássio Dibásico 10%	15 mL
Sulfato de Magnésio 10%	15 mL
Ágar	15 g
Água destilada	q.s.p. 1000 mL

O pH ajustado para 6,5, o meio foi autoclavado a 1 atm em temperatura de 121°C durante 20 minutos e armazenado em temperatura ambiente.

2. Meio NFb (DÖBEREINER; ANDRADE; BALDANI, 1999)

Ácido málico	5 g
Fosfato de Potássio Dibásico 10%	6mL
Fosfato de Potássio Monobásico 10%	18 mL
Sulfato de Magnésio 10%	2mL
Cloreto de Sódio 10%	1mL
Cloreto de Cálcio 10%	0,2 mL
Azul de Bromotimol 0,5% em 0,2N de Hidróxido de Potássio	2mL
Solução de micronutrientes para meio de Cultura	2mL
EDTA de Ferro 1,64%	4mL
Solução de vitamina para Meio de Cultura	1mL
Hidróxido de Potássio	4,5 g

Ágar	2 g
Água destilada	q.s.p. 1000 mL

O pH ajustado para 5,8, o meio foi autoclavado a 1 atm em temperatura de 121°C durante 20 minutos e armazenado em temperatura ambiente.

2.1. Solução de Micronutrientes (DÖBEREINER; ANDRADE; BALDANI, 1999)

Molibdato de Sódio	0,2 g
Sulfato de manganês	0,235 g
Ácido Bórico	0,28 g
Sulfato de Cobre	0,008 g
Sulfato de Zinco	0,024 g
Água destilada	q.s.p. 1000 mL

O pH foi ajustado para 6,8, a solução foi autoclavada a 1 atm em temperatura de 121°C durante 20 minutos e armazenada em temperatura ambiente.

2.2. Solução de Vitaminas (DÖBEREINER; ANDRADE; BALDANI, 1999)

Biotina	0,001 g
Piridoxina	0,002 g
Água destilada	q.s.p. 1000 mL

O pH foi ajustado para 6,8, a solução foi autoclavada a 1 atm em temperatura de 121°C durante 20 minutos e armazenada em temperatura ambiente.

3. Meio Mínimo (HUNGRIA et al., 1994)

3.1 Solução 1

Fosfato de Amônio Monobásico	30 g
Fosfato de Potássio Monbásico	15 g
Fosfato de Amônio Dibásico	2,5 g
Cloreto de Sódio	2,5 g
Água destilada	q.s.p. 1000 mL

3.2 Solução 2

Sulfato de Magnésio 1M

3.3 Solução 3

Ágar	22,5 g
Águadestilada	q.s.p. 1000 mL

As três soluções foram autoclavadas separadamente a 1atm em temperatura de 121°C durante 20 minutos e armazenado em temperatura ambiente. A montagem foi feita com 199 mL da solução (1), 1mL da solução (2), 800 mL da solução (3) e a fonte de carbono escolhida 1M·L⁻¹.

4. Meio Citrato Simmons (TEIXEIRA; FERREIRA; SANTOS, 2012)

Citrato de Sódio	2 g
Sulfato de Magnésio	0,2 g
Fosfato de Amônio Monobásico	1g
Fosfato de Potássio Dibásico	1g
Cloreto de Sódio	5g
Azul de Bromotimol 0,5% em 0,2N de Hidróxido de	15 mL

Potássio	
Ágar	20 g
Água destilada	q.s.p. 1000 mL

O pH foi ajustado para 6,8, a solução foi autoclavada a 1 atm em temperatura de 121°C durante 20 minutos e armazenada em temperatura ambiente.

5. Meio Uréia (CHRISTENSEN, 2012)

Peptona	1g
Glicose	1g
Cloreto de Sódio	5g
Fosfato de Potássio Monobásico	2g
Vermelho de Fenol	0,012g
Ágar	14 g
Água destilada	q.s.p. 1000 mL

O pH foi ajustado para 6,8, a solução foi autoclavada a 1 atm em temperatura de 121°C durante 20 minutos e armazenada em temperatura ambiente.

ANEXO II

Tabela 1: Tamanho calculado para a região BOX das bactérias testadas dos fragmentos obtidos por amplificação por PCR (pb).

Isolado	S2	S4	S5	S6	S6A	S8A	S8B	S17	S22	S25	S26	S29	S32	S35	S37	S39	S41	S63	S97	S105
Fragmento 1		5533,4	5763,9		5882,72	5827,78	5927,8	5882,73	5954,12				5872,7			5621,7	5674	5763,9		
Fragmento 2	2383,3	2331,6	2356,22	2309,6	2383,29	2362,95	2309,6	2336,11	2262,95	2390,09	2318	2373	2268,3	2300	2207,3	2381,1	2357	2357,3	2357,3	2358,5
Fragmento 3	1861,2	1943,3	1874,64	1943,3	1957,31	1915,53	1929,4	1943,28	1957,31	1971,44	1971	1986	1990,1	1922	1982,6	1921,4	1902	1931,3	1913,4	1915,5
Fragmento 4					1695,08	1670,87	1670,9									1611,8	1659	1635,2	1670,9	1590,8
Fragmento 5	1182,1	1205,2	1182,14	1197,5	1212,98	1220,81	1197,5	1212,98	1252,64	1228,69	1237	1277	1236,6	1237	1187,3	1152,2	1175	1192,2	1194,6	1188,6
Fragmento 6	1006,5	1032,7	997,12	1019,5	1006,46	987,12	1006,5	1000,29	1039,37	1012,84	1007	1007	1007,3	1007	943,36	968,97	974,5	961,88	985,12	987,54
Fragmento 7		907,4	906,9	925,2				913,3	925,21	949,49	949,5	930,8	930,75	923,5	923,37					
Fragmento 8	809,53	823,37	834,11	844,99	839,54	844,99	806,01	844,99	856,01	850,48	856	804,2	814,19	804,2	801,98	812,77	807,5	802,31	817,06	818,02
Fragmento 9	565,48	565,48	572,86	580,33	572,86	572,86	576,59	555,57	562,72	560,33	561,7	561,2	575,17	575,2	559,81	529,16	529,2	561,83	549,02	551,44

Tabela 2: Estimativa da divergência evolutiva entre as sequências.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26		
[1]		[0,023	[[0,039	[[0,018	[[0,033	[[0,032	[[0,029	[[0,023	[[0,013	[[0,114	[[0,027	[[0,027	[[0,014	[[0,012	[[0,023	[[0,014	[[0,018	[[0,010	[[0,010	[[0,010	[[0,024	[[0,024	[[0,025	[[0,010	[[0,010	[[0,010]	
[2]	0,094		[0,047	[[0,023	[[0,042	[[0,043	[[0,032	[[0,030	[[0,023	[[0,107	[[0,035	[[0,032	[[0,024	[[0,022	[[0,035	[[0,023	[[0,027	[[0,021	[[0,021	[[0,021	[[0,031	[[0,031	[[0,032	[[0,021	[[0,021	[[0,021]	
[3]	0,206	0,289		[0,040	[[0,052	[[0,050	[[0,051	[[0,045	[[0,040	[[0,179	[[0,047	[[0,048	[[0,041	[[0,039	[[0,041	[[0,040	[[0,045	[[0,039	[[0,039	[[0,039	[[0,048	[[0,048	[[0,048	[[0,039	[[0,039	[[0,039]	
[4]	0,052	0,088	0,225		[0,036	[[0,038	[[0,029	[[0,028	[[0,017	[[0,102	[[0,031	[[0,030	[[0,016	[[0,017	[[0,029	[[0,016	[[0,022	[[0,015	[[0,015	[[0,015	[[0,027	[[0,027	[[0,028	[[0,015	[[0,015	[[0,015]	
[5]	0,174	0,247	0,348	0,188		[0,042	[[0,043	[[0,023	[[0,031	[[0,195	[[0,028	[[0,040	[[0,034	[[0,033	[[0,035	[[0,032	[[0,034	[[0,031	[[0,031	[[0,031	[[0,036	[[0,036	[[0,037	[[0,031	[[0,031	[[0,031]	
[6]	0,153	0,232	0,290	0,188	0,257		[0,047	[[0,034	[[0,033	[[0,178	[[0,036	[[0,043	[[0,033	[[0,030	[[0,028	[[0,032	[[0,036	[[0,032	[[0,032	[[0,032	[[0,041	[[0,041	[[0,041	[[0,032	[[0,032	[[0,032]	
[7]	0,121	0,161	0,314	0,127	0,249	0,256		[0,036	[[0,027	[[0,135	[[0,041	[[0,023	[[0,029	[[0,028	[[0,038	[[0,029	[[0,028	[[0,026	[[0,026	[[0,026	[[0,014	[[0,014	[[0,016	[[0,026	[[0,026	[[0,026]	
[8]	0,089	0,153	0,271	0,114	0,101	0,160	0,182		[0,021	[[0,121	[[0,020	[[0,034	[[0,023	[[0,022	[[0,029	[[0,022	[[0,025	[[0,021	[[0,021	[[0,021	[[0,030	[[0,030	[[0,032	[[0,021	[[0,021	[[0,021]	
[9]	0,029	0,088	0,219	0,046	0,160	0,153	0,115	0,076		[0,105	[[0,025	[[0,024	[[0,013	[[0,012	[[0,024	[[0,013	[[0,017	[[0,008	[[0,008	[[0,008	[[0,023	[[0,023	[[0,024	[[0,008	[[0,008	[[0,008]	
[10]	0,689	0,674	0,881	0,652	0,870	0,843	0,736	0,721	0,634		[0,135	[[0,122	[[0,113	[[0,121	[[0,128	[[0,112	[[0,123	[[0,107	[[0,107	[[0,107	[[0,142	[[0,142	[[0,147	[[0,107	[[0,107	[[0,107]	
[11]	0,120	0,188	0,304	0,146	0,141	0,195	0,218	0,076	0,107	0,768		[0,039	[[0,028	[[0,026	[[0,031	[[0,025	[[0,028	[[0,026	[[0,026	[[0,026	[[0,035	[[0,035	[[0,035	[[0,026	[[0,026	[[0,026]	
[12]	0,108	0,162	0,285	0,128	0,232	0,234	0,095	0,167	0,095	0,697	0,202		[0,027	[[0,027	[[0,032	[[0,027	[[0,026	[[0,024	[[0,024	[[0,024	[[0,018	[[0,018	[[0,019	[[0,024	[[0,024	[[0,024]	
[13]	0,034	0,095	0,226	0,040	0,181	0,160	0,120	0,088	0,028	0,665	0,126	0,109		[0,014	[[0,025	[[0,014	[[0,018	[[0,010	[[0,010	[[0,010	[[0,024	[[0,024	[[0,024	[[0,010	[[0,010	[[0,010]	
[14]	0,028	0,088	0,212	0,052	0,167	0,133	0,121	0,082	0,028	0,692	0,113	0,109	0,034		[0,023	[[0,010	[[0,017	[[0,009	[[0,009	[[0,009	[[0,023	[[0,023	[[0,024	[[0,009	[[0,009	[[0,009]	
[15]	0,094	0,173	0,233	0,126	0,202	0,126	0,203	0,127	0,095	0,763	0,153	0,167	0,107	0,088		[0,026	[[0,028	[[0,023	[[0,023	[[0,023	[[0,033	[[0,033	[[0,034	[[0,023	[[0,023	[[0,023]	
[16]	0,035	0,088	0,226	0,040	0,160	0,154	0,121	0,076	0,029	0,661	0,107	0,108	0,034	0,023	0,108		[0,018	[[0,010	[[0,010	[[0,010	[[0,010	[[0,024	[[0,024	[[0,024	[[0,010	[[0,010	[[0,010]
[17]	0,058	0,115	0,259	0,076	0,181	0,189	0,115	0,113	0,052	0,684	0,140	0,102	0,058	0,058	0,133	0,058		[0,015	[[0,015	[[0,015	[[0,022	[[0,022	[[0,023	[[0,015	[[0,015	[[0,015]	
[18]	0,017	0,076	0,212	0,034	0,160	0,146	0,101	0,076	0,011	0,648	0,107	0,089	0,017	0,017	0,088	0,017	0,040		[0,000	[[0,000	[[0,020	[[0,020	[[0,021	[[0,000	[[0,000	[[0,000]	
[19]	0,017	0,076	0,212	0,034	0,160	0,146	0,101	0,076	0,011	0,648	0,107	0,089	0,017	0,017	0,088	0,017	0,040	0,000		[0,000	[[0,020	[[0,020	[[0,021	[[0,000	[[0,000	[[0,000]	
[20]	0,017	0,076	0,212	0,034	0,160	0,146	0,101	0,076	0,011	0,648	0,107	0,089	0,017	0,017	0,088	0,017	0,040	0,000	0,000		[0,020	[[0,020	[[0,021	[[0,000	[[0,000	[[0,000]	
[21]	0,083	0,148	0,282	0,101	0,203	0,211	0,034	0,140	0,076	0,707	0,174	0,058	0,082	0,082	0,160	0,083	0,076	0,064	0,064	0,064		[0,000	[[0,008	[[0,020	[[0,020	[[0,020]	
[22]	0,083	0,148	0,282	0,101	0,203	0,211	0,034	0,140	0,076	0,707	0,174	0,058	0,082	0,082	0,160	0,083	0,076	0,064	0,064	0,064	0,000		[0,008	[[0,020	[[0,020	[[0,020]	
[23]	0,089	0,154	0,281	0,108	0,210	0,210	0,046	0,147	0,082	0,723	0,175	0,064	0,088	0,088	0,167	0,089	0,082	0,070	0,070	0,070	0,011	0,011		[0,021	[[0,021	[[0,021]	
[24]	0,017	0,076	0,212	0,034	0,160	0,146	0,101	0,076	0,011	0,648	0,107	0,089	0,017	0,017	0,088	0,017	0,040	0,000	0,000	0,000	0,064	0,064	0,070		[0,000	[[0,000]	
[25]	0,017	0,076	0,212	0,034	0,160	0,146	0,101	0,076	0,011	0,648	0,107	0,089	0,017	0,017	0,088	0,017	0,040	0,000	0,000	0,000	0,064	0,064	0,070	0,000		[0,000]	
[26]	0,017	0,076	0,212	0,034	0,160	0,146	0,101	0,076	0,011	0,648	0,107	0,089	0,017	0,017	0,088	0,017	0,040	0,000	0,000	0,000	0,064	0,064	0,070	0,000	0,000]	

Número de substituições de bases por sítios entre as sequências. A estimativa do erro padrão é mostrada acima na diagonal. As análises foram realizadas utilizando o modelo de Tamura Nei e colaboradores (2011). A análise envolveu 26 sequências de nucleotídeos. Todas as posições que contêm lacunas e dados faltantes foram eliminadas. Houve um total de 181 posições no o0njunto de dados final. As análises foram realizadas no programa MEGA5.

ANEXO III

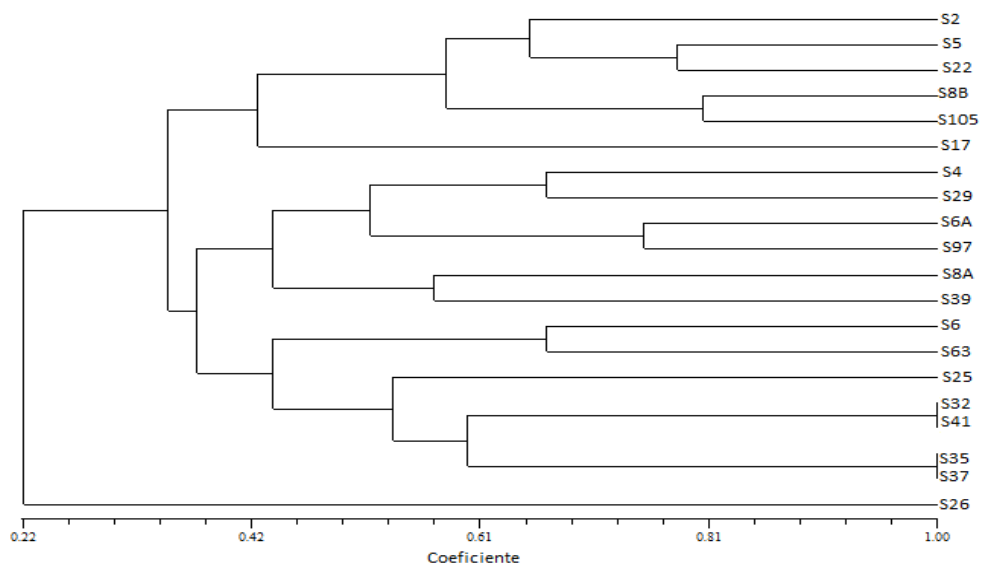


Figura 1: Dendrograma definido pelo método de agrupamento UPGMA utilizando a coeficiente de similaridade Jaccard em função da capacidade de assimilação de 13 fontes de carbono pelos 20 isolados bacterianos extraídos de arroz. Fontes de carbono: Sacarose, amido, frutose, proteínas do leite, celulose, ácido málico, ácido maleico, ácido nicotínico, arabinose, glicose e manitol.

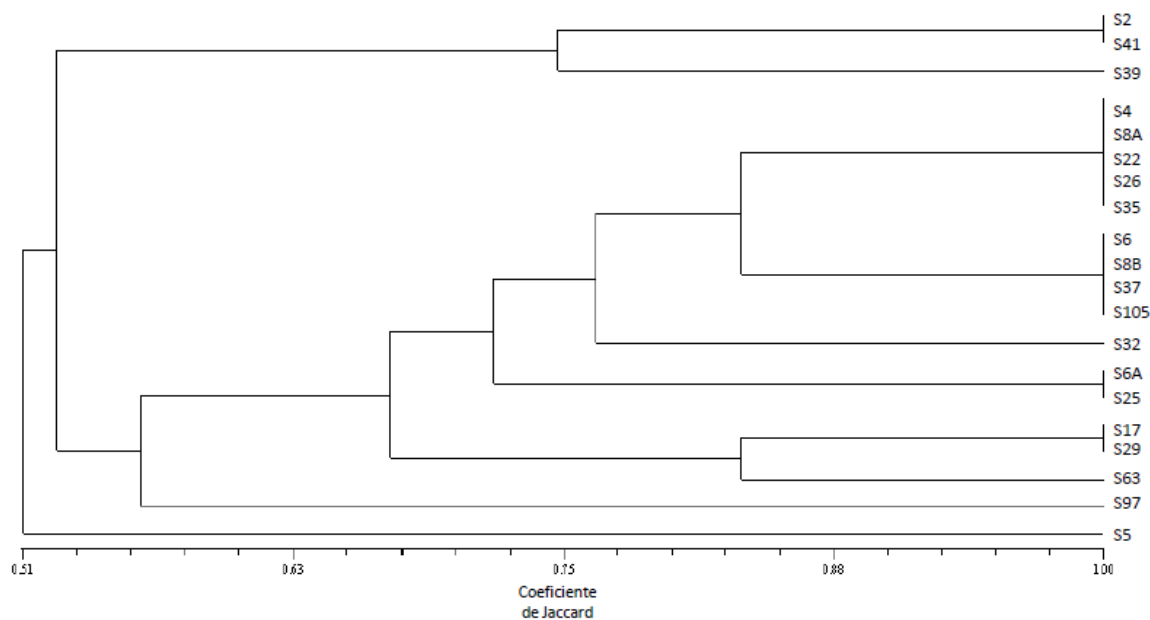


Figura 2: Dendrograma definido pelo método de agrupamento UPGMA utilizando a coeficiente de similaridade Jaccard em função de 5 características bioquímicas (Teste da enzima urease, teste de citrato, teste de fixação biológica de nitrogênio, teste de gram e teste de redução de nitrato) relativas às 20 bactérias isoladas de arroz.

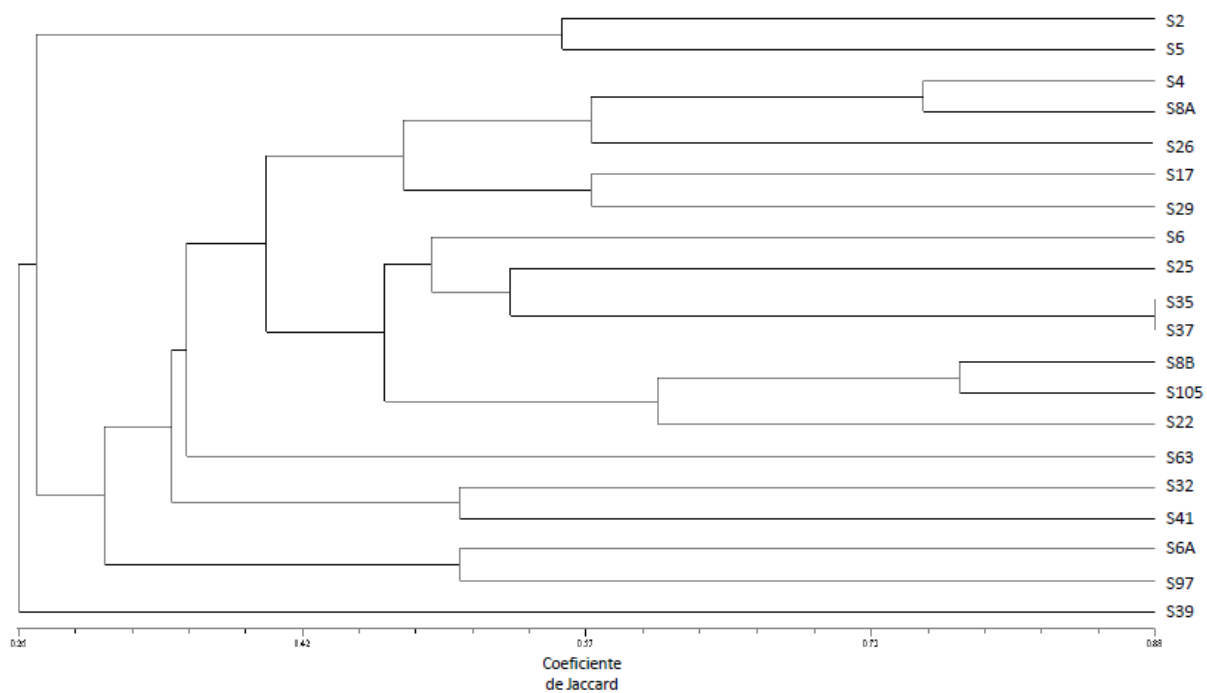


Figura 3: Dendrograma consenso definido pelo método de agrupamento UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade Jaccard em função das características morfológicas, bioquímicas e uso de fontes de carbono pelos 20 isolados bacterianos de arroz.