



**Universidade de Brasília**

**Instituto de Ciências Biológicas**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana**

**Uso de espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz - tempo de voo (MALDI-TOF MS) para formação de bibliotecas e caracterização da ocupação nodular em soja por estirpes de *Bradyrhizobium*.**

**Lucas Ferreira Lima Sobreira Rolim**

**Brasília - DF**

**Março de 2016.**

**Universidade de Brasília**

**Instituto de Ciências Biológicas**

**Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana**

**Uso de espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz - tempo de voo (MALDI-TOF MS) para formação de bibliotecas e caracterização da ocupação nodular em soja por estirpes de *Bradyrhizobium*.**

**Lucas Ferreira Lima Sobreira Rolim**

Orientador:

**Prof. Dr. Helson Mario Martins do Vale**

Co-orientador: **Dr. Luciano Paulo da Silva**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Microbiana

**Brasília – DF**

**Março de 2016**

**Uso de espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz - tempo de voo (MALDI-TOF MS) para formação de bibliotecas e caracterização da ocupação nodular em soja por estirpes de *Bradyrhizobium*.**

**LUCAS FERREIRA LIMA SOBREIRA ROLIM**

**Dissertação aprovada em 23 de Março de 2016**

**Banca Examinadora:**

---

**Prof. Dr. Helson Mario Martins do Vale - UnB**

---

**Dr. Fábio Bueno dos Reis Junior- Embrapa Cerrados**

---

**Profa. Dra. Eliane Ferreira Noronha - UnB**

**Brasília – DF – Março, 2016.**

***Aos meus filhos, Davi e Arthur!***

***A minha amada esposa Andressa!***

***Aos meus pais!***

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pelo auxílio constante em minha vida e direcionamento em minha caminhada.

Ao meu orientador prof. Dr. Helson Mario, pelo acolhimento, ensinamentos, paciência e por ter acreditado em meu potencial.

Ao Dr. Luciano Paulino, pela convivência, pelas incontáveis orientações, ensinamentos, críticas necessárias. Obrigado por me apresentar um mundo novo da Espectrometria de Massa.

A Dra. Ieda, minha segunda mãe. Pela idealização do experimento e do projeto e pelo apoio incondicional.

Ao Dr. Fábio Bueno dos Reis pelas valiosas contribuições nos trabalhos, conselhos e amizade.

A Universidade de Brasília e ao Programa de Pós Graduação em Biologia Microbiana.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Cerrados e CENARGEN. Em especial aos laboratórios de Microbiologia de Solos e Nanobiotecnologia.

Ao Osmar, técnico agrícola responsável pela condução dos experimentos em campos, pela amizade acolhida e conselhos.

Ao Clodoaldo, parceiro nos trabalhos de rotina do laboratório pela amizade e contribuição nos trabalhos.

A Dra. Thais Ribeiro Santiago, pelo auxílio nas análises no programa computacional ClinPro Tools.

Ao André pela ajuda nas análises estatísticas, pela amizade e companheirismo.

A todos os bolsistas e estagiários do laboratório de Microbiologia de Solos da Embrapa: Eudaci, Brendo, André, Leandro, Raquel Nobrega, Murilo, Heber, Claubison, Mariana, Jessica, Nathaly e Raquel Pires.

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| RESUMO GERAL .....  | 11 |
| ABSTRACT .....  | 12 |
| LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....   | 8  |
| 1. INTRODUÇÃO GERAL.....  | 13 |
| 2.OBJETIVOS.....  | 15 |
| 2.1 Objetivo Geral .....  | 15 |
| 2.2 Objetivos Específicos .....   | 15 |
| 3. REFERENCIAL TEÓRICO.....   | 16 |
| 3.1 FBN na cultura da soja no Brasil .....  | 16 |
| 3.2 Recomendação de Bradirizóbios em inoculantes para a cultura da soja no Brasil.....  | 19 |
| 3.3 Diversidade e Taxonomia de Rizóbios .....   | 21 |
| 3.3.1 Estudos clássicos de ecologia e taxonomia de rizóbios .....   | 22 |
| 3.3.3 Taxonomia e diversidade atual do gênero <i>Bradyrhizobium</i> .....   | 22 |
| 3.4 Métodos para estudos ecológicos e de identificação de rizóbios.....   | 24 |
| 3.4.1 Identificação de bactérias por meio de MALDI-TOF MS: Análise de dados e princípios de utilização .....  | 25 |
| 4. Referências Bibliográficas .....   | 29 |
| CAPÍTULO 1: Montagem de biblioteca de perfis moleculares obtidos por (MALDI-TOF MS) aplicada à identificação de estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> .....   | 39 |
| 1.RESUMO .....  | 40 |
| 2.INTRODUÇÃO.....   | 41 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS .....  | 43 |
| 3.1 Estirpes parentais.....   | 43 |
| 3.2 Preparo dos isolados/amostras para MALDI-TOF MS.....  | 43 |
| 3.2 MALDI-TOF MS.....   | 44 |
| 3.3 Implantação de banco de dados suplementar .....   | 44 |
| 3.4 Análise estatística usando ClinPro software Tools.....  | 45 |
| 4.2. RESULTADOS .....   | 47 |
| 4.1 Montagem de Biblioteca Suplementar em espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz associada ao tempo de voo (MALDI-TOF MS), aplicada para identificação de estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> ..... | 47 |
| .....   | 47 |
| 4.2 Análise de componentes principais como ferramenta para validação de diferenciação das bibliotecas. ....   | 48 |
| 4.2 Análise de redes neurais para identificação de picos não coincidentes e determinantes para diferenciação das bibliotecas.....   | 50 |
| 5. DISCUSSÃO.....   | 51 |

|  |           |
|--|-----------|
| 6. CONCLUSÕES.....   | 53        |
| 7. REFERÊNCIAS .....   | 53        |
| <b>CAPÍTULO 2: Uso de espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz associada ao tempo de voo (MALDI-TOF MS) para caracterização da ocupação nodular de soja por estirpes de <i>Bradyrhizobium</i>.....</b> |           |
| <b>1 RESUMO .....</b>  | <b>57</b> |
| <b>2 INTRODUÇÃO.....</b>   | <b>58</b> |
| <b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>  | <b>60</b> |
| 3.1 Experimento em Condições de Campo.....   | 60        |
| 3.2 Caracterização das populações estabelecidas.....   | 61        |
| 3.3 Caracterização das populações estabelecidas pela técnica de espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz associada ao tempo de voo (MALDI TOF MS).....   | 62        |
| 3.3.1 Isolamento e purificação dos isolados bacterianos.....   | 62        |
| 3.3.2 MALDI-TOF MS.....  | 62        |
| 3.3.3 Análise estatística.....   | 64        |
| <b>4 RESULTADOS .....</b>  | <b>65</b> |
| 4.1 Análise de MALDI-TOF MS em relação a sua eficiência na identificação de isolados de campo .....  | 65        |
| 4.2 Identificação de isolados por tratamento e verificação da competitividade quanto à ocupação nodular das estirpes introduzidas .....  | 65        |
| <b>5 DISCUSSÃO.....</b>  | <b>69</b> |
| 5.1 Eficiência na identificação de isolados de nódulos de soja por MALDI-TOF MS.....   | 69        |
| 5.2 Sucessão ecológica das estirpes parentais no arranjo de blocos do experimento .....  | 70        |
| 5.3 Outras espécies de bactérias encontradas nos nódulos.....  | 72        |
| <b>6. CONCLUSÕES.....</b>  | <b>75</b> |
| <b>7. REFERÊNCIAS .....</b>  | <b>75</b> |

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

### Capítulo 1

**Figura 1.** Espectros padrão das quatro estirpes parentais adquiridos da média de 24 crescimentos e aquisições distintas.....47

**Figura 2.** Análise de componentes principais (ClinPro Tools) de todos os espectros obtidos das estirpes parentais. A CPAC 15 é representada pela cor amarela a CPAC 7 pela cor vermelha, a SEMIA 587 pela cor azul e a 29W pela cor verde. A eclipse de confiança respeita uma circuncisão de 95%.....49

**Figura 3.** Análise de componentes principais (ClinPro Tools) de todos os espectros adquiridos das estirpes CPAC 7 e CPAC 15. A CPAC 15 é representada pela cor vermelha CPAC 7 pela cor verde. A eclipse de confiança respeita uma circuncisão de 95%.....49

**Figura 4.** Gráfico de rede neurais (genetic algoritmic) figura superior de todos os espectros adquiridos das quatro estirpes estudadas. Na análise de redes neurais os picos coincidentes são representados pela cor azul e os diferenciais pela cor vermelha.....50

**Figura 5.** Gráfico de rede neurais (genetic algoritmic) com os espectros adquiridos das estirpes CPAC 7 e CPAC 15. Na análise de redes neurais os picos coincidentes são representados pela cor azul e os diferenciais pela cor vermelha.....51

### Capítulo 2

**Figura 1-** Experimento em campo, instalado em uma aérea recém desmatada, afim de não haver contaminação com bactérias previamente estabelecidas no solo provenientes de inoculantes.....61

**Figura 2-** Isolamento de bactérias a partir dos nódulos.....62

**Figura 3-** Microflex Bruker Daltonics. Equipamento de MALDI TOF MS utilizado nas análises.....64

**Tabela 1.** Efeitos da inoculação na ocupação nodular no ano 2014/2015.....68

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**AS:** Ácido Sinapínico.

**atpD:** ATP sintetase, subunidade Beta.

**BOX:** Sequencias repetidas em genomas bacterianos.

**CHCA:** Ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico.

**CPAC:** Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados. Atualmente Embrapa Cerrados.

**CSRIO:** Organização de pesquisa científica industrial para o bem estar – Austrália.

**CV:** Coeficiente de variação.

**Da:** Daltons

**DHB:** ácido diidroxibenzóico

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico

**ERIC:** Sequencias intergênicas repetidas.

**FBN:** Fixação Biológica de Nitrogênio.

**GTG:** Sequencias repetidas de DNA micro-satélite.

**MALDI-TOF MS:** Espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz associada ao tempo de voo.

**MLSA:** Análise de sequências multilocus.

**N:** Nitrogênio Elementar.

**PCA:** Análise de componentes principais.

**PCR:** Reação em cadeia da DNA polimerase.

**RAPD:** Amplificação randômica de DNA polimórfico.

**RC:** Parâmetro de capacidade reconhecimento

**RecA:** Proteína de reparo de manutenção do DNA.

**REP:** Sequências palindrômicas extragênicas repetidas.

**rRNA:** Ácido Ribonucleico Ribossomal.

**RRS:** Sítios de reconhecimento ribossomal.

**SEMIA:** Seção de microbiologia agrícola.

**YMA:** Extrato de Levedura, manitol e ágar.

## RESUMO GERAL

A região do Cerrado é uma das mais importantes quanto ao cultivo da soja (*Glycine max*) no Brasil. Em 2014/2015, 28 milhões de hectares foram cultivados com esse grão no Cerrado. Um dos fatores responsáveis pela expansão da soja é a sua capacidade de nodular e fixar nitrogênio eficientemente em simbiose com bactérias do gênero *Bradyrhizobium* que foram recomendadas na forma de inoculantes contendo ao menos uma de quatro estirpes (CPAC7, CPAC15, SEMIA 587 e 29W), resultando em uma economia anual de cerca de 8 bilhões de dólares. Ao serem introduzidas e estabelecidas nos solos do Cerrado, essas bactérias podem competir pelos sítios de infecção nodular nas raízes com as estirpes utilizadas no inoculante. As populações estabelecidas podem ser mais competitivas e menos eficientes na fixação biológica de nitrogênio (FBN). Essa competição com populações estabelecidas capazes de nodular a soja pode gerar dúvidas quanto ao benefício da reinoculação. Portanto, estudos que elucidem a ocupação por diferentes estirpes vêm sendo desenvolvidos utilizando ferramentas analíticas em nível molecular, incluindo a espectrometria de massa por ionização e desorção a laser assistida por matriz - tempo de voo (MALDI-TOF MS). Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi implementar uma biblioteca de MALDI-TOF MS, no intuito de aplicar uma metodologia rápida e eficaz para identificação diferenciada das estirpes capazes de nodular a soja. Após a construção dessa Biblioteca foi realizado um estudo no sexto ano de um ensaio de longa duração que consistiu na introdução de bradirizobios em um solo de primeiro cultivo. Avaliando a capacidade competitiva e a ocupação nodular nesse experimento. A biblioteca suplementar foi validada estatisticamente e se mostrou eficaz na distinção das estirpes de *Bradyrhizobium*. A técnica de MALDI-TOF MS foi bem sucedida na identificação de isolados de campo em nível de estirpes. A reinoculação garantiu a persistência na ocupação nodular das estirpes CPAC 7 e CPAC 15 avaliadas. A estirpe CPAC 15 é mais competitiva que as demais. A ausência de reinoculação abre espaço para a infecção de bactérias oportunistas que não são provenientes dos inoculantes.

**Palavras chaves:** Espectrometria de massas, rizóbios, competitividade, leguminosas, ocupação nodular.

## ABSTRACT

The Cerrado region is one of the most important in the production of soybeans (*Glycine max*) in Brazil. In 2014/2015, 28 million hectares were planted with this crop in the Cerrado. One of the factors responsible for the expansion of soybean is its ability of nodulating and fixing nitrogen efficiently in symbiosis with *Bradyrhizobium* that was recommended as 4 strains (CPAC 7, CPAC 15, SEMIA 587 and 29W), resulting in annual savings of about 8 billion dollars. To be introduced and established in Cerrado soils, these bacteria can compete for nodular infection sites in the roots with the strains used in the inoculant. Established populations can be more competitive and less efficient in biological nitrogen fixation (BNF). This competition with established populations that nodulates soybean may raise doubts as to the benefit of re-inoculation. Therefore, studies elucidating the occupation by different strains have been developed, using analytical tools in molecular level, including mass spectrometric ionization and desorption by matrix assisted laser - time of flight (MALDI-TOF MS). Thus the objective of this work was to build, implement and validate an additional library of MALDI-TOF MS, in order to ensure the differentiated identification of strains capable of nodule soybeans and identify through this technique strains from the soybean nodules, originating in the sixth year of a long-term trial that introduce bradyrhizobias on a soil. In order to assess the competitiveness and nodular occupation in this experiment seeking to determine their impact on the response of these crops to re-inoculation. The additional library was statistically validated and proved effective in distinguishing strains of *Bradyrhizobium*. MALDI-TOF MS technique was successful in identifying field level isolated strains. The re-inoculation ensures persistence in nodular occupation of strains CPAC 7 and CPAC 15. The strain CPAC 15 is more competitive than the others. The absence of re-inoculation makes room for the infection of opportunistic bacteria that are not from the inoculants.

**Key-words:** Mass spectrometry, rhizobia , competitiveness , legumes , nodular occupation.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A região do Cerrado é uma das mais importantes quanto ao cultivo da soja (*Glycine max*) no Brasil. Em 2014/2015, 28 milhões de hectares foram cultivados com esse grão no Cerrado (CONAB, 2015). Um dos fatores responsáveis pela expansão da soja no Brasil é a sua capacidade de nodular e fixar nitrogênio eficientemente em simbiose com bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, resultando em uma economia anual estimada de 4,6 Tg N ano<sup>-1</sup> (Herridge et al., 2008).

Ao serem introduzidas e estabelecidas nos solos do Cerrado, essas bactérias podem competir pelos sítios de infecção nodular nas raízes com as estirpes utilizadas no inoculante. Isso pode ter várias implicações, uma vez que populações estabelecidas podem ser mais competitivas e menos eficientes na fixação biológica de nitrogênio (FBN). Essa competição com populações estabelecidas capazes de nodular a soja pode gerar dúvidas quanto ao benefício da reinoculação (Mendes et al., 2004). Portanto, estudos que elucidem a ocupação por diferentes estirpes vêm sendo desenvolvidos.

Tradicionalmente esses estudos focam na identificação de sorogrupos de bactérias que nodulam a soja, com uso do método de imunoaglutinação, a fim de se verificar quais seriam os isolados presentes em nódulos provenientes do campo (Lima, 1998). Porém, a produção de anticorpos necessários para esse tipo de estudo é bastante complicada e esbarra em questões de bioética, que restringem cada dia mais essa prática (Andrade et al., 2002). Apesar de apresentarem uma eficácia satisfatória, as técnicas imunológicas limitam-se à identificação apenas de bactérias esperadas, não elucidando completamente a ocupação nodular por outras bactérias.

A espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz associada ao tempo de voo (MALDI-TOF MS) aplicada ao estudo de filogenia e taxonomia de micro-organismos é uma ferramenta tecnológica de alto rendimento baseada na comparação da impressão digital proteica obtida por células microbianas, com base em dados de espectros de referência por

meio de uso de vários algoritmos integrados em sistemas recentemente disponíveis comercialmente. Nos últimos anos, esta ferramenta tem sido cada vez mais estudada e aplicada para identificação e tipagem de diversos micro-organismos (Welker e Moore, 2011; Weiser et al., 2012).

Atualmente, poucos estudos têm sido realizados sobre a aplicação de MALDI-TOF MS à pesquisa e identificação de bactérias, que não sejam de importância clínica, principalmente quando relacionado a bactérias fixadoras de nitrogênio, como as que se associam com a cultura da soja (Croxatto et al., 2012). Isto se dá pelo fato de que todos os equipamentos disponíveis para essa finalidade são produzidos por empresas com interesse em diagnósticos clínicos. Porém, esse método requer um protocolo simples e padronizado, que pode ser virtualmente aplicado a qualquer tipo de isolado bacteriano, inclusive as bactérias diazotróficas noduladoras. Contudo, existe a condição de que bibliotecas suplementares sejam confeccionadas para subsidiar a identificação de prováveis bactérias em amostras ambientais.

Nesse sentido, a proposta desse trabalho foi demonstrar por meio de uma biblioteca construída com bactérias utilizadas em inoculantes comerciais e validada por ferramentas estatísticas, se seria possível, a partir de análise por MALDI-TOF MS, a identificação e tipagem de isolados de nódulos de soja provenientes do campo, em nível de estirpe. Para isso, essa técnica foi utilizada como ferramenta de caracterização da ocupação nodular por estirpes de *Bradyrhizobium* que nodulam a soja, provenientes de nódulos do sexto ano de um experimento de longa duração conduzido na Embrapa Cerrados (iniciado em novembro de 2009), que monitora as estirpes de rizóbios recomendadas comercialmente para a cultura da soja, após sua introdução em um solo de Cerrado de primeiro cultivo.

## **2.OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Identificar por meio de MALDI-TOF MS bactérias que ocupam nódulos de soja em um experimento de primeiro cultivo, no seu sexto ano de duração. A fim de avaliar aspectos da competitividade das estirpes dos inoculantes em relação as populações estabelecidas, bem como elucidar a dinâmica da ocupação nodular de soja como um todo desse momento experimental. Buscando ampliar os conhecimentos das populações estabelecidas de bradirizóbios capazes de nodular a soja para dar subsídios a incrementação do processo biológico de fixação do nitrogênio, superando as limitações do cultivo em áreas com populações elevadas dessas bactérias.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Construir, implementar e validar uma biblioteca suplementar de MALDI-TOF MS, no intuito de garantir a identificação diferenciada das estirpes capazes de nodular a soja;
- Identificar por meio de MALDI-TOF MS as estirpes provenientes dos nódulos de soja, originários do sexto ano de um ensaio de longa duração que consistiu na introdução de bradirizóbios em um solo de primeiro cultivo;
- Avaliar a capacidade competitiva de populações estabelecidas de bradirizóbios em relação a estirpes inoculadas, buscando determinar seus impactos na resposta dessas culturas à reinoculação.

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 FBN na cultura da soja no Brasil

As pesquisas desenvolvidas com a soja no Brasil permitiram um incremento no rendimento da cultura, com a média nacional passando de 1.166 kg/ha em 1968/69 para 3.057 kg ha<sup>-1</sup> em 2013/14. Juntamente com os programas de melhoramento e lançamento de cultivares, a seleção de estirpes de *Bradyrhizobium* para a soja, adaptadas às condições brasileiras, especialmente às condições do Cerrado, capazes de substituírem totalmente o uso de adubos nitrogenados, foi sem dúvida um dos fatores que mais contribuíram para a expansão da soja no Brasil (Peres e Vidor, 1980; Vargas e Suhet, 1980). Para fornecer nitrogênio às cultivares com produtividade alta, os rizobiologistas têm trabalhado para a seleção de estirpes com maior capacidade de fixação de N<sub>2</sub> e melhorias na técnica de inoculação. Assim, patamares superiores a 4.000 kg/ha são obtidos exclusivamente pela inoculação (Mendes et al., 2002), não sendo necessária nenhuma complementação com fertilizantes nitrogenados. A economia anual pela não utilização de adubo nitrogenado em 42 milhões de hectares cultivados anualmente no País com a soja (CONAB 2015) é da ordem de 8 bilhões de dólares (cerca de 32 bilhões de reais), sem mencionar que o processo biológico não causa poluição ambiental, diferentemente dos adubos nitrogenados.

Outro ponto que merece destaque é que em vários países do mundo, a reinoculação, ou seja, a inoculação da soja em áreas que já foram inoculadas anteriormente, não apresenta resultados satisfatórios em termos de aumento do rendimento de grãos. Entretanto, esse não é o caso do Brasil. A existência de um programa bem estruturado de seleção de estirpes de bradirizóbios para a soja no país permitiu o lançamento de novas estirpes, capazes de aumentar o rendimento dessa cultura mesmo em áreas com populações estabelecidas dessa bactéria. Diferentemente de 1970, quando foi introduzida no Brasil, hoje a maior parte dos solos cultivados com essa cultura já possuem populações estabelecidas de bradirizóbios capazes de nodular a soja e os cultivos sucessivos em uma mesma área promovem o estabelecimento de estirpes no

solo que poderiam interferir na resposta da planta à inoculação com as bactérias mais eficientes utilizadas no inoculante.

Para se estudar os efeitos da reinoculação foram conduzidos, na Embrapa Cerrados, seis experimentos em Latossolos com populações estabelecidas de bradirizóbios ( $10^3$  a  $10^4$  células  $g^{-1}$  solo). Em nenhum dos experimentos as diferenças de produtividade entre os tratamentos foram estatisticamente significativas a 5% de probabilidade (teste de Duncan). Mesmo assim, em três experimentos, em relação ao tratamento sem inoculação, ocorreram aumentos de produtividade em função da reinoculação com a combinação das estirpes CPAC 7 e CPAC 15 de 227, 636 e 345 kg grãos  $ha^{-1}$ . Em dois experimentos, com médias de produtividade de 4.162 kg  $ha^{-1}$ , não houve respostas à reinoculação e nem à adubação nitrogenada com 200 kg N  $ha^{-1}$ , evidenciando que o N não foi um fator limitante para a obtenção de produtividades altas. Em apenas um experimento houve resposta significativa à adubação com 200 kg N  $ha^{-1}$ , indicando a existência de fatores limitantes à fixação biológica do  $N_2$  (Mendes et al, 2002).

Em experimentos conduzidos durante cinco safras no Paraná, nos municípios de Londrina e Ponta Grossa, os incrementos nos rendimentos, promovidos pela reinoculação variaram de 3,2% a 15,2%. Pela análise conjunta dos resultados obtidos em 13 experimentos conduzidos em todos os estados produtores de soja, com diversas cultivares e sob diferentes sistemas de cultivo, constataram-se incrementos médios de 7,8% no rendimento nos ensaios conduzidos na Região Sul e de 3,8% na Região Centro-Oeste. Em média, para todos os ensaios, o incremento foi de 4,5%, valor estatisticamente significativo em relação aos tratamentos não inoculados (Hungria et al., 2006).

Apesar dos resultados apresentados anteriormente, de maneira crescente, nos últimos anos têm surgido dúvidas sobre a importância da reinoculação e a necessidade de adubar a soja com fertilizante nitrogenado. Inicialmente, com a expansão do plantio direto na região dos Cerrados foi divulgada a ideia de que seriam necessárias pequenas doses de adubo nitrogenado no plantio, no intuito de superar possíveis problemas relacionados à imobilização de nitrogênio pela palhada. Nesse caso o nitrogênio fica imóvel com a palhada

proveniente do plantio direto e não pode ser assimilado pela planta. No entanto, resultados de experimentos conduzidos a campo comprovaram que essa prática era totalmente desnecessária, tanto em áreas de plantio direto, quanto em áreas sob cultivo convencional, com aração e gradagem (Mendes et al, 2003).

Outra ideia que vinha sendo divulgada em encontros de produtores, era a de que a reinoculação não seria necessária e que a aplicação de N no pré-florescimento, ou no início do enchimento de grãos resultaria em incrementos no rendimento da soja, principalmente em condições de irrigação visando à alta produtividade (Lamond e Wesley, 2001). Diante disso, foram realizadas análises referentes a 54 ensaios conduzidos desde a safra 2000/2001 até a safra 2004/2005, sendo 40 ensaios em solos da Região Sul e 14 em solos de Cerrado, com o objetivo de avaliar os efeitos da reinoculação e da suplementação com fertilizante nitrogenado em estágios específicos do crescimento (pré-florescimento e início do enchimento de grãos) sobre as taxas de fixação biológica do N<sub>2</sub> e rendimento da soja (Mendes et al., 2007). Na Região Sul, a aplicação de doses altas de fertilizante nitrogenado reduziu a nodulação e a contribuição da FBN, sem resultar em qualquer incremento no rendimento de grãos, o que também ocorreu quando o nitrogênio foi aplicado nos estádios R2 ou R4 do desenvolvimento da soja. Analisando-se a média dos rendimentos da soja nos experimentos conduzidos no Cerrado, observou-se que, ao contrário do que ocorreu na Região Sul, a aplicação de fertilizante nitrogenado promoveu incrementos no rendimento da cultura, que variaram de 1,4 a 3,5 sacas de soja a mais por hectare. No entanto, diante das análises econômicas, observou-se que com a aplicação de fertilizantes nitrogenados, não existiria lucro para os produtores, já que os custos de produção com a adoção desta prática sempre superam as receitas.

Os resultados obtidos nos experimentos citados reforçam os benefícios econômicos e ambientais que resultam da substituição dos fertilizantes nitrogenados pela inoculação e indicaram, também, os benefícios resultantes da prática da reinoculação mesmo em solos com alta população estabelecida de *Bradyrhizobium*, que podem ser estirpes muito competitivas, mas com potencial de fixação de nitrogênio baixo.

### **3.2 Recomendação de Bradirizóbios em inoculantes para a cultura da soja no Brasil**

Atualmente quatro estirpes de *Bradyrhizobium* são indicadas para a inoculação na cultura da soja: SEMIA 5019 (29W) e SEMIA 587 lançadas em 1980 (Peres e Vidor, 1980), SEMIA 5080 (CPAC 7) e SEMIA 5079 (CPAC 15) lançadas em 1993 (Peres et al, 1994). Os principais fatores que levaram à inclusão das estirpes SEMIA 5080 (CPAC 7) e SEMIA 5079 (CPAC 15) no inoculante comercial foram a maior eficiência fixadora (na época comprovada estatisticamente pela análise conjunta de 16 experimentos realizados em rede) e a maior capacidade de competição pelo sítios de infecção nodular, o que favorecia o estabelecimento nos nódulos, principalmente em áreas com população estabelecida (Vargas et al., 1993; Mendes et al., 1994). A estirpe SEMIA 5079 (CPAC 15) foi isolada em novembro de 1985, com o auxílio do método de redução de acetileno medido em nódulos individuais, a partir de uma população de estirpes pertencentes ao sorogrupo 566, estabelecida no campo experimental da Embrapa Cerrados (Peres et al, 1984). A estirpe SEMIA 5080 (CPAC 7) foi obtida a partir de uma subcultura da estirpe CB1809, originalmente norte-americana, mas que foi levada à Austrália sendo recomendada como excepcional pela organização de pesquisa científica industrial e para o bem estar (CSIRO). A variante natural CPAC 7, adaptada às condições endofoclimáticas do Cerrado, além de eficiente e capaz de nodular a cultivar IAC-2 (o que não ocorria com a estirpe CB1809 original) também apresentava capacidade competitiva alta.

Com relação ao isolamento da estirpe SEMIA 5079 (CPAC 15), em 1985, é interessante destacar que este fato ocorreu quando foi verificada pela primeira vez a dominância nos nódulos da soja de bactérias pertencentes ao sorogrupo da SEMIA 566 (que havia sido utilizada em inoculantes comerciais no período de 1966 a 1978), no campo experimental da Embrapa Cerrados, em uma área onde ela jamais havia sido introduzida (Vargas et al., 1993). Posteriormente, estirpes pertencentes ao sorogrupo SEMIA 566 também foram encontradas em diversos outros locais do Brasil, nunca cultivados anteriormente, inclusive na Amazônia (Ferreira e Hungria, 2002). Nos Estados Unidos, no Canadá e Polônia a dominância do sorogrupo USDA 123, que apresenta reação de

aglutinação, ou seja, pertence ao mesmo sorogrupo que a SEMIA 566, também é amplamente relatada (Damirgi et al., 1967; Semu e Hume, 1979; Kvien et al., 1981, Narozna et al., 2015). Todas essas observações foram motivo de preocupação entre os rizobiologistas brasileiros envolvidos nos trabalhos de seleção de estirpes para a soja, uma vez que a disseminação, no solo, de estirpes de rizóbio de baixa eficiência fixadora e alta competitividade pelos sítios de infecção nodular, poderia reduzir os níveis de produtividade dessa cultura, comprometendo o seu cultivo no País.

Estudos posteriores confirmaram que a SEMIA 5079 era mais eficiente que a estirpe SEMIA 566 original (Hungria et al., 1998) e que também era mais competitiva (Hungria et al., 1996 e 1998 e Scotti et al., 1997). A ideia por trás do isolamento e seleção da SEMIA 5079 foi a de obter, a partir da população já estabelecida no solo, uma estirpe de eficiência fixadora elevada e que apresentasse, simultaneamente, capacidade competitiva alta pelos sítios de infecção nodular e boa capacidade de sobrevivência saprofítica, capaz de fazer face à disseminação de estirpes de baixa eficiência fixadora no solo.

Em um experimento conduzido na Embrapa Cerrados foi verificado que, após cinco anos, mesmo nos tratamentos onde a estirpe SEMIA 5079 jamais foi inoculada, a ocorrência do sorogrupo SEMIA 566 (ao qual ela pertence) foi de 74% dos nódulos (Mendes et al., 2004). Esse resultado mostra que a inoculação com a SEMIA 5079 é uma estratégia eficaz e que pode ser utilizada para prevenir que estirpes de eficiência fixadora baixa e de competitividade alta venham a predominar nos nódulos da soja. O estabelecimento no solo de estirpes do sorogrupo 566 de origem desconhecida, pela alta competitividade e capacidade de migração pode ser uma penalidade, mas a colonização do solo com uma estirpe de eficiência fixadora elevada e de competitividade alta, como a 5079, constitui um benefício que não pode ser ignorado nem pelos rizobiologistas e nem pelos agricultores.

Considerando a importância da FBN no cultivo da soja e que o potencial genético dessa cultura é da ordem de 8.000 kg ha<sup>-1</sup> (Specht et al., 1999), alguns desafios ainda devem ser vencidos para que a FBN possa continuar suprindo as necessidades crescentes da cultura da soja em N. Inicialmente, é

necessário garantir que as novas cultivares de soja estabeleçam simbioses altamente eficazes no processo de FBN (Nicolás et al., 2006), inclusive no caso de materiais transgênicos. Em relação às estirpes, o bem sucedido programa de seleção, que resultou na identificação das variantes naturais SEMIA 5079 (=CPAC 15) e SEMIA 5080 (=CPAC 7) (Peres et al., 1993) deve continuar, porém acelerado pelo uso de marcadores moleculares (Barcellos *et al.*, 2007). Estudos de ecologia dos rizóbios também devem ser complementados, uma vez que taxas de recombinação gênica elevadas e de transferência horizontal de genes entre estirpes inoculantes e rizóbios nativos foram observadas nos solos da região do Cerrado (Batista et al., 2007; Barcellos et al., 2007), e podem afetar, no futuro, as respostas à inoculação. Finalmente, é necessário dar continuidade ao desenvolvimento e validação de novos inoculantes e tecnologias de inoculação, podendo-se citar, como exemplos, a inoculação no sulco para a compatibilização com o tratamento de sementes com fungicidas e o enriquecimento das sementes em molibdênio (Campos et al., 2001)

### **3.3 Diversidade e Taxonomia de Rizóbios**

Vários estudos relacionados à taxonomia e ecologia de rizóbios foram desenvolvidos ao longo dos anos. A habilidade de formação de nódulos nas raízes e, em alguns casos no caule, de plantas leguminosas, onde convertem o nitrogênio atmosférico em formas utilizáveis pela planta hospedeira foram determinantes no volume de trabalhos realizados nessa área do conhecimento.

Com o advento e aplicação de novas técnicas moleculares e em decorrência da importância econômica e ecológica dos rizóbios, estudos extensivos foram realizados nas últimas décadas com esse grupo de bactérias. Como resultado, novas estirpes têm sido descobertas e novos gêneros e espécies estão sendo descritos e classificados, causando profundas mudanças na taxonomia dos rizóbios.

### 3.3.1 Estudos clássicos de ecologia e taxonomia de rizóbios

Estudos clássicos estabeleceram que os micro-organismos que nodulavam as raízes permitiam às leguminosas obterem o nitrogênio do ar (Hellriegel e Wilfarth, 1888). Inicialmente os rizóbios eram considerados como uma espécie única, sendo denominados *Rhizobium leguminosarum* (Frank, 1889). Em seguida, Fred et al. (1932) basearam-se nos hospedeiros e em diferenças morfológicas e fisiológicas no reconhecimento e distinção de seis espécies de *Rhizobium*: *R. leguminosarum*, *R. trifolii*, *R. phaseoli*, *R. meliloti*, *R. japonicum* e *R. lupini*.

Por várias décadas, a caracterização e a taxonomia de rizóbios foram baseadas na habilidade específica da bactéria em nodular a planta hospedeira. Dessa forma as bactérias foram agrupadas de acordo com o grupo de hospedeiros que elas eram capazes de nodular, ou seja, era criado o conceito de inoculação cruzada. Um total de 20 grupos de inoculação cruzada foi identificado. Um novo gênero, o *Bradyrhizobium* (“bradus” etimologicamente grego, significa lento), abrangeu as espécies de crescimento lento. O microssimbionte da soja foi denominado de *Bradyrhizobium japonicum* (Jordam, 1982).

Posteriormente, já com o advento de técnicas de biologia molecular, Hennecke et al., (1985) analisaram fragmentos dos genes de rRNA 16S, dos dois grupos distintos pela taxonomia numérica e concluíram que realmente apresentavam diferenças filogenéticas, com um coeficiente de similaridade do fragmento de 0,53. Esses mesmos estudos notaram separações distintas entre os grupos, predizendo uma necessidade de reclassificá-los taxonomicamente.

### 3.3.3 Taxonomia e diversidade atual do gênero *Bradyrhizobium*

As estirpes de *Bradyrhizobium*, que nodulam soja efetivamente, eram todas conhecidas como *B. japonicum* (Jordan, 1982). Entretanto, na década de 1980 vários trabalhos constataram grande variabilidade genética e fisiológica entre

as estirpes de *B. japonicum* e, como consequência, Kuykendall et al. (1992) sugeriram a subdivisão de *Bradyrhizobium* em duas espécies, *B. japonicum* e *B. elkanii*. Esta última espécie é mais competitiva e mostra alta resistência a alguns antibióticos, enquanto *B. japonicum* é mais eficiente, pois fixa mais N<sub>2</sub>. Outra espécie, com a taxa de crescimento excepcionalmente lenta, foi proposta e denominada *B. liaoningense* (Xu et al., 1995). Rizóbios isolados de nódulos de *Lespedeza* sp., proveniente da China, levaram à descrição de uma nova espécie que foi nomeada *B. yuanmingense* (Yao et al., 2002), que não forma nódulos em soja. Existem muitas outras estirpes pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* que não nodulam soja e são simplesmente conhecidas como *Bradyrhizobium* sp., seguido pelo nome do gênero da leguminosa hospedeira entre parênteses, por exemplo, *Bradyrhizobium* sp. (*Acacia*), *Bradyrhizobium* sp. (*Aeschynomene* sp.) e *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) (Young e Haukka, 1996).

Rivas e colaboradores (2004) isolaram estirpes bacterianas endofíticas de crescimento lento de estruturas semelhantes a tumores em raízes de *Beta vulgaris*, no norte da Espanha. Estudos dessas bactérias, por meio de abordagens taxonômicas moleculares e fenotípicas, mostraram que elas representavam uma nova espécie de *Bradyrhizobium*, filogeneticamente similar ao *B. japonicum*. A esses isolados foi proposto o nome de *Bradyrhizobium betae*. Já o nome *B. canariense* foi proposto para designar estirpes de rizóbio isoladas de leguminosas arbustivas nas ilhas Canárias. Essa espécie difere das outras cinco espécies de *Bradyrhizobium* em várias características genotípicas, fisiológicas e ecológicas (Vinuesa et al., 2005). Estirpes de *B. canariense* são altamente tolerantes à acidez, nodulam diversas leguminosas nas tribos Genisteae e Loteae, mas não espécies de *Glycine*, gênero da soja.

Mais recentemente, a estirpe CPAC 7, a qual pertencia a espécie *B. japonicum*, foi denominada como uma nova espécie: *B. diazoeficiens* (Delamuta et al., 2013). Essa constatação foi feita após estudos que descreviam uma heterogeneidade morfológica genotípica e genômica entre estirpes de *B. japonicum*, dando subsídios para essa reclassificação em uma nova espécie.

### 3.4 Métodos para estudos ecológicos e de identificação de rizóbios

Sabe-se que o acesso à diversidade genética de rizóbios é um subsídio importante para o desenvolvimento de estratégias em longo prazo que contribuirão com a FBN e com o aumento da produtividade agrícola.

Hoje, os métodos de identificação de espécies de rizóbios são necessariamente baseados em análises de perfis de fragmentos genéticos e no sequenciamento genético, pois, não existem informações suficientes para diferenciação fenotípica dos mesmos (Young et al., 2001).

Técnicas de biologia molecular que utilizam estratégias de *fingerprint* para identificação de linhagens de bactérias são utilizadas, de forma geral, em estudos de diversidade de rizóbios. Os marcadores moleculares comumente utilizados para se caracterizar essa diversidade são: REP-PCR (Mishra et al., 2012), ERIC-PCR (Rashid et al., 2012), BOX-PCR (Rows et al., 2014), RAPD (Cauwenberghe et al., 2014) e (GTG)<sub>5</sub> (De Meyer et al., 2015). Alguns estudos ainda utilizam a técnica de restrição do rRNA 16S (Geufrachi et al., 2013) ou do espaço intergênico rRNA 16S-23S (Li et al., 2008). No entanto, todas essas técnicas não possuem uma resolução boa em nível de espécie, muito menos subespécies. Por exemplo: *Bradyrhizobium pachyrhizi* tem rRNA 16S 99,8% similar a *Bradyrhizobium elkanii*; *Mesorhizobium temperatum* e *Mesorhizobium gobiense* possuem rRNA 16S 99,9% similar; e *Rhizobium fabae* tem rRNA 16S 99% similar a *Rhizobium pisi* (Leite, 2015).

Como relatado, esses métodos moleculares não elucidam completamente a classificação/ identificação de estirpes de *Bradyrhizobium*, além de serem bastante laboriosos, o que impossibilita sua utilização para o estudo de um grande número de isolados. Diante disso, o desenvolvimento de um método confiável, mais abrangente e rápido se faz necessário.

A espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz associada ao tempo de voo (MALDI-TOF MS) mostra-se como um método que representa essa nova alternativa em abordagens taxonômicas. Ele

é baseado na caracterização de perfis de componentes moleculares (íons) específicos para cada espécie. Ao se utilizar essa tecnologia, estudos mostram que 99% das espécies de micro-organismos em questão são corretamente identificadas quando comparadas com painéis de identificação fenotípica ou sequenciamento de genes *rrs* (genes que decodificam sítios de reconhecimento ribossomal, muito utilizados hoje em dia como alternativa filogenética ao rRNA 16S) (Seng et al., 2009; Giebel et al., 2010)

No estudo de Ferreira e colaboradores (2011) constatou-se que a técnica de MALDI-TOF MS é um método rápido e confiável comparado com a análise de sequências de genes *housekeeping*, pois, discrimina estirpes com a mesma sequência *rrs*, mas com sequências distintas de *recA* e *atpD*. Isso representa um grande avanço na rapidez e na redução de custo por amostra identificada. Esse mesmo estudo também propôs que esse método pode representar uma nova forma de se estudar diversidade e ecologia em grandes populações de isolados, permitindo diferenciação entre gêneros, espécies e estirpes de rizóbios com uma eficiência próxima de 100%.

#### **3.4.1 Identificação de bactérias por meio de MALDI-TOF MS: Análise de dados e princípios de utilização**

Os primeiros trabalhos onde se utilizou a espectrometria de massa para identificação de micro-organismos foram realizados em 1975 por Anhalt e Fenselau que utilizaram uma fonte de ionização por impacto eletrônico (Fenselau e Demirev, 2008). Porém, esses experimentos não obtiveram uma boa reprodutividade dos resultados, principalmente pelas condições de crescimento e pelo meio de cultivo utilizado. Na década de 90, surgiu o primeiro trabalho, feito pelos pesquisadores Karas e Hillenkamp (Karas e Hillenkamp 1991), que utilizaram uma ionização branda, o que provocou novo interesse na aplicação da espectrometria de massa na identificação microbiana (Sandrim, Goldstein e Schumaker, 2013).

Cain e colaboradores (1994) diferenciaram bactérias pelo perfil proteico relacionado a íons de células lisadas detectados utilizando MALDI-TOF MS. Essa descoberta possibilitou a análise de biomarcadores com massas moleculares maiores, incluindo proteínas ribossomais (2-20 kDa) (Fenselau e Demirev, 2001). As moléculas detectadas com essa metodologia são proteínas originárias do citossol, com as mesmas características: abundância alta, caráter básico forte e hidrofiliçidade média (Ryzhov e Fenselau, 2001). Portanto, a identificação por MALDI-TOF MS está baseada na análise de características fenotípicas, as quais podem variar de acordo com o meio de cultura, condições de crescimento e de análise. Porém, essas variações em geral são mínimas, visto que existe uma padronização mundial para essas determinações (Vargha et al., 2006).

O método de identificação por meio de MALDI-TOF MS tem a capacidade de traçar um perfil de íons detectando principalmente proteínas e peptídeos, além de analisar misturas complexas tornando-o um método ideal para extratos não purificados de células bacterianas preservadas (Bruyne et al, 2011). Além de ser bastante sensível, esse método também é capaz de adquirir perfis moleculares originários de uma amostra contendo menos que  $10^4$  células intactas (Demirev e Fenselau, 2008). Além disso, o custo da análise pode chegar a um quarto do valor das metodologias convencionais (Seng et al., 2009).

Pelos motivos citados acima, a metodologia de identificação de micro-organismos com o uso do MALDI-TOF MS apresenta-se como um método rápido e de rendimento alto. Inicialmente ela foi aplicada para análises taxonômicas de bactérias (Holland et al., 1996; Demirev 1999). Posteriormente também foi utilizada de forma eficaz na identificação de leveduras e fungos filamentosos (Marklien et al., 2009; Hendrickx et al., 2011).

Existem dois métodos mais utilizados para o preparo da amostra: direto (células intactas) e de extração celular (proteica). No método direto uma porção da colônia isolada de um micro-organismo é espalhada diretamente sobre a placa-alvo e a matriz orgânica (substância que facilita a ionização da amostra) é depositada sobre ela. Esta técnica é utilizada com maior frequência para a

identificação de espécies bacterianas (Gaia Casati e Tonolla, 2011; Veloo et al., 2011). Por vezes, melhores resultados de identificação bacteriana são relatados com o uso da extração proteica, no qual o ácido fórmico é utilizado para a extração e a acetonitrila para solubilização de proteínas em um meio aquoso (Alatoom et al., 2011).

A resolução do espectro de massa obtido por MALDI-TOF MS depende de vários fatores como a escolha da matriz, da composição da mistura de solventes empregada para solubilizar a matriz, do procedimento de preparo da amostra e do método de aplicação da amostra na placa suporte que será utilizada no equipamento (Sedo et al., 2011).

Um grande número de matrizes diferentes está disponível comercialmente. Todas requerem algumas propriedades físicas e químicas para seu amplo uso: (a) uma eficiente absorvância no comprimento de onda de excitação do laser; (b) uma ionização eficiente; (c) uma estabilidade razoável para não interferir com o espectro de massa da amostra (Carbonelle et al., 2011). Ao absorver o laser de nitrogênio (luz UV,  $\lambda=337$  nm), a matriz o converte em energia térmica, ao mesmo tempo em que outra parcela da matriz é rapidamente aquecida sendo vaporizada com a amostra. A escolha da matriz depende da natureza da amostra a ser estudada. As matrizes mais comumente utilizadas são o ácido diidroxibenzóico (DHB), também conhecido como ácido gentísico; o ácido dimetoxi-4-hidroxicinâmico, também conhecido como ácido sinapínico (SA); e o ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA). O DHB permite o estudo de lipídeos, oligossacarídeos, glicopeptídeos e glicoproteínas. Geralmente o DHB é mais eficiente para componentes de massa molecular baixa, enquanto o SA e o CHCA permitem, especialmente, o estudo de peptídeos e proteínas (Carbonelle et al., 2011). O uso do ácido ferrúlico, como matriz, possibilita a análise de proteínas com massa molecular alta (maiores que 70 kDa) (LAY, 2001).

De forma geral, a volatilidade do solvente que solubiliza a matriz é, com frequência, modificada para promover, por exemplo, a ionização de biomoléculas de tamanhos maiores que exigem uma cristalização lenta; ou ainda, promover o aumento da evaporação do solvente de modo a formar

pequenos cristais homogêneos e, assim, aumentar a reprodutibilidade a cada disparo do laser (Sedo, Sedlacek e Zdrahal, 2011). A adição de um ácido na composição dos solventes é uma etapa lógica quando se deseja detectar espécies protonadas (íons carregados positivamente). Além do aumento na eficiência da ionização, o impacto positivo do aumento da concentração de ácidos na qualidade do perfil de íons gerados por MALDI-TOF MS pode ser explicado pelo aumento da solubilidade proteica e melhor eficiência na extração destes componentes (Sedo, Sedlacek e Zdrahal, 2011).

O programa computacional Biotyper (Bruker Daltonics, Alemanha) contém um banco de dados utilizado para identificação e comparação de micro-organismos, uma vez que contempla espectros obtidos por MALDI-TOF MS, oriundos de bactérias, fungos e leveduras (atualmente com cerca de 6.000 micro-organismos). Os resultados das análises comparativas com esse banco são disponibilizados na forma de escores na escala logarítmica que variam de 0 a 3,0; valores gerados pela comparação entre a lista de sinais detectados para um isolado desconhecido com um espectro de referência, levando em consideração informações referentes à razão massa/carga ( $m/z$ ), a intensidade relativa do sinal e as frequências dos picos presentes (Bel et al., 2011).

Com o intuito de prevenir identificações incorretas, o critério para se aceitar uma identificação é rigoroso. Assim, um resultado é considerado consistente, no que concerne à espécie do micro-organismo, quando apresentar um valor de log escore  $\geq 2,0$ . Quando o log escore ficar entre 1,7 e 2,0 apenas o gênero é confirmado. E, finalmente, quando o resultado for  $\leq 1,7$  significa insucesso na identificação (Marklein et al., 2009).

Em um primeiro momento o uso de MALDI-TOF MS na identificação taxonômica estava restrito aos laboratórios de pesquisa. No entanto com o desenvolvimento de equipamentos de fácil utilização, rotinas de identificação de patógenos existentes em laboratórios de microbiologia clínica começaram a mudar na direção de uma maior agilidade na obtenção dos resultados (Bizzinil e Greub, 2010). O advento de uma técnica que demanda um menor tempo de espera para a identificação microbiana, vem ao encontro das demandas por uma resposta rápida quanto à identidade dos agentes de contaminação

alimentar, de bioterrorismo e de micro-organismos de importância clínica resistentes à múltiplos antibióticos (Murray, 2010).

Além disso, a aplicabilidade de MALDI-TOF MS abrange os campos da biotecnologia, da microbiologia ambiental e industrial (Chalupova et al., 2012). No entanto, para estes micro-organismos em específico, geralmente se faz necessária uma etapa adicional, que consiste na implantação de uma biblioteca suplementar com a inserção dos espectros-padrão destas espécies. Isto porque, grande parte dos micro-organismos presentes nos bancos de dados comerciais para MALDI-TOF MS são de importância clínica e, portanto, não abrangem as espécies ambientais. É preciso identificar estes micro-organismos empregando técnicas capazes de discriminá-los com segurança, como as técnicas de biologia molecular que empregam PCR e sequenciamento, previamente à criação dos espectros-padrão a serem empregados nas identificações.

Este estudo teve como objetivo caracterizar a ocupação nodular por estirpes de *Bradyrhizobium* que nodulam a soja utilizando-se o método MALDI-TOF MS. Para isso, foi aproveitada a valiosa oportunidade oferecida por um experimento de longa duração conduzido na Embrapa Cerrados (iniciado em novembro de 2009), que monitora as estirpes de rizóbios recomendadas comercialmente para a cultura da soja, após sua introdução em um solo de Cerrado de primeiro cultivo. Os isolados dos nódulos de soja caracterizados por MALDI-TOF MS foram obtidos no sexto ano de condução desse experimento.

#### **4. Referências Bibliográficas**

ALATOOM, A. A. Comparison of direct colony method versus extraction method for identification of gram-positive cocci by use of Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 49, n. 8, p. 2868-73. 2011.

BARCELLOS, F.G.; MENNA, P.; BATISTA, J.S.S.; HUNGRIA, M. Evidence of horizontal transfer of symbiotic genes from a *Bradyrhizobium japonicum*

inoculant strain to indigenous *Sinorhizobium* (Ensifer) *fredii* and *Bradyrhizobium elkanii* in a Brazilian savannah soil. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 73, p. 2635-2643. 2007.

BATISTA, J.S.S.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F.G; FERREIRA, M.C.F; MENDES, I.C. Variability in *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* seven years after introduction of both the exotic microsymbiont and the soybean host in a Cerrados soil. *Microbial Ecology*. v. 53, p. 270-284. 2007.

BEL, A. D. Acceptance criteria for identification results of gram-negative rods by mass spectrometry. *Journal of Medical Microbiology*. v. 60, n. 5, p. 684-686. 2011.

BIZZINI, A.; GREUB, G. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. *Clinical Microbiology and Infection*. v. 16, p. 1614-1619. 2010.

CAMPO, R.J.; HUNGRIA, M.; MIURA, L.M.; MORAES, J.Z.; SIBALDELLI, R.N.R; MESQUITA, C.M; Avaliação de estirpes de *Bradyrhizobium*, inoculantes microbianos e métodos de inoculação em diferentes regiões do Brasil. In: *Resultados de Pesquisa da Embrapa Soja*. Embrapa Soja, Londrina, p. 30-35. 2001.

CARBONNELLE, E. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clinical Biochemistry*. v. 44, p. 104-109. 2011.

CHALUPOVA, J. MALDI-based intact spore mass spectrometry of downy and powdery mildews. *Journal of Mass Spectrometry*. v. 47, n. 8, p. 978-86. 2012.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento), 2015. Arroz. Séries Históricas de Área Plantada, Produtividade e Produção, Relativas às Safras 1976/77 a 2014/15. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1252&t=2> [acessado em 19 Dec 2015]

DAMIRGI, S.M.; FREDERICK, L.R.; ANDERSON, I.C. Serogroups of *Rhizobium japonicum* in soybean nodules as affected by soil types. *Agron. J.* v. 59, p. 10-12. 1967.

DE BRUYNE, K. Bacterial species identification from MALDI-TOF mass spectra through data analysis and machine learning. *Syst Appl Microbiol.* v. 34, p. 20–29. 2011.

DE MEYER, S. E.; DE BEUF, K.; VEKEMAN, B.; WILLEMS, A. A large diversity of nonrhizobial endophytes found in legume root nodules in Flanders (Belgium). *Soil Biology & Biochemistry.* v. 83, p. 1-11. 2015.

DELAMUTA, JRR; RIBEIRO, RA; ORMEÑO-ORRILHO, E; MELO, IS; MARTÍNEZ-ROMERO, E; HUNGRIA, M. Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* Group Ia strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp.nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* v. 63, n. 9, p. 3342-3351. 2013.

DEMIREV, P. A. Microorganism identification by mass spectrometry and protein database searches. *Analytical Chemistry.* v. 71, n. 14, p. 2732-2738. 1999.

FENSELAU, C.; DEMIREV, P. A. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews.* v. 20, n. 4, p. 157-171. 2008.

FERREIRA L, SA´NCHEZ-JUANES F, GARCÍA-FRAILE P, RIVAS R, MATEOS PF. MALDI-TOF Mass Spectrometry Is a Fast and Reliable Platform for Identification and Ecological Studies of Species from Family Rhizobiaceae. *PLoS ONE* 6(5): e20223. doi:10.1371/journal.pone.0020223.2011.

FERREIRA, M.C.; HUNGRIA, M. Recovery of soybean inoculant strains from uncropped soils in Brazil. *Field crops Research.* v. 79, p. 139-152. 2002.

FRANK, B. Über die Pilzsymbiose der Leguminosen. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft.* v. 7, p. 332-346. 1889.

FRED, E.B.; BALDWIN, I.L.; McCOY, E. Root nodule bacteria and leguminous plants. Madison, WI: University of Wisconsin. 1932.

GAIA, V.; CASATI, S.; TONOLLA, M. Rapid identification of *Legionella* spp. By MALDI-TOF MS based protein mass fingerprinting. Systematic and Applied Microbiology. v. 34, n.1, p. 40-44. 2011.

GIEBEL, R; WODEN, C; RUST, SM; KLEINHEIZ, GT; ROBBINS, M. Microbial fingerprinting using matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) Applications and Challenges. Adv Appl Microbiol. v. 71, p. 149-184. 2010.

HELLRIEGEL, H; WILFARTH, H. Untersuchungen über die Stickstoffnahrung der Gramineen und Leguminosen. Beilageheft zu der Zeitschrift des Vereins Rübenzucker-industrie deutschen Reiches. v. 38, p. 1-234. 1888.

HENDRICKX, M. Screening of strains of the *Candida parapsilosis* group of the BCCM/IHEM collection by MALDI-TOF MS. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. v. 70, n. 4, p. 544-548. 2011.

HENNECKE, H.; KALUZA, K.; THÖNYL, B.; FUHRMANN, M.; LUDWIG, W.; STACKEBRANDT, E. Concurrent evolution of nitrogenase genes and 16S rRNA in *Rhizobium* species and other nitrogen-fixing bacteria. Archive of Microbiology. v. 142, p. 342-348. 1985.

HERRIDGE, DF; PEOPLES, MB; BODDEY, RM; Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. Plant Soil. v. 311, p. 1–18. 2008.

HOLLAND, R. D. Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. Rapid Communications in Mass Spectrometry. v. 10, n. 10, p. 1227-1232. 1996.

HUNGRIA, M; VARGAS, M.A.T. Exploring the microbial diversity and soil management practices to optimize the contribution of soil microorganisms to plant nutrition. In: Biology of Plant-Microbe Interactions (Eds. Stacey, G., Mullin, B. and Gresshoff, P.M.). International Society of Molecular Plant-Microbe Interactions, St. Paul. p. 493-496 (Proceedings of the 8th International Symposium on Molecular Plant-Microbe Interactions). 1996.

HUNGRIA, M; BODDEY, L.H; SANTOS, M.A; VARGAS, M.A.T. Nitrogen fixation capacity and nodule occupancy by *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* strains. Biol. Fertil. Soils. v. 27, p. 393-399. 1998.

HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J.C.; CAMPO, R.J.; CRISPINO, C.C.; MORAES, J.Z; SIBALDELLI, R.N.R; MENDES, I.C.; ARIHARA, J. Nitrogen nutrition of soybean in Brazil: contributions of biological N<sub>2</sub> fixation and of N fertilizer to grain yield. Can. J. Plant Sci. v. 86, p. 927-939. 2006.

HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J.C.; CAMPO, R.J.; CRISPINO C.C.; MORAES, J.Z; SIBALDELLI, R.N.R; MENDES, I.C.; ARIHARA, J. Nitrogen nutrition of soybean in Brazil: contributions of biological N<sub>2</sub> fixation and of N fertilizer to grain yield. Can. J. Plant Sci. v. 86, p. 927-939. 2006.

JORDAM, D. C. Transfer of *Rhizobium japonicum*, Buchman 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov. , a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. International Journal of Systematic Bacteriology. v. 32, p. 136-139. 1982.

STRUPAT, K.; KARAS, M.; HILLENKAMP, F. "2,5-Dihydroxybenzoic acid: A new matrix for laser desorption—ionization mass spectrometry". International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes. v. 72, n. 111, p. 89–102. 1991.

KUYKENDALL, L.D.; SAXENA, B.; DEVINE, T.E.; UDELL, S.E. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp nov. Canadian Journal of Microbiology. v. 38, p. 501-505. 1992.

KVIEN, C.S.; G.E. HAM.; J.W. LAMBERT. Recovery of introduced *Rhizobium japonicum* strains by soybean genotypes. Agron. v. 73, p. 900-905. 1981.

LAMOND, R.E.; WESLEY, T.L. Adubação nitrogenada no momento certo para soja de alta produtividade. Informações Agronômicas, POTAFOS. v. 95, p. 6-7. 2001.

LAY, J. O; MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria\*. Mass Spectrometry Reviews. v. 20, n. 4, p. 172-194. 2001.

LEITE, J. Simbiose feijão-caupi e rizóbio: desempenho simbiótico do hospedeiro e diversidade de bactérias associadas aos nódulos. 2015, 111f. Tese (Doutorado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

LI, J.H.; WANG, E.T.; CHEN, W.F.; CHEN, W.X. Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. Soil Biology and Biochemistry. v.40, p. 238–246. 2008.

MARKLEIN, G. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. Journal of Clinical Microbiology. v. 47, n. 9, p. 2912-2917. 2009.

MENDES, I.C.; HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T. Soybean response to starter nitrogen and *Bradyrhizobium* inoculation on a cerrado oxisol under no-tillage and conventional tillage systems. Rev. Bras. Ci. Solo. v. 27, p. 81-87. 2004.

MENDES, I.C.; REIS JUNIOR, F.B.; MORAES, C.B.; HUNGRIA, M. inoculação do feijoeiro em Unaí, MG; cartilha para o produtor rural. Embrapa Cerrados, Planaltina. (Embrapa Cerrados, Documentos 175). 2007.

MENDES, I.C.; HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J; VARGAS, M. A T. Reinoculação da soja em solos de Cerrado. In: II CONGRESSO DE SOJA/MERCOSOJA Foz do Iguaçu. Resumos do II Congresso Brasileiro de Soja. 2002.

MISHRA, R. P.; TISSEYRE, P.; MELKONIAN, R.; CHAINTREUIL, C.; MICHÉ, L.; KLONOWSKA, A.; GONZALEZ, S.; BENA, G.; LAGUERRE, G.; MOULIN, L. Genetic diversity of *Mimosa pudica* rhizobial symbionts in soils of French Guiana: investigating the origin and diversity of *Burkholderia phymatum* and other beta-rhizobia. FEMS Microbiology Ecology. v. 79, p. 487-503. 2012.

MURRAY, P. R. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: usefulness for taxonomy and epidemiology. *Clinical Microbiology and Infection*. v. 16, n. 11, p. 1626-1630. 2010.

NICOLÁS, M.F.; HUNGRIA, M.; ARIAS, C.A.A. Identification of quantitative trait loci controlling nodulation and shoot mass in progenies from two Brazilian soybean cultivars. *Field Crops Research*. v. 95, n. 2-3, p. 355-366. 2006.

PERES, J. R. R.; SUHET, A. R.; MENDES, I. C.; VARGAS, M. A .T. Efeito da inoculação com rizóbio e da adubação nitrogenada em sete cultivares de feijão em um solo de cerrados. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, SP. v. 18, n. 3, p. 415-420. 1994.

PERES, J.R.R.; VIDOR, C. Seleção de estirpes de *Rhizobium japonicum* e competitividade por sítios de infecção nodular em cultivares de soja. *Agron. Sulriograndense*. v. 16, p. 205-219. 1980.

RASHID, R; Zamani, S. Genetic diversity in clinical isolates of *Escherichia coli* by enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)–PCR technique in Sanandaj hospitals. *Iranian Journal of Microbiology*. v. 5, n. 2, p. 126-131. 2013.

RIVAS, R.; WILLEMS, A.; PALOMO, J.L.; GARCÍA-BENAVIDES, P.; MATEOS, P.F.; MARTÍNEZMOLINA, E.; GILLIS, M.; VELÁZQUEZ, E. *Bradyrhizobium betae* sp. nov., isolated from roots of *Beta vulgaris* affected by tumour-like deformations. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. v. 54, p. 1271-1275. 2004.

RYZHOV, V.; FENSELAU, C. Characterization of the protein subset desorbed by MALDI from whole bacterial cells. *Analytical Chemistry*. v. 73, n. 4, p. 746-50. 2001.

SANDRIN, T. R.; GOLDSTEIN, J. E.; SCHUMAKER, S. MALDI TOF MS profiling of bacteria at the strain level: A review. *Mass Spectrometry Reviews*. v. 32, n. 3, p. 188-217. 2013.

SCOTTI, M.R.M.M.L.; CARVALHO-SILVA, D.R.; VARGAS, M.A.T.; NEVES M.C.P.; DOBEREINER, J. Changes in electrophoretic profiles of

lipopolysaccharides from competitive strains of *Bradyrhizobium* spp. induced by soybean roots. J Appl Microbiol. v. 83, p. 552-560. 1997.

SEDO, O.; SEDLACEK, I.; ZDRAHAL, Z. Sample preparation methods for MALDIMS profiling of bacteria. Mass Spectrometry Reviews. v. 30, n. 3, p. 417-34. 2011.

SEDO, O.; SEDLACEK, I.; ZDRAHAL, Z. Sample preparation methods for MALDIMS profiling of bacteria. Mass Spectrometry Reviews. v. 30, n. 3, p. 417-34. 2011.

SEMU, E.; HUME, D.J. Effects of inoculation and fertilizer N levels on N<sub>2</sub> fixation and yields of soybeans in Ontario. Can. J. Plant. Sci. v. 59, p. 1129-1137. 2012.

SENG, P.; GOURIET, F.; L.A. SCOLA, B.; FOURNIER, P.E. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Clin Infect Dis. v. 15, n. 49, p. 543-51. 2009.

SENG, P.; DRANCOURT; GOURIET. F.; L.A. SCOLA, B.; FOURNIER, P.E. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Clin Infect Dis. v. 15, n. 49, p. 543-51. 2009.

SPECHT, J.E.; HUME, D.J.; KUMUDINI, S.V. Soybean yield potential – a genetic and physiological perspective. Crop Sci. v. 39, p. 1560-1570. 1999.

VAN, CAUWENBERGHE.; VERSTRAETE, B.; LEMAIRE, B.; LIEVENS, B.; MICHIELS, J.; HONNAY, O. Population structure of root nodulating *Rhizobium leguminosarum* in *Vicia cracca* populations at local to regional geographic scales. Systematic and Applied Microbiology. v.37, p. 613-21. 2014.

VARGAS, M.A.T.; SUHET, A. R. Efeitos de tipos e níveis de inoculantes na soja cultivada em um solo de cerrado. Pesq. Agropec. Bras. v. 15, p. 343-347. 1980.

VARGAS, M.A.T.; MENDES, I.C.; SUHET, A.R. e PERES, J.R.R. Fixação Biológica do Nitrogênio. In: Arantes, N.E. e Souza, P.I.M. (Ed.). Cultura da soja nos Cerrados. Potafos, SP. p. 159-182. 1993.

VARGHA, M. Optimization of MALDI-TOF MS for strain level differentiation of *Arthrobacter* isolates. *Journal of Microbiological Methods*. v. 66, n. 3, p. 399-409. 2006.

VELOO, A. C. Identification of Gram-positive anaerobic cocci by MALDI-TOF mass spectrometry. *Systematic and Applied Microbiology*. v. 34, n. 1, p. 58-62. 2011.

VINUESA, P.; LEÓN-BARRIOS, M.; SILVA, C.; WILLEMS, A.; JARABO-LORENZO, A.; PÉREZGALDONA, R.; WERNER, D.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., an acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (Papilionoideae:Genisteeae) from the Canary islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. genistearum, *Bradyrhizobium genospecies* alpha and *Bradyrhizobium genospecies* beta. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. v. 55, p. 569-575. 2005.

XU, L.M.; GE, C.; CUI, Z.; LI, J. FAN, H. *Bradyrhizobium liaoningensis* sp. nov. isolated from the root nodules of soybean. *International Journal of Systematic Bacteriology*. v. 45, p. 706-711. 1995.

YAO, Z.Y.; KAN, F.L.; WANG, E.T.; WEI, G.H.; CHEN, W.X. Characterization of rhizobia that nodulate legume species of the genus *Lespedeza* and description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. v. 52, p. 2219-2230. 2002.

YOUNG, J.M., KUYKENDALL, L.D., MARTINEZ-ROMERO, E., KERR, A., SAWADA, H. A revision of *Rhizobium Frank* 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium Conn* 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al., 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* v. 51, p. 89–103. 2001

YOUNG, J.P.W.; HAUKKA, K.E. Diversity and phylogeny of rhizobia. *New Phytologist*. v. 133, p. 87-94. 1996.

**CAPÍTULO 1: Montagem de biblioteca de perfis moleculares obtidos por (MALDI-TOF MS) aplicada à identificação de estirpes de *Bradyrhizobium*.**

## 1.RESUMO

Estudos que demandam a identificação de sorogrupos de bactérias que nodulam a soja, a fim de identificar quais seriam os isolados presentes em nódulos provenientes do campo, vêm sendo desenvolvidos a partir de métodos que se utilizam de imunoaglutinação. Porém, a produção de anticorpos é bastante complicada e esbarra em questões de bioética, que restringem cada dia mais essa prática. Além disso, apesar de apresentarem uma eficácia satisfatória, esses métodos se limitam à identificação apenas de bactérias esperadas, não elucidando completamente a ocupação nodular por outras espécies. A espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz associada a tempo de voo (MALDI–TOF MS) é uma ferramenta tecnológica de alto rendimento que possui como uma das aplicações a comparação da impressão digital molecular, geralmente proteica, obtida a partir de células microbianas. Pela possibilidade de utilizar um protocolo simples e padronizado que pode ser aplicado a qualquer tipo de isolado bacteriano, permite o estudo de bactérias provenientes de nódulos de soja, com a condição de que bibliotecas suplementares sejam montadas para subsidiar a identificação de possíveis amostras ambientais. Dessa forma, esse trabalho procurou avaliar a possível identificação e tipagem de isolados de *Bradyrhizobium* provenientes de nódulos do campo por meio da construção de uma biblioteca suplementar de MALDI-TOF MS. Essa abordagem foi empregada para então investigar a viabilidade de utilização dessa ferramenta em estudos ecológicos de *Bradyrhizobium* a partir de nódulos de soja provenientes do campo. Utilizando bactérias parentais recomendadas comercialmente para inoculantes, construiu-se uma biblioteca suplementar por meio do programa computacional MALDI Biotyper (Bruker), e validou-se estatisticamente essa biblioteca por meio de análises de componentes principais (PCA) e Redes Neurais com o programa ClinPro Tools (Bruker). A montagem de uma biblioteca suplementar, afim de identificar estirpes de *Bradyrhizobium* foi bem sucedida e ela se mostrou eficaz na distinção das estirpes testadas de *Bradyrhizobium*.

**Palavras chaves:** Espectrometria de massas, identificação, suplementar, bactérias, soja.

## 2.INTRODUÇÃO

Estudos que demandam a identificação de sorogrupos de bactérias que nodulam a soja, a fim de identificar quais seriam os isolados presentes em nódulos provenientes do campo, vêm sendo desenvolvidos a partir de métodos que se utilizam de imunoaglutinação (Lima 1998). Porém, a produção de anticorpos é bastante complicada e esbarra em questões de bioética, que restringem cada dia mais essa prática (Andrade et al., 2002). Apesar de apresentarem uma eficácia satisfatória esses métodos se limitam à identificação apenas de bactérias esperadas, não elucidando completamente a ocupação nodular por outras espécies.

A espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz associada a tempo de voo (MALDI-TOF MS) é uma ferramenta tecnológica de alto rendimento baseada na comparação da impressão digital molecular, geralmente proteica, obtida a partir de células microbianas, com base em dados de espectros de referência por meio de uso de vários algoritmos integrados em sistemas recentemente disponíveis comercialmente. Nos últimos anos, esta ferramenta tem sido cada vez mais estudada e aplicada para identificação e fenotipagem de diversas espécies de micro-organismos (Welker e Moore 2011; Weiser et al., 2012). Por ser uma técnica simples, com pouco refinamento no preparo de amostras, permite que os extratos sejam provenientes até mesmo de misturas complexas (Lavigne 2013).

Muitos estudos que investigam a aplicação de MALDI-TOF MS em laboratórios de microbiologia clínica e vários exemplos dessa utilização em abordagens experimentais relacionados com as bactérias e os fungos foram publicados (Fensceslau et al 2004; Willams et al., 2003; Ruelle et al., 2004; Peter et al., 2016). No entanto, poucos estudos têm sido realizados sobre a sua aplicação à pesquisa de bactérias, que não sejam de importância clínica, principalmente aquelas que formam simbiose com a soja (Croxatto et al., 2012). Isto se dá pelo fato de que, a maior parte dos equipamentos disponíveis para essa finalidade está instalada de empresas com interesse em diagnósticos clínicos. Porém, é possível utilizar um protocolo simples e padronizado que pode ser aplicado a qualquer tipo de isolado bacteriano,

permite o estudo de bactérias provenientes de nódulos de soja, com a condição de que bibliotecas suplementares sejam montadas para subsidiar a identificação de possíveis amostras ambientais.

Tradicionalmente, essas bactérias também são estudadas por técnicas de biologia molecular que aplicam estratégias de *fingerprint* para identificação de linhagens das mesmas e são utilizadas de forma geral em estudos de diversidade de rizóbios (Ferreira et al. 2011). Porém, como dito anteriormente essas técnicas não possuem uma boa resolução em nível de espécie, muito menos subespécies. Métodos moleculares não elucidam completamente a classificação/ identificação de estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*. Outro aspecto a considerar é que tratam de metodologias bastante complexas e lentas, o que impossibilita a abrangência de vários isolados de uma vez.

Observando essas limitações dos métodos moleculares, a técnica de MALDI-TOF MS é alternativa plausível. Com o observado no estudo de Ferreira e colaboradores (2011) essa técnica é rápida e bastante confiável quando comparada com as análises de genes *housekeeping*. Ainda ficou evidente que esse método é uma nova forma de estudar diversidade de ecologia em grandes populações de isolados permitindo diferenciação entre gêneros e espécies de rizóbios com uma eficiência de 100%. Porém, a identificação de isolados de soja em nível de campo precisa de uma resolução em nível de estirpes, pois essa é diferença de alguns isolados presentes em inoculantes comerciais, *Bradyrhizobium japonicum* (CPAC 15), *Bradyrhizobium elkanii* (29W e SEMIA 587) e *Bradyrhizobium diazoefficiens* (CPAC 7). Essa resolução ainda precisa ser testada e avaliada quanto à eficiência.

Portanto, a proposta desse capítulo foi avaliar a possível identificação e tipagem de isolados desses sorogrupos/estirpes parentais por meio da construção de uma biblioteca suplementar de MALDI-TOF MS e aplicação de ferramentas estatísticas. Dessa forma, a proposta visou investigar a utilização dessa ferramenta em estudos ecológicos para esse grupo a partir de nódulos de soja provenientes do campo.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Estirpes parentais**

As estirpes parentais são de isolados pertencentes ao banco de germoplasma da Embrapa Cerrados que foram estudados, caracterizados e recomendados para inoculantes comerciais na década de 80 e 90 (Peres e Vidor, 1980; Peres et al. 1993). As estirpes CPAC 7 (=SEMIA 5080) e a CPAC15 (=SEMIA 5079), são pertencentes aos serogrupos respectivos CB 1809 e USDA 123, já a SEMIA 29W (SEMIA 5019) e SEMIA 587 são pertencentes a sorogrupos homônimos (Boddey e Hungria, 1997). Caracterizações moleculares foram feitas em outros estudos, que garantiram a filogenia quanto à espécie dos isolados parentais (Delamuta et al., 2013, Souza 2006).

#### **3.2 Preparo dos isolados/amostras para MALDI-TOF MS**

Inóculos, provenientes de isolados parentais (CPAC 7, CPAC 15, SEMIA 587 e 29W) pertencentes ao banco de germoplasma da Embrapa Cerrados, a partir de uma única colônia crescida de cada estirpe em meio TY (10g Tryptona Bacteriana; 5g de extrato de levedura; 10g de NaCl; 1000 mL de água destilada; pH6,0) foram transferidos individualmente para microtubos de 1,5 mL com um palito e homogeneizados com 300 µL de água. Então, 700 µL de etanol absoluto foram adicionados à mistura e as amostras foram centrifugadas a 15.500 g por 2 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi seco à temperatura ambiente por uma hora. Em sequência, 30 µL de ácido fórmico (70%) e 30 µL de acetonitrila foram adicionados seguidos de homogeneização em vórtex e nova etapa de centrifugação a 15.500 g por 2 minutos. Um µL do sobrenadante foi colocado em poços de uma placa de ácido inoxidável do tipo MSP 96 (Bruker Daltonics, Alemanha) e deixado secar a temperatura ambiente. Em seguida, a cada poço foi adicionado 1 µL de matriz constituída de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (preparada com 250 µL de acetonitrila, 200 µL de água tipo I e 50 µL de ácido trifluoroacético 3%) e mais

uma vez secou-se à temperatura ambiente até análise no espectrômetro de massa.

### **3.2 MALDI-TOF MS**

Utilizou-se o modelo MicroFlex LRF (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) para obter todos os espectros de massa. Esse aparelho emprega um laser de nitrogênio com 337 nm na intensidade de 20-65%, no modo linear positivo. A aceleração no modo linear utilizada foi de 20 Hz com uma faixa de razões massa/carga detectadas de  $m/z$  2.000 a 20.000. O laser foi disparado 240 vezes, dividido em seis etapas de 40 disparos que partem de posições diferentes do alvo, sendo que esses disparos, apenas quando encontram regiões ionizáveis das amostras, são acumulados para obtenção do espectro final. Essa aquisição foi realizada no modo automático com varredura em cada *spot* em espiral sendo que os picos foram detectados utilizando o algoritmo centroide conforme a configuração padrão do fabricante (sinal/ruído: 2; limite mínimo de intensidade: 600; número máximo de picos: 300). O equipamento foi calibrado por um extrato de proteínas da bactéria *Escherichia coli* fornecido comercialmente como padrão pelo fabricante (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha).

### **3.3 Implantação de banco de dados suplementar**

O espectro padrão de cada estirpe/subespécie foi obtido utilizando um compilado de, no mínimo, 48 espectros originados de 24 réplicas biológicas. Para tal, uma extração celular individual foi realizada partindo do crescimento celular de 24 isolados. Assim, um total de 24 extrações individuais foram obtidas para cada micro-organismo e depositados em réplicas, totalizando 48 espectros a serem inseridos no banco. Dos 48 espectros gerados, um mínimo de 40 espectros foi utilizado para gerar a lista de sinais  $m/z$  que compõem o espectro padrão. A adição dos espectros-padrão foi realizada utilizando a ferramenta “criação de perfis de espectros de massa” (*Mass Spectra Profile*

(MSP) creation) presente no programa Biotyper (Bruker Daltonics, versão 3.0) que compreende os parâmetros padrão estipulados pelo fabricante (Frequência mínima desejada para o pico: 25%; Número máximo de picos desejados para compor o MSP: 70).

Este banco de dados suplementar foi subsequentemente utilizado para reavaliar todos os espectros coletados e não identificados pelo banco de dados comercial Biotyper.

### **3.4 Análise estatística usando ClinPro software Tools**

Os espectros de massa foram adquiridos e processados com auxílio do programa computacional FlexAnalysis (Versão 3.3, Bruker Daltonics, Alemanha). A análise dos dados começou com o pré-tratamento de dados brutos adquiridos, incluindo a subtração da linha de base, a normalização de um conjunto de espectros. Subsequentemente, os espectros de massa foram abertos no ClinPro Tools Software versão 2.2 (Bruker Daltonics, Alemanha) para análise estatística. Este programa foi utilizado para a comparação e inspeção dos espectros de massa, bem como para a identificação de picos específicos a fim de discriminar as estirpes analisadas.

Para comparar as estirpes individuais, o mesmo número de espectros para cada estirpe foi analisado utilizando a ferramenta ClinPro. Os espectros tinham uma abrangência de 2 a 20 kDa. Para validar cada análise estatística, no mínimo 40 espectros de cada estirpe foram submetidos à análise com o software e recalibrados automaticamente com um algoritmo específico que já está presente no ClinPro Tools. Como relatado no procedimento do fabricante, a função da recalibração é a de reduzir possíveis deslocamentos de massa molecular que ocorreram durante a medição múltipla da mesma amostra obtida em uma única amostra ou em diferentes experimentos.

Depois do processo de recalibração, o software automaticamente criou um espectro médio de todas as repetições de cada estirpe padrão. Os espectros médios obtidos foram comparados uns com os outros e um relatório de picos

estava disponível. O teste estatístico dos conjuntos de dados foi realizado com base em estatística multivariada centrada na Análise de Componentes Principais (PCA) e os resultados foram apresentados em uma trama tridimensional, o qual foi gerado automaticamente pelo software. A PCA reduz as variáveis do conjunto de dados complexo, gerando um conjunto de novas variáveis chamado de Componentes Principais (PC) (Joliffe 2002).

Os mesmos espectros de massa foram analisados por um algoritmo estatístico supervisionado para encontrar os picos com a separação provavelmente mais alta sob uma visão uni ou multivariada dos dados. Neste estudo, três algoritmos estatísticos incluídos no software foram utilizados: QuickClassifier (algoritmo univariado), Redes Neurais Supervisionadas (algoritmo multivariado) e Algoritmos Genéticos (algoritmo multivariado).

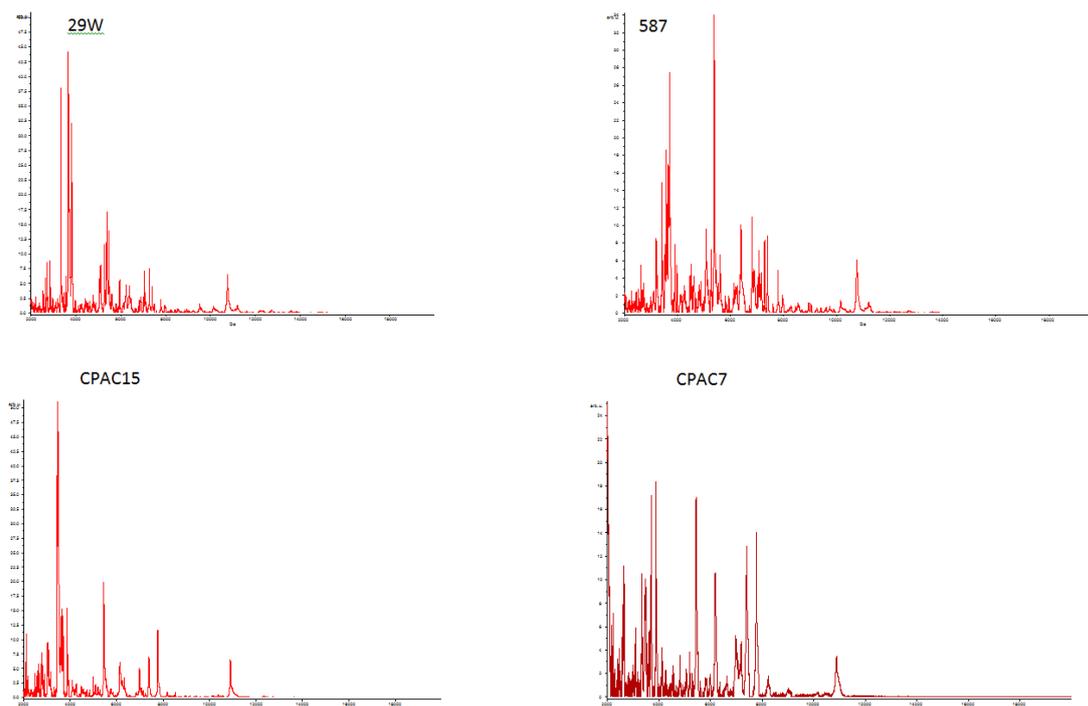
Os algoritmos utilizados automaticamente determinaram o melhor número de picos a ser integrado no modelo estatístico, a fim de diferenciar as estirpes, com base no parâmetro de capacidade de reconhecimento (RC). Além disso, os algoritmos avaliam a viabilidade do modelo estatístico criado pelo coeficiente de variação (CV); este parâmetro pode ser utilizado também para prever como esse modelo irá se comportar no futuro.

O algoritmo com a maior pontuação de RC e o melhor valor de CV, considerando também o número de picos utilizados para obter o modelo, foi escolhido como referência para analisar os espectros dos isolados/estirpes. A presença/ausência de cada pico discriminante foi avaliada por comparação dos espectros médios automaticamente criados a partir de todas as repetições.

## 4.2. RESULTADOS

### 4.1 Montagem de Biblioteca Suplementar em espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz associada ao tempo de voo (MALDI-TOF MS), aplicada para identificação de estirpes de *Bradyrhizobium*

Espectros de massa com aquisição bem sucedida de 24 isolados com crescimentos diferenciais para cada estirpe padrão foram obtidos na faixa de massa variando entre 2-20 kDa (Figura 1). Também foi observado um grande número de picos, em grande parte visualmente coincidentes e alguns poucos não coincidentes, para todas as amostras. Esse grande número de picos demandou análises mais sensíveis, nesse caso as análises de componentes principais (PCA), no intuito de validar a diferenciação de identificação de estirpes distintas.



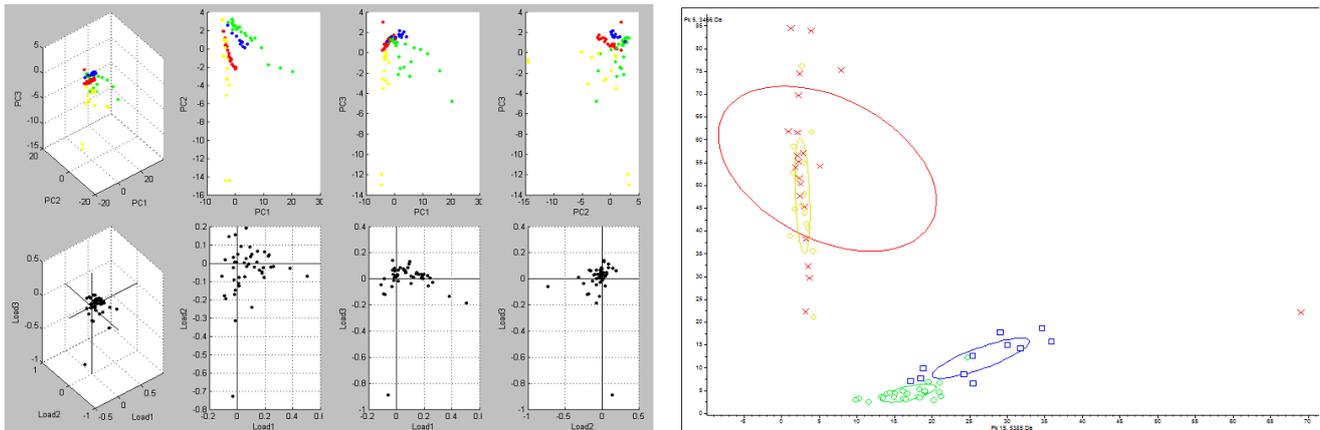
**Figura 1-** Espectros padrão das quatro estirpes parentais obtidos a partir da média de 24 aquisições distintas dos crescimentos dos isolados/estirpes.

## **4.2 Análise de componentes principais como ferramenta para validação de diferenciação das bibliotecas.**

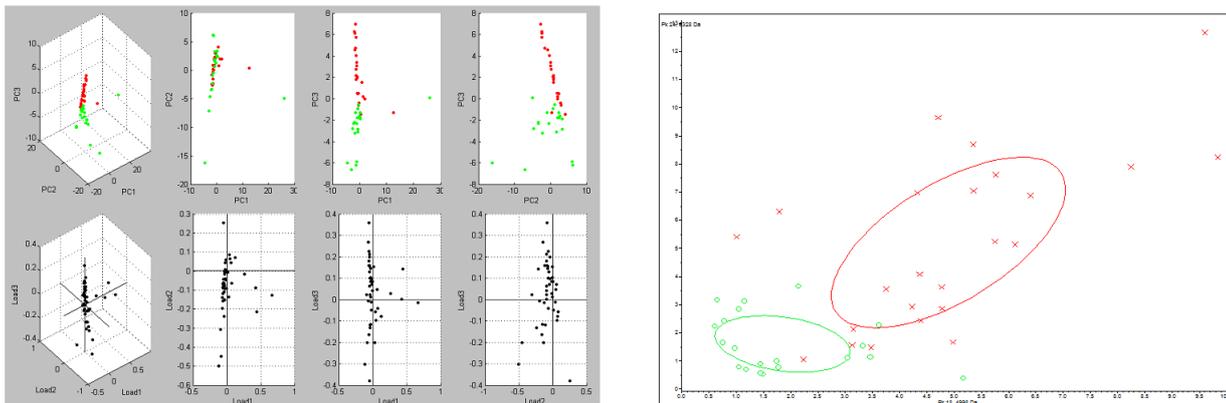
Para corroborar e evidenciar as possíveis diferenças observadas no perfil de íons das estirpes de bactérias, os espectros foram importados no ClinPro Tools Software. A análise de dados começou com o pré-tratamento de dados brutos, normalização, subtração de base, definição de pico, e recalibração. Em seguida, a comparação automática de múltiplos espectros foi realizada. Posteriormente à obtenção de espectros padrão, a estratégia de estatística multivariada denominada de Análise de Componentes Principais (PCA) foi aplicada ao conjunto de dados (Figura 2).

Na figura 2 pode-se também visualizar a análise estatística (PCA) em outras representações como a “*2D Peak distribution view*” e a “*PCA-3D dot plot window*”. Em todas essas análises não houve sobreposição das estirpes 29 W, 587 e conseqüentemente permitiu a diferenciação inequívoca das mesmas, e dessas em relação a CPAC 7 e CPAC 15. Porém, nessas mesmas análises, considerando a escala de variância do grupo 29 W e 587, houve sobreposição entre as estirpes CPAC 7 e CPAC 15. Esse resultado demandou uma análise exclusiva para essas duas últimas estirpes, considerando apenas a variância de picos entre as duas, onde se evidenciou a diferenciação e ausência de sobreposição entre elas (Figura 3).

De acordo com a variância de picos obtidos pode-se afirmar que existe separação e diferenciação estatística entre as bibliotecas criadas. Permitindo a identificação em nível de estirpe.



**Figura 2-** Análise de componentes principais (ClinPro Tools) de todos os espectros obtidos das estirpes parentais. A CPAC 15 é representada pela cor amarela a CPAC 7 pela cor vermelha, a SEMIA 587 pela cor azul e a 29W pela cor verde. A eclipse de confiança respeita uma circuncisão de 95%.

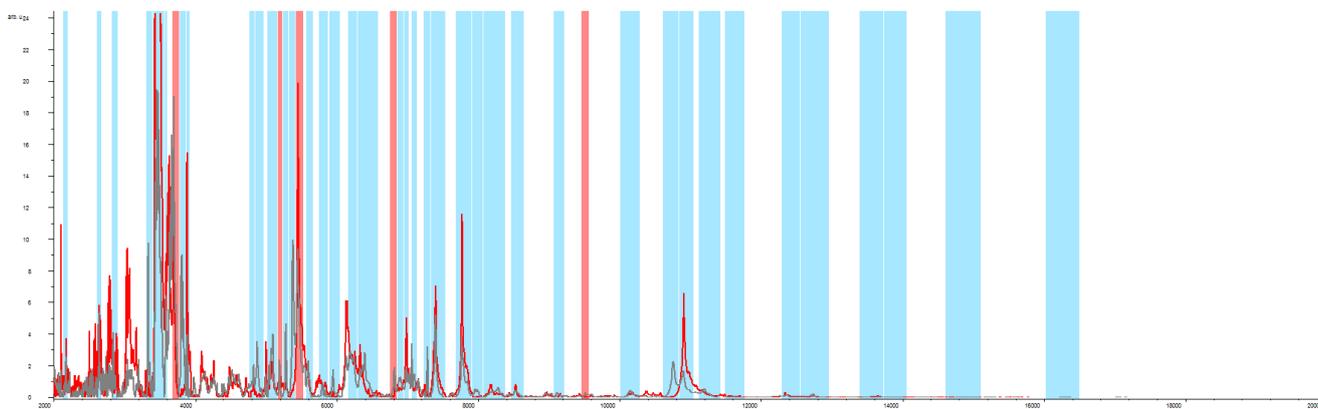


**Figura 3-** Análise de componentes principais (ClinPro Tools) de todos os espectros adquiridos das estirpes CPAC 7 e CPAC 15. A CPAC 15 é representada pela cor vermelha CPAC 7 pela cor verde. A eclipse de confiança respeita uma circuncisão de 95%.

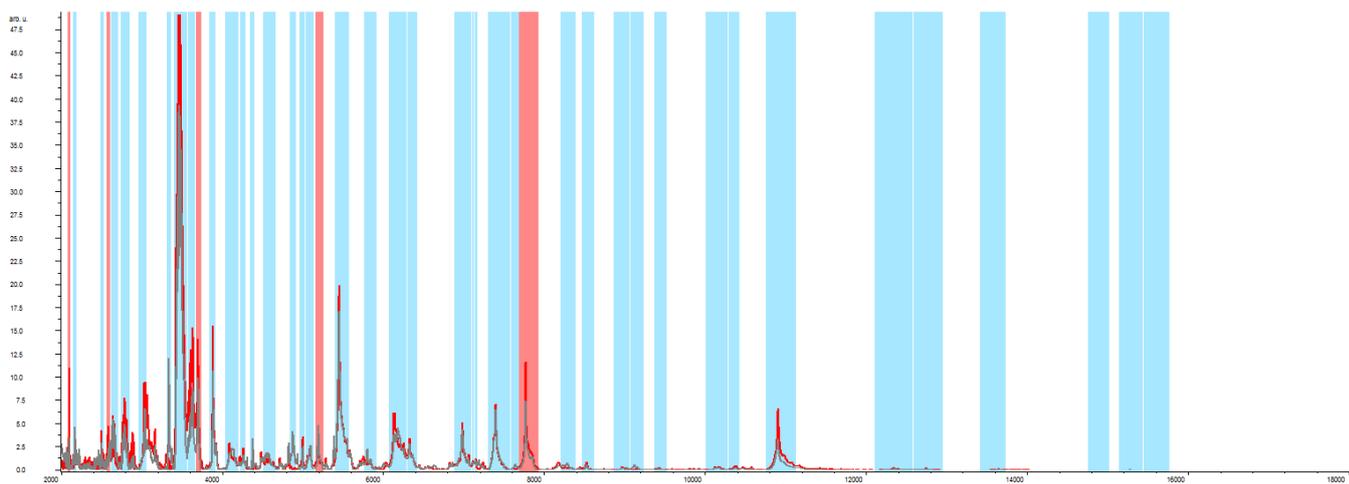
## 4.2 Análise de redes neurais para identificação de picos não coincidentes e determinantes para diferenciação das bibliotecas

Subsequentemente, a fim de revelar a discriminação entre picos para possível diferenciação entre as quatro estirpes, uma análise de redes neurais com 3 algoritmos estatísticos foi aplicada (*Supervised Neural Network, Genetic Algorithm e QuickClassifier*). Notavelmente, os resultados obtidos utilizando o algoritmo genético (Genetic Algorithm) apresentaram valores maiores para a capacidade de reconhecimento (RC) e coeficiente de variação (CV).

Foram identificados, ao observar todas as bibliotecas juntas, cinco picos discriminantes entre m/z 2000 e 12000 (GA: 100 %; CV 97,85%) (Figura 4). Também foram observados perfis semelhantes quando comparadas somente as estirpes CPAC 7 e CPAC 15, contudo com cinco picos discriminantes entre m/z 2000 e 8000 (GA: 100 %; CV 98,35%) (Figura 5).



**Figura 4.** Gráfico de rede neurais (genetic algorithmic) de espectros de massa MALDI-TOF adquiridos das quatro estirpes estudadas. Na análise de redes neurais os picos coincidentes são representados pela cor azul e os diferenciais pela cor vermelha.



**Figura 5.** Gráfico de rede neurais (*genetic algorithm*) os espectros adquiridos das estirpes CPAC 7 e CPAC 15 na faixa de m/z 2000 a 18000. Na análise de redes neurais os picos coincidentes são representados pela cor azul e os diferenciais pela cor vermelha.

Dessa forma é possível observar que existe corroboração estatística também em relação ao perfil proteico dos íons referentes aos espectros das bibliotecas para subsidiar a diferenciação entre as estirpes.

## 5. DISCUSSÃO

Estudos anteriores já obtiveram resultados satisfatórios para identificação de espécies bacterianas, particularmente com espécies de rizóbios (Ferreita et al., 2011). Portanto, nesse mesmo estudo, os autores evidenciaram que havia apenas garantia para identificação ao nível de espécie. Como no presente trabalho existem estirpes de bactérias com gêneros e também espécies coincidentes, apresenta-se a necessidade de um refinamento na acurácia da técnica e a validação por meio de outras ferramentas estatísticas.

Ficou evidente com a demonstração estatística que é possível a implementação dessa biblioteca para identificação de rizóbios ao nível de estirpe, mesmo quando estas pertencem a uma mesma espécie (29W e SEMIA 587). Portanto, espera-se que ela possa ser utilizada em estudos de isolados de bactérias que povoam nódulos de soja.

A separação de duas estirpes, a CPAC 7 e a CPAC 15, que eram consideradas da mesma espécie, até a descrição de Delamuta et al., (2013), ocorreu apenas após uma comparação entre as duas em análises estatísticas independentes. Portanto a maior similaridade entre duas estirpes de espécies diferentes, que anteriormente eram da mesma espécie, sugere que estudos mais aprofundados precisem ser realizados a fim de esclarecer essa similaridade entre as estirpes de espécies diferentes. Tendo em vista que a similaridade entre elas foi superior a estirpes da mesma espécie (29W e SEMIA 587).

Outro estudo descreveu a diferenciação via MALDI-TOF MS de estirpes de *Neisseria meningitide* e apesar de não terem sido validados estatisticamente os resultados práticos foram bastante conclusivos (Suarez et al., 2013).

Uma abordagem semelhante à do presente trabalho, de uma biblioteca suplementar para o uso de informações obtidas por MALDI-TOF MS, foi apresentada por Ziegler et al (2015). Nesse trabalho, a biblioteca suplementar em MALDI-TOF MS também foi utilizada para a identificação de estirpes de rizóbios. Os autores propuseram um uso em conjunto com biologia molecular para descrição de componentes moleculares mais adequados para diferenciação pela técnica.

As ferramentas estatísticas utilizadas nesse trabalho já serviram para validação da diferenciação de sorotipos de vírus (Calderaro, 2014). O uso de PCA e redes neurais evidenciou a possibilidade de diferenciação em nível de sorogrupos, corroborando a viabilidade de utilização da técnica. Apesar de apenas um desses estudos citados anteriormente se valer de ferramentas estatísticas para validação da técnica, todos eles utilizaram biologia molecular para corroborar o seus achados. As nossas estirpes parentais já haviam sido classificadas filogeneticamente via biologia molecular e por esse motivo optou-se por não aplicar seu uso comparativo no presente estudo (Delamuta et al., 2013; Souza, 2006). Apesar dessa caracterização molecular, são necessárias novas abordagens para correlacionar essa classificação com aquelas da identificação realizada por meio de MALDI-TOF MS, bem como possíveis mudanças genéticas em nível dos isolados.

## 6. CONCLUSÕES

- A montagem de uma biblioteca suplementar no intuito de identificar estirpes de *Bradyrhizobium* foi bem sucedida.
- A biblioteca suplementar foi validada estatisticamente e se mostrou eficaz na distinção das estirpes de *Bradyrhizobium* investigadas.

## 7. REFERÊNCIAS

ANDRADE, A; PINTO, SC; OLIVEIRA, RS. Animais de Laboratório: criação e experimentação. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ. p. 388. 2002.

CALDERARO, A; PIERGIANNI, M; BUTTRINI, M; MONTECCHINI, S; PICCOLO, G; GORRINI, C. MALDI-TOF mass spectrometry for the detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. V. 10, 1002-1056. 2015.

DE MEYER, S. E.; DE BEUF, K.; VEKEMAN, B.; WILLEMS, A. A large diversity of nonrhizobial endophytes found in legume root nodules in Flanders (Belgium). Soil Biology & Biochemistry. v. 83, p. 1-11. 2015.

DELAMUTA, J.R.R; RIBEIRO, RA; ORMEÑO-ORRILHO E, MELO IS, MARTÍNEZ-ROMERO E, HUNGRIA M, Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* Group Ia strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp.nov. Int J Syst Evol Microbiol. v. 63, n. 9, p. 3342-3351. 2013.

FERREIRA L, SA´NCHEZ-JUANES F, GARCÍA-FRAILE P, RIVAS R, MATEOS PF. MALDI-TOF Mass Spectrometry Is a Fast and Reliable Platform for Identification and Ecological Studies of Species from Family Rhizobiaceae. PLoS ONE 6(5): e20223. doi:10.1371/journal.pone.0020223.(2011).

JOLIFFE, I. T. Principal Component Analysis. 2nd edition (Springer-Verlag New York). 2002.

LIMA, S. C.; LOPES, E. S.; LEMOS E. G. M. Caracterização de rizóbios (*Bradyrhizobium japonicum*) e produtividade de soja. Sci. agric. v. 55, n.3, p. 45-69. 1998.

MISHRA, R. P.; TISSEYRE, P.; MELKONIAN, R.; CHAINTREUIL, C.; MICHÉ, L.; KLONOWSKA, A.; GONZALEZ, S.; BENA, G.; LAGUERRE, G.; MOULIN, L. Genetic diversity of *Mimosa pudica* rhizobial symbionts in soils of French Guiana: investigating the origin and diversity of *Burkholderia phymatum* and other beta-rhizobia. FEMS Microbiology Ecology. v. 79, p. 487-503. 2012.

PETER, M. KELLER.; VERA, BRUDERER.; FRANCO, MÜLLER.; Restricted identification of clinical pathogens categorized as biothreats by MALDI-TOF Mass Spectrometry. J. Clin. Microbiol. doi:10.1128/JCM.03250-15. 2016.

RASHID, R.; Zamani, S. Genetic diversity in clinical isolates of *Escherichia coli* by enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)–PCR technique in Sanandaj hospitals. Iranian Journal of Microbiology. v. 5, n.2, p. 126-131. 2013.

ROUWS, L. F. M.; LEITE, J.; DE MATOS, G. F.; ZILLI, J. E.; COELHO, M. R. R.; XAVIER, G. R.; FISCHER, D.; HARTMANN, A.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Endophytic *Bradyrhizobium* spp. isolates from sugarcane obtained through different culture strategies. Environmental Microbiology Reports. v. 6, p. 354–363. 2013.

SUAREZ, S.; FERRONI, A.; LOTZ, A.; JOLLEY, K.A.; GUERIN. P.; LETO, J.; DAUPHIN, B.; JAMET, A.; MAIDEN, M.C.; NASSIF, X.; ARMENGAUD, J. Ribosomal proteins as biomarkers for bacterial identification by mass spectrometry in the clinical microbiology laboratory. J Microbiol Methods. v. 94, p. 390–396. 2013.

WELKER, M.; MOORE, E. R. B.; Application of whole-cell matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in systematic microbiology. Syst. Appl. Microbiol. v. 34, p.2–11. 2011.

ZIEGLER, D.; POTHIER, P.; ARDLEY, J.; KOUAKOU, J.; PFLÜGER, S.; Ribosomal protein biomarkers provide root nodule bacterial identification

by MALDI-TOF MS. Applied Microbiology and Biotechnology. v. 99, p. 5547-5562. 2015.

**CAPÍTULO 2: Uso de espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz associada ao tempo de voo (MALDI-TOF MS) para caracterização da ocupação nodular de soja por estirpes de *Bradyrhizobium***

## 1 RESUMO

A região do Cerrado é uma das mais importantes quanto ao cultivo da soja (*Glycine max*) no Brasil. Em 2014/2015, 28 milhões de hectares foram cultivados com esse grão no Cerrado. Um dos fatores responsáveis pela expansão da soja para essa região é a sua capacidade de nodular e fixar nitrogênio eficientemente em simbiose com bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, resultando em uma economia anual de cerca de 8 bilhões de dólares. Ao serem introduzidas e estabelecidas originalmente nos solos do Cerrado, essas bactérias podem competir pelos sítios de infecção nodular nas raízes com as estirpes utilizadas no inoculante. As populações estabelecidas podem ser mais competitivas e menos eficientes na fixação biológica de nitrogênio (FBN). Essa competição com populações estabelecidas capazes de nodular a soja pode gerar dúvidas quanto ao benefício da reinoculação. Portanto, estudos que elucidem a ocupação por diferentes estirpes vêm sendo desenvolvidos. A abordagem de MALDI-TOF MS, cada vez mais substitui procedimentos baseados em fenotipagem (sorologia) e no DNA para uma identificação confiável de bactérias, em especial no tipo de abordagem proposta no presente capítulo. Este trabalho teve como objetivo caracterizar a ocupação nodular por estirpes de *Bradyrhizobium* que nodulam a soja, por meio de isolamentos de nódulos provenientes do sexto ano de um experimento de longa duração conduzido na Embrapa Cerrados (iniciado em novembro de 2009), que monitora as estirpes de rizóbios recomendadas comercialmente para a cultura da soja, após sua introdução em um solo de Cerrado de primeiro cultivo, utilizando-se o método MALDI-TOF MS. Verificou-se que a técnica de MALDI-TOF MS foi bem sucedida na identificação de isolados de campo em nível de estirpes, bem como a reinoculação garante a persistência na ocupação nodular das estirpes CPAC 7 e CPAC 15. Por último, os resultados do presente capítulo mostraram que a ausência de reinoculação abre espaço para a infecção por bactérias oportunistas que não são provenientes dos inoculantes.

**Palavras chaves:** Espectometria de massas, identificação, , competitividade, bactérias, soja.

## 2 INTRODUÇÃO

Dada à importância da região do Cerrado no cultivo de grãos e especialmente soja, a busca por práticas agrícolas que podem incrementar a produtividade dessas culturas, faz-se necessária. No caso da soja a capacidade de nodular e fixar nitrogênio eficientemente em simbiose com estirpes de *Bradyrhizobium* é um desses fatores que podem ainda incrementar essa produtividade, pois, populações estabelecidas anteriormente podem estar competindo com bactérias de inoculantes limitando a fixação biológica de N<sub>2</sub> (Mendes et al., 2004)..

Tradicionalmente, a caracterização da ocupação nodular em nódulos de soja é feita por meio da sorotipagem (Mendes et al, 2004; Mendes et al., 1994). O princípio dessa técnica baseia-se na imunoaglutinação (Vicent 1970). Os antissoros são preparados contra as estirpes parentais e os extratos de nódulos, após o processamento (antígeno), são analisados quanto à aglutinação em microplacas. Esse método é bastante eficiente e consegue abranger um grande número de amostras com pouco tempo e com custos relativamente baixos. No entanto, a produção de anticorpos envolve questões de bioética, que restringem cada dia mais o uso dessa técnica (Andrade et al., 2002). A imunoaglutinação limita-se à identificação apenas de bactérias esperadas, não elucidando completamente a ocupação nodular por outras espécies bacterianas (nódulos sem reação).

Na década de 90 e nos anos 2000 surgiram alternativas a esses métodos fenotípicos de identificação sorológica que são os métodos moleculares. A análise da sequência do gene RNA ribossomal 16S (rRNA 16S) permite a construção de filogenias bacterianas válidas (Schleifer 2009), mas carece de resolução e acurácia abaixo do nível da espécie devido à extensão e conservação do gene (Willems 2006). A análise da sequência de multilocus (MLSA) de genes com cernes conservados foi proposta como um método sólido e uma alternativa viável para a classificação de bactérias em nível de espécie (Gevers et al., 2005; Hanage et al., 2006) e foi utilizada com sucesso para delinear espécies dentro de um número de gêneros incluindo *Einsifer*,

anteriormente *Sinorhizobium* (Martens et al., 2008), e de *Bradyrhizobium* (Rivas et al., 2009). Contudo, filogenias incongruentes foram relatadas entre vários genes, normalmente utilizados no MLSA, juntamente com provas de transferência lateral de genes ou de recombinação intergênica, resultando em resolução taxonômica sem acurácia (Tian et al., 2012; Zhang et al., 2012). Nenhum método isolado de reconstrução genealógica atualmente engloba todos os níveis de diversidade bacteriana. Além disso, a análise molecular por marcadores é dispendiosa e trabalhosa, tornando-a inadequada para o uso em alto rendimento em estudos de larga escala da taxonomia, filogenia, biogeografia ou genética de populações de rizóbios. Por essas limitações o método clássico de sorotipagem continuou a ser empregado e mais recentemente uma nova alternativa foi proposta.

A abordagem de MALDI-TOF MS, cada vez mais substitui procedimentos baseados no DNA para uma identificação confiável de bactérias, em particular, nos laboratórios de diagnóstico, sendo amplamente utilizada para a caracterização de isolados clínicos (Seng et al., 2009). MALDI-TOF MS oferece a possibilidade de precisão e resolução que permitem a determinação identidade bacteriana em nível de gênero, espécie e até mesmo subespécies e tem sido aplicado com sucesso para diversas estirpes de rizóbios cultivadas em meios sólidos (Ferreira et al., 2011; Sánchez-Juanes et al., 2013; Ziegler et al., 2012) e isoladas de nódulos de leguminosas (Ziegler et al., 2012). Na maioria das análises diretas por MALDI-TOF MS, ou seja, de células isoladas, esse material bacteriano é utilizado para liberar as proteínas intracelulares, que são então ionizadas e separadas de acordo com as suas razões de massa/carga ( $m/z$ ) e registradas como picos distintos (componentes moleculares), gerando um espectro complexo, ou de uma impressão digital típica que é característica única de uma determinada amostra bacteriana. As assinaturas de perfis moleculares obtidas por meio de MALDI-TOF MS podem ser utilizadas para identificar amostras bacterianas desconhecidas para abaixo do nível de subespécie, desde que possam ser comparados com uma base de dados de espectros abrangente obtida com as estirpes selecionadas para representar os gêneros microbianos de interesse.

Este capítulo teve como objetivo caracterizar a ocupação nodular por estirpes de *Bradyrhizobium* que nodulam a soja utilizando-se o método MALDI TOF MS. Para isso, foi aproveitada a valiosa oportunidade oferecida por um experimento de longa duração conduzido na Embrapa Cerrados (iniciado em novembro de 2009), que monitora as estirpes de rizóbios recomendadas comercialmente para a cultura da soja, após sua introdução em um solo de Cerrado de primeiro cultivo. Os isolados dos nódulos de soja, caracterizados por MALDI-TOF MS foram obtidos no sexto ano de condução desse experimento.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Experimento em Condições de Campo**

Foi conduzido um experimento de campo (Figura 6), na estação experimental da Embrapa Cerrados, iniciado em novembro de 2009, que foi estabelecido em um Latossolo Vermelho de primeiro cultivo, após a retirada da vegetação original (Cerradão). O delineamento experimental foi de blocos ao acaso, com quatro repetições.

No primeiro ano do experimento (safra 2008/09), as estirpes das espécies *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5079 = CPAC 15), de *Bradyrhizobium diazoefficiens* (SEMIA 5080 = CPAC 7) e de *Bradyrhizobium elkanii* (SEMIA 587) foram introduzidas, individualmente, no solo, por meio da inoculação de sementes de soja (cultivar Raimunda). Também foram incluídos tratamentos sem inoculação e com adubação nitrogenada. As parcelas foram de 17 x 4 m<sup>2</sup>. A correção do solo com calcário e a adubação adequada foram realizadas de acordo com a análise de solo e as necessidades da cultura. A inoculação foi realizada com inoculantes turfosos de modo a se obter uma concentração de aproximadamente 1.000.000 células/semente. As parcelas consistiram de 9 linhas em espaçamento de 50 cm.

Nas safras seguintes (2009/2010, 2010/2011; 2011/2012, 2012/2013, 2013/2014 e 2014/2015), as parcelas foram subdivididas em três subparcelas

de 5 x 4 m<sup>2</sup> espaçadas por 1,0 m, onde a soja foi cultivada sob três tratamentos: a) sem inoculação, b) inoculação com a estirpe SEMIA 5079 (CPAC-15) e c) inoculação com a estirpe SEMIA 5080 (CPAC-7). No caso da SEMIA 587, havia um tratamento sem inoculação nos outros anos e um tratamento com reinoculação anual com essa mesma estirpe.



**Figura 1-** Experimento em campo, instalado em uma área recém-desmatada, afim de não haver contaminação com bactérias previamente estabelecidas no solo provenientes de inoculantes.

### **3.2 Caracterização das populações estabelecidas**

Nesse experimento foram obtidos, na época de floração na safra 2014/2015, 24 isolados de nódulo de soja por parcela totalizando um número de 1506 isolados. Esses isolados foram analisados e identificados segundo o seu mapa de íons (componentes moleculares) obtidos pela técnica de MALDI-TOF MS.

### 3.3 Caracterização das populações estabelecidas pela técnica de espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz associada ao tempo de voo (MALDI TOF MS).

#### 3.3.1 Isolamento e purificação dos isolados bacterianos

Os isolados foram obtidos de nódulos que foram esterilizados superficialmente com uma solução de hipoclorito a 2,5 %, perfurados e tiveram seu material repicado em placas de Petri contendo meio YMA (manitol-10,0g;  $K_2HPO_4$  0,5g;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ -0,2 g  $L^{-1}$ ; NaCl-0,1 g  $L^{-1}$ ; extrato de levedura-0,5 g; água destilada-1000 ml; pH 6,8; ágar). Após incubação por 5 dias em uma temperatura de 29°C, uma novo repique foi realizada para cada um dos isolados, a fim de obter uma colônia pura para cada um deles. Posteriormente, os isolados foram mantidos em réplicas em tubos âmbar contendo meio YMA com água de levedura a 4°C.



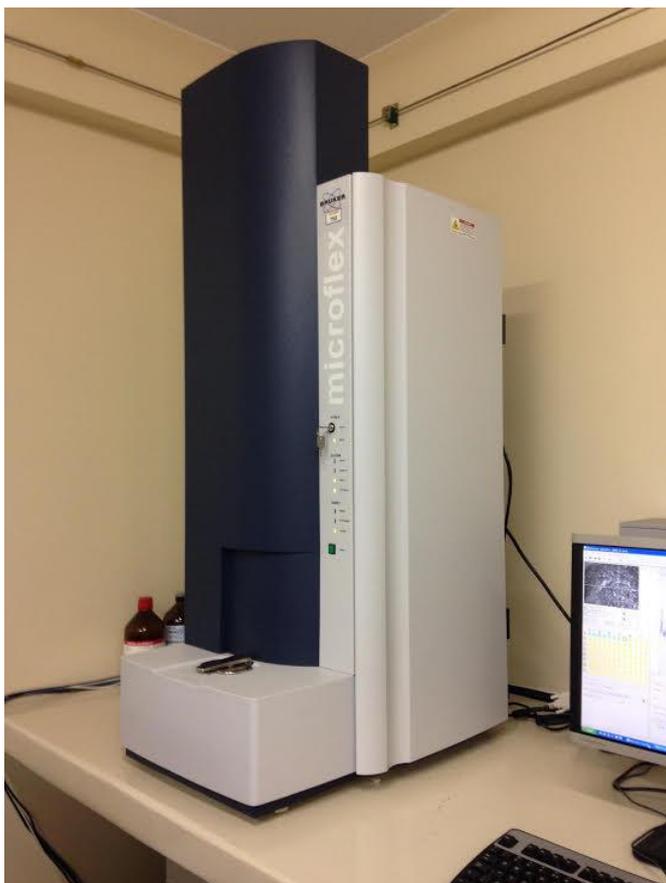
**Figura 2-** Fotos ilustrativas do processo de isolamento de bactérias a partir dos nódulos de soja.

#### 3.3.2 MALDI-TOF MS

Utilizou-se o modelo MicroFlex LRF (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) para obter todos os espectros de massa. Esse aparelho emprega um laser de nitrogênio com 337 nm na intensidade de 20-65%, no modo linear positivo. A aceleração no modo linear utilizada foi de 20 Hz com uma faixa de razões

massa/carga detectadas de  $m/z$  2.000 a 20.000. O laser foi disparado 240 vezes, dividido em seis etapas de 40 disparos que partem de posições diferentes do alvo, sendo que esses disparos, apenas quando encontram regiões ionizáveis das amostras, são acumulados para obtenção do espectro final. Essa aquisição foi realizada no modo automático com varredura em cada *spot* em espiral sendo que os picos foram detectados utilizando o algoritmo centroide conforme a configuração padrão do fabricante (sinal/ruído: 2; limite mínimo de intensidade: 600; número máximo de picos: 300). O equipamento foi calibrado por um extrato de proteínas da bactéria *Escherichia coli* fornecido comercialmente como padrão pelo fabricante (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha).

A identificação dos micro-organismos a partir dos espectros adquiridos foi realizada por meio de uma avaliação com o programa computacional MALDI Biotyper (versão 3.0, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Nessa ferramenta computacional os espectros de massa obtidos foram comparados com todos os espectros padrão presentes no banco de dados do MALDI Biotyper e também com a biblioteca suplementar gerada no capítulo anterior. Essa identificação por meio da comparação é baseada na razão massa/carga ( $m/z$ ) dos íons, a intensidade relativa e frequência de cada pico do espectro de massa correspondente. A saída dessa análise consistiu em uma tabela (relatório) em formato .xml com a espécie com maior valor de similaridade (log score) ranqueada na primeira posição, sendo que esse valor de log score varia de 0 a 3, seguindo uma escala crescente de similaridade. Valores de *log score* de 2,3 a 3,0 correspondem a uma identificação muito provável de espécie; entre 2,0 a 2,29 indicam muito provável do gênero e provável identificação da espécie; entre 1,7 a 1,99 indicam provável identificação do gênero; e entre 0,0 a 1,69 indicam identificação mal sucedida por conta da correspondência insuficiente entre o espectro da amostra e os espectros padrão.



**Figura 3-** Equipamento de MALDI TOF MS, MicroFlex (Bruker Daltonics), utilizado nas análises.

### 3.3.3 Análise estatística

O número de ocorrências segundo os perfis iônicos identificados por MALDI-TOF MS nas estirpes parentais e espécies/gêneros, que obtiveram uma ocorrência acima de 10% nos tratamentos (29W, SEMIA 587, CPAC 7, CPAC 15, *Rhizobium radiobacter*, *Enterobacter sp.* e *Cupriavidus sp.*), foram convertidos em percentagens de ocorrência nos nódulos e submetidos a análise de variância usando o pacote estatístico SAS (SAS Institute Cary, N.C.). As diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos foram determinadas pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

## **4 RESULTADOS**

### **4.1 Análise de MALDI-TOF MS em relação a sua eficiência na identificação de isolados de campo**

Um total de 1056 isolados bacterianos foram analisados (24 em cada parcela com quatro repetições e 11 tratamentos). Essas análises foram conduzidas em duplicatas, totalizando 2112 análises realizadas por meio de espectrometria de massa MALDI-TOF. Dessas 2112 análises, 221 (ou 10,5%) não foram adquiridas com sucesso, ou tiveram algum problema na aquisição dos espectros, (95% das réplicas foram adquiridas de forma conjunta, havendo apenas 5% de discrepância na aquisição dos espectros das mesmas); e 359 (17%) análises não foram identificadas com escore de confiabilidade suficiente. Dessa forma houve 72,5% de sucesso de aquisição de espectros e identificação pelo método, equivalentes a 1532 espectros identificados com sucesso no presente estudo.

Dos 1532 espectros adquiridos e identificados, 62% foram de rizóbios (*Rhizobium radiobacter*, CPAC 7, CPAC 15, SEMIA 587 e 29W), sendo 54% relacionados as estirpes parentais (CPAC 7, CPAC 15, SEMIA 587 e 29W), foram considerados sucesso de identificação em relação as estirpes parentais quando as mesmas obtiveram um *score* maior que 2 e a segunda identificação menor que 1.8. Portanto, o método mostrou-se confiável para a finalidade de identificação de isolados provenientes diretamente de nódulos.

Alguns isolados de espécies pouco observados em nódulos, principalmente de soja, também foram identificados e discussões sobre esses resultados serão realizadas posteriormente nesse capítulo.

### **4.2 Identificação de isolados por tratamento e verificação da competitividade quanto à ocupação nodular das estirpes introduzidas**

A tabela 1 é uma compilação dos dados de ocupação nodular de todas as estirpes e gêneros/espécies mais frequentes em cada tratamento evidenciando a sequência cronológica do mesmo.

Como observamos nessa tabela, a ocupação nodular por estirpes relacionadas ao perfil de íons CPAC 7 foi maior nos tratamentos em que a estirpe CPAC 7 foi reinoculada anualmente. Nos tratamentos onde a estirpe foi introduzida apenas no primeiro ano, sem a reinoculação anual, a ocupação nodular por estirpes relacionadas ao perfil de íons relacionados à CPAC 7 não foi detectada.

Também se observa que a ocupação nodular por estirpes relacionadas ao perfil de íons da estirpe CPAC 15 foi maior nos tratamentos em que a estirpe CPAC 15 foi reinoculada anualmente. Nos tratamentos onde a estirpe foi introduzida apenas no primeiro ano, sem reinoculação anual, a ocupação nodular por estirpes relacionadas ao perfil de íons relacionados à CPAC 15 com base no espectro padrão diminuiu drasticamente, em média 48%. Essa estirpe também se mostrou oportunista no tratamento inoculado apenas no primeiro ano com a SEMIA 587, pois a ocupação nodular foi bastante expressiva nesse tratamento.

A ocupação nodular por estirpes relacionadas ao perfil de íons da estirpe SEMIA 587 foi igual nos tratamentos em que a estirpe SEMIA 587 foi reinoculada anualmente e nos tratamentos onde a estirpe foi introduzida apenas no primeiro ano, sem reinoculação anual.

A ocupação nodular por espécies relacionadas ao perfil de íons da espécie *Rhizobium radiobacter* foi maior nos tratamentos em que a nunca houve inoculação e no tratamento não inoculado no primeiro ano e reinoculado nos outros anos com a estirpe CPAC 7. Essa espécie ocupou também nódulos no tratamento inoculado no primeiro ano com a estirpe CPAC 15 e reinoculado nos seguintes com a mesma estirpe e com a estirpe CPAC 7. Esses resultados demonstram que essa espécie tem um comportamento oportunista apresentando maiores índices em tratamentos controle.

A ocupação nodular relacionado ao perfil de íons do gênero *Cupriavidus* foi maior nos tratamentos em que a nunca houve inoculação de qualquer estirpe parental. Mais uma vez demonstrando que espécies oportunistas podem se aproveitar da ausência de inoculação para ocupar os nódulos. Já a ocupação nodular relacionada ao perfil de íons do gênero *Enterobacter* foi maior nos tratamentos em que não houve reinoculação anual da estirpe CPAC 15. Portanto a inoculação anual com a estirpe CPAC 15 mitiga a ocorrência desse gênero.

Outros grupos de bactérias que também ocupavam os nódulos de soja consistem em: *Lysinibacillus fusiformis*, *Ralstonia sp.*, *Serratia marcescens*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Brevibacillus centrosporus*, *Bacillus weihenstephanensis*, *Pseudomonas sp.*, *Burkholderia sp.*, *Achromobacter ruhlandii*, *Achromobacter denitrificans*, *Paenibacillus sp.*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Microbacterium natoriense*, *Rhizobium tropici*, *Bacillus cereus* e *Micrococcus luteus*. De maneira geral, bactérias desses grupos apresentaram maior ocupação nodular nos tratamentos inoculados no primeiro ano com a estirpe CPAC 7 e reinoculado nos anos subsequentes com a estirpe CPAC 15; inoculado no primeiro ano com a estirpe CPAC 15 e reinoculado nos anos subsequentes com a estirpe CPAC 7. Com esses resultados observa-se que nos tratamentos onde houve alternância ao longo dos anos das estirpes CPAC 7 e CPAC 15, houve o aparecimento dessas outras bactérias.

**Tabela 1.** Efeitos da inoculação na ocupação nodular na safra 2014/2015.

| Estirpe inoculada           |                              | % Ocupação nodular 6 <sup>anoa</sup> |         |       |     |                       |                    |                     |        |
|-----------------------------|------------------------------|--------------------------------------|---------|-------|-----|-----------------------|--------------------|---------------------|--------|
| Primeiro ano                | 2 <sup>o</sup> ano em diante | CPAC-7                               | CPAC-15 | 587   | 29W | <i>R. radiobacter</i> | <i>Cupriavidus</i> | <i>Enterobacter</i> | outros |
| Não Inoculado               | Não Inoc.                    | 0d                                   | 5e      | 0d    | 0b  | 47a                   | 25a                | 7c                  | 16abc  |
| Não Inoculado               | CPAC 7                       | 22a                                  | 5e      | 1d    | 2a  | 45a                   | 1b                 | 0                   | 23ab   |
| Não Inoculado               | CPAC 15                      | 0d                                   | 57ab    | 14bc  | 0b  | 8c                    | 0b                 | 10bc                | 10bc   |
| SEMIA 587                   | Não Inoc.                    | 7c                                   | 65a     | 15b   | 0b  | 0c                    | 0b                 | 4c                  | 9bc    |
| SEMIA 587                   | SEMIA 587                    | 0d                                   | 10e     | 19b   | 0b  | 0c                    | 0b                 | 54a                 | 17abc  |
| CPAC 7                      | CPAC 7                       | 15b                                  | 23d     | 10bcd | 1ab | 0c                    | 0b                 | 43a                 | 8bc    |
| CPAC 7                      | Não Inoc.                    | 0d                                   | 28d     | 35a   | 0b  | 11c                   | 0b                 | 9c                  | 17abc  |
| CPAC 7                      | CPAC 15                      | 0d                                   | 36dc    | 10bcd | 3a  | 10c                   | 0b                 | 12bc                | 30a    |
| CPAC 15                     | CPAC 15                      | 0d                                   | 67a     | 3cd   | 0b  | 27b                   | 0b                 | 0c                  | 2c     |
| CPAC 15                     | Não Inoc.                    | 0d                                   | 44bc    | 7bcd  | 0b  | 0c                    | 0b                 | 49a                 | 0c     |
| CPAC 15                     | CPAC 7                       | 16b                                  | 7e      | 16b   | 0b  | 10c                   | 0b                 | 22b                 | 28a    |
| Coeficiente de variação (%) |                              | 61                                   | 28      | 59    | 201 | 46                    | 70                 | 40                  | 74     |

<sup>a</sup> Médias de ocupação nodular nas colunas acompanhadas de letras diferentes foram estatisticamente diferentes a P<0.05 (Teste de Duncan).

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Eficiência na identificação de isolados de nódulos de soja por MALDI-TOF MS

A técnica de identificação de micro-organismos por MALDI-TOF MS vem sendo descrita cada vez mais como uma ferramenta tangível para o estudo de diversas espécies de rizóbios incluindo os gêneros *Bradyrhizobium*, *Ensifer*, *Shinella* e *Rhizobium*, sendo aplicável a uma grande população de isolados (Ferreira et al., 2011; Sánchez-Juanez et al., 2013).

Porém, nenhum desses estudos descreveu conclusivamente essa eficácia em nível de estirpes. Apenas um trabalho recente mostrou alguns resultados com resolução em nível de subespécie, mas também não era focado em estirpes de *Bradyrhizobium* e nem todos os isolados foram identificados em nível de estirpe (Ziegler et al., 2015).

O presente estudo teve como foco a utilização dessa técnica (MALDI-TOF MS), com o intuito de identificar estirpes/subespécies de *Bradyrhizobium*, a fim de caracterizar a ocupação nodular em soja sob diferentes tratamentos, com inoculação com estirpes distintas. Nesse caso, algumas estirpes são da mesma espécie (SEMIA 587 e 29W – *Bradyrhizobium elkanii*) e as outras estirpes possuem perfis proteicos bastante semelhantes, apesar de serem de espécies diferentes (CPAC 7 - *Bradyrhizobium diazoefficiens* e CPAC 15 - *Bradyrhizobium japonicum*).

Com os resultados apresentados pode-se afirmar que a técnica obteve sucesso na identificação dos isolados em nível de estirpes, uma vez que a aquisição e identificação das estirpes pelos perfis moleculares dos espectros foi expressiva (lembrando que foram considerados sucesso de aquisição em relação as estirpes parentais quando as mesmas, obtiveram um *score* de identificação maior que 2 e a segunda identificação menor que 1.8). Dentre esses espectros, a maior parte foi identificada como espectros de estirpes parentais (CPAC 7, CPAC 15, SEMIA 587 e 29W). Ao se observar a distribuição dos isolados entre os tratamentos, vemos uma coincidência com o observado em outros trabalhos semelhantes agressividade da CPAC 15 e

necessidade de reinoculação das estirpes em geral, utilizando outras técnicas (Mendes et al., 2004, Vargas et al., 2001).

No presente estudo a técnica de MALDI-TOF MS se comportou como o esperado e pode ser recomendada para essa finalidade, que consiste na observação da ocupação por gêneros/espécies/estirpes de bactérias em nódulos de soja.

## **5.2 Sucessão ecológica das estirpes parentais no arranjo de blocos do experimento**

Em primeira análise observamos que os tratamentos inoculados no primeiro ano e/ou reinoculado com a estirpe CPAC 15 apresentam taxas elevadas de ocupação por essa bactéria. Também fica evidente que a estirpe CPAC 7 persiste na ocupação nodular apenas nos tratamentos onde ela é reinoculada. Essas observações apontam para a agressividade de competição da estirpe CPAC 15 e a necessidade de reinoculação da estirpe CPAC 7.

Observa-se na tabela 1 que a distribuição dos isolados nos nódulos de soja foi semelhante à de outros estudos que utilizaram outras técnicas moleculares ou de imunoaglutinação (Mendes et al., 2004, Vargas et al., 2001, Siqueira 2012, Appunu 2008, Torres 2015).

A estirpe CPAC 15 possui alta competitividade quanto à ocupação nodular já observada em outros trabalhos (Mendes et al., 2004, Vargas et al., 2001, Torres 2015). Isso explica o porquê que todos os tratamentos onde essa estirpe foi inoculada desde o primeiro ano apresentam uma maior frequência (%) de ocupação nodular da mesma. Existe também uma teoria bastante aceita na comunidade técnico-científica de que as estirpes que são introduzidas pioneiramente em algum solo, obtêm preferência na ocupação nodular mesmo que, não seja reinoculada nos outros cultivos anuais (Mendes et al., 2004, Vargas et al., 2001, Torres 2015). Os resultados obtidos para o tratamento onde houve inoculação da estirpe CPAC 15 no primeiro ano e reinoculação da CPAC 7 nos outros anos, contradizem parcialmente essa teoria, pois a estirpe introduzida apesar de ser agressiva (CPAC 15) não obteve uma maior

ocupação nodular nesse tratamento, onde foi inoculada apenas no primeiro ano.

Houve também uma grande ocupação nodular pela estirpe CPAC 15 em tratamentos onde ela não foi inoculada. Outros trabalhos que também estudaram áreas recentemente abertas observaram contaminações dessa mesma estirpe, desenvolvendo a hipótese de que elas podem migrar no solo contaminando parcelas a parcelas (Chueire et al., 1998, Hungria et al., 1995, Mendes et al., 2004). Tratamentos onde houve apenas a inoculação da estirpe CPAC 15 no primeiro ano reduziram a ocupação em relação ao tratamento onde houve reinoculação da mesma. Esse comportamento de redução da ocupação quando não há reinoculação, também já foi observado em outros trabalhos (Mendes et al., 2004, Vargas et al., 2001).

A estirpe CPAC 7 possui uma competitividade e agressividade menor que a CPAC 15 (Mendes et al., 2004, Vargas et al., 2001; Mendes et al., 2004; Siqueira 2015). Também é importante observar que essa estirpe não está presente nos tratamentos onde não há reinoculação, com exceção do tratamento inoculado apenas no primeiro ano com a estirpe SEMIA 587, mas com uma ocupação bastante pequena 7%. Por isso, existe a necessidade de reinoculação para obter índices razoáveis de ocupação nodular. Alguns trabalhos também sugerem que essa estirpe que pertencente à espécie *Bradyrhizobium diazoefficiens* (Gomes 2014) possui uma capacidade maior de FBN. Por essa razão, há respostana produção de grãos em tratamentos reinoculados com essa estirpe (Hungria e Catalina 1996; Mendes et al., 2000).

Apenas dois tratamentos foram inoculados com a estirpe 587 e obtiveram índices de ocupação bastante parecidos, apesar de um desses tratamentos ter sido inoculado anualmente com essa bactéria. Um estudo sugere que essa estirpe possui uma competitividade expressiva bem como também uma alta capacidade de FBN (Souza 2006). Contraditoriamente estudos clássicos observaram que as estirpes CPAC 15 e CPAC 7 podem ser mais competitivas e eficientes (Mendes et al., 2004; Vargas et al., 2001). Esse fato da competitividade baixa pode explicar a sobreposição da estirpe CPAC 15 no tratamento apenas com a inoculação no primeiro ano da SEMIA 587. No

entanto, foi observado um comportamento oportunista dessa estirpe diante da ausência de reinoculação (tratamento em que houve apenas a inoculação no primeiro ano com a estirpe CPAC 7). Nesse caso, a ocupação pela SEMIA 587 foi bastante alta.

A estirpe 29W não foi inoculada em nenhum dos tratamentos, sendo detectada apenas aleatoriamente em alguns casos. Estudos sugerem que essa estirpe é menos competitiva que CPAC 15 e CPAC 7 (Vargas et al., 2001. Mendes et al., 2004). Essa competitividade baixa, associada à ausência de inoculação, refletiu no baixo índice de ocupação nodular observado. O maior índice encontrado foi encontrado no tratamento inoculado no primeiro ano com a estirpe CPAC 7 e nos anos subsequentes com a estirpe CPAC 15, apenas 3%.

### **5.3 Outras espécies de bactérias encontradas nos nódulos**

Números bem expressivos de outras espécies de bactérias foram detectados dentre os isolados do interior dos nódulos de soja. Dentre os mais frequentes estão: *Rhizobium radiobacter*, *Enterobacter sp.* e *Cupriavidus sp.*, todos com mais de 20% de ocupação nodular em alguns dos tratamentos. Outras bactérias que apresentaram uma ocupação nodular pouco expressiva (menos de 10%) foram: *Cryptococcus flavescens*, *Lysinibacillus fusiformis*, *Ralstonia sp.*, *Serratia marcescens*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Brevibacillus centrosporus*, *Bacillus weihenstephanensis*, *Pseudomonas sp.*, *Burkholderia sp.*, *Achromobacter ruhlandii*, *Achromobacter denitrificans*, *Paenibacillus sp.*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Microbacterium natoriense*, *Rhizobium tropici*, *Bacillus cereus* e *Micrococcus luteus*.

Alguns trabalhos já haviam descrito algumas dessas bactérias presentes em nódulos de soja como, *Rhizobium radiobacter*, *Paenibacillus sp.* e *Cupriavidus sp.* (Wang et al., 2009; Wu et al., 2011; Zhao et al., 2014). Contudo as outras espécies, ainda não tinham sido observadas.

A alfa-proteobacteria *Rhizobium radiobacter* foi originalmente caracterizada como uma bactéria endofungal com benefícios endofíticos para os fungos *Sebacinalean symbiosis* e *Piriformospora indica* (Qiang et al., 2012). É uma bactéria Gram-negativa, que pode ser facilmente cultivada em cultura pura. Alguns trabalhos também consideram que essa bactéria pode apresentar benefícios na promoção de crescimento de plantas (Gaeser et al., 2015). A *R. radiobacter* (anteriormente: *Agrobacterium tumefaciens*) também possui estirpes consideradas fitopatogênicas, como é o caso da estirpe C58 que causa tumores nas vesículas das plantas (Zuccaro et al., 2011). No trabalho de Zao et al., (2014) os genes *nod* e *nifH* foram identificados em *Rhizobium radiobacter*. Esse estudo, juntamente com outros, sugeriram que essa espécie pode ter ancestrais em comum com o gênero *Bradyrhizobium* e poderiam até pertencer ao mesmo gênero. Outros estudos que citam essa ancestralidade em comum foram publicados, reafirmando esta hipótese (Young 1996; Young 2001). Conforme demonstrado na tabela 1 *R. radiobacter* é uma espécie oportunista e sua ocorrência pode ser diminuída pela introdução de estirpes parentais, principalmente a CPAC 15, mais competitiva. Isso fica claro quando nos tratamentos nunca inoculados a incidência de *Rhizobium radiobacter* é bem alta.

As bactérias do gênero *Enterobacter* pertencem à família Enterobacteriaceae, e são bactérias Gram-negativas, anaeróbias facultativas, geralmente encontradas na pele humana e em plantas, bem como no solo, água, esgoto, trato intestinal, urinário e respiratório de humanos e animais e alguns produtos lácteos (Paterson e David, 2006). Bactérias do gênero *Enterobacter* já foram descritas como promotoras do crescimento de plantas e associadas à soja (endofíticas e epifíticas) (Kuklinsky-Sobral et al., 2004). Estes autores relataram que o tamanho da população de bactérias endofíticas cultiváveis, dependia da fase de crescimento de soja, na ordem: senescência > floração > vegetativa; e também que o tamanho da população e a diversidade taxonômica de bactérias cultiváveis, epifíticas e endofíticas, diminuiu de acordo com tecidos de soja, na ordem: raízes > caules > folhas. De qualquer forma o gênero *Enterobacter* está presente em abundância em raízes de soja e isso pode demonstrar que elas podem habitar os nódulos das mesmas. Apesar de

não ter sido um estudo voltado para soja, recentemente, Leite (2015) recuperou bactérias desse gênero de nódulos de feijão caupi, o que de certa forma demonstra que esse gênero pode coabitar nódulos.

O gênero *Cupriavidus* estava incluído no ex gênero *Wautersia* (Euzéby, 1997). São beta-proteobactérias móveis, Gram-negativas, com metabolismo oxidativo. Também são organismos aeróbicos obrigatórios e alguns espécimes possuem uma notável resistência a metais pesados (incluindo cobre). Foram encontrados inicialmente em isolados clínicos e em amostras de solo (Vandamme e Coenye, 2004). Alguns artigos classificaram espécies de *Cupriavidus* como fixadoras biológicas de nitrogênio associadas a nódulos, sendo parte dos chamados  $\beta$ -rizóbios, encontrados em nódulos de *Mimosa* sp (Chen et al., 2001, Amadou et al., 2008). Existe um registro bastante recente sugerindo a ocorrência desse gênero em nódulos de soja detectados pela mesma técnica utilizada no presente trabalho, porém, os resultados foram incipientes e demandam um maior detalhamento desses isolados para uma caracterização mais conclusiva (Ziegler et al., 2015).

Alguns dos outros gêneros ou espécies identificados são encontrados em nódulos de outras espécies de fabáceas como: *Burkholderia* sp. (Barret 2005), *Rhizobium tropici* (Marinez-Romero 1991), *Pseudomonas* sp. (Pandey et al., 2005), *Paenibacillus* sp. (Lai et al., 2015) e *Ralstonia* sp. (Chen et al., 2001). Ademais se tratam de espécies relatadas como fitopatogênicas e endofíticas que comumente são estudadas com esse viés, sendo que não possuem registros de ocorrência em nódulos de soja e precisam ser estudados de maneira mais detalhada, para se confirmar ou refutar sua presença nessas estruturas de leguminosas. Além disso, como a incidência desses outros gêneros/espécies foi bastante pequena, não é tão relevante sua presença nas análises, podendo ser tratada como uma casualidade. Em um estudo dessa magnitude (1056 isolamentos) é comum e até esperado haver um pequeno índice de contaminação.

A ocorrência de espécies não esperadas nos nódulos de soja abre um repertório de possibilidades para quebra de paradigmas. Como descrito e discutido por Leite (2015), os nódulos podem ser estruturas de coabitação de

várias espécies de bactérias, portanto, comportam-se mais como biofilmes sob a forma de comunidades do que estruturas simplificadas com apenas uma espécie de bactéria. As técnicas com o princípio de imunoaglutinação, não levam em consideração essas outras espécies (por limitações metodológicas) e podem por muitas vezes, não elucidar toda a dinâmica populacional existente na estrutura do nódulo a qual é acessível por meio de MALDI-TOF MS.

## 6. CONCLUSÕES

- A técnica de MALDI-TOF MS foi bem sucedida na identificação de isolados de campo em nível de estirpes.
- A reinoculação garante a persistência na ocupação nodular das estirpes CPAC 7 e CPAC 15.
- A estirpe CPAC 15 é mais competitiva que as demais.
- A ausência de reinoculação abre espaço para a infecção de bactérias oportunistas que não são provenientes dos inoculantes.

## 7. REFERÊNCIAS

AMADOU, C.; PASCAL, G.; MANGENOT, S. Genome sequence of the  $\beta$ -rhizobium *Cupriavidus taiwanensis* and comparative genomics of Rhizobia. v. 18, n.9, p. 1472-1483. 2008.

ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, R.S.; Animais de Laboratório: criação e experimentação [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002.

BARRETT, C.F.; PARKER, M.A.; Prevalence of *Burkholderia* sp. nodule symbionts on four mimosoid legumes from Barro Colorado Island, Panama. Syst Appl Microbiol. v. 28, n.1, p. 57-65. 2005.

CHUEIRE, L.M.; O.NISHI, C.Y.M.; HUNGRIA, M.; Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e nutrição de plantas, 23. Caxambu. FertBio 98: interrelacao fertilidade, biologia do solo. p. 395. 1998.

FERREIRA L, SAÑCHEZ-JUANES F, GARCÍA-FRAILE P, RIVAS R, MATEOS PF. MALDI-TOF Mass Spectrometry Is a Fast and Reliable Platform for Identification and Ecological Studies of Species from Family Rhizobiaceae. PLoS ONE 6(5): e20223. doi:10.1371/journal.pone.0020223.2011.

GEVERS, D.; COHAN, F.M.; LAWRENCE, J.G.; SPRATT, B.G.; COENYE, T.; FEIL, E.J.; STACKEBRANDT, E.; VAN DE PEER, Y.; VANDAMME, P.; THOMPSON, F.L.; SWINGS, J. Opinion. re-evaluating prokaryotic species. Nat Rev Microbiol. v. 3, p. 733–739. 2005.

HANAGE, W.P.; FRASER, C.; SPRATT, B.G. Sequences, sequence clusters and bacterial species. Philos Trans R Soc Lond Ser B Biol Sci. v. 361, p. 1917–1927. 2006.

HERRIDGE, D.F.; PEOPLES, M.B.; BODDEY, R.M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. Plant Soil. v. 311, p. 1–18. 2008.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T. Exploring the microbial diversity and soil management practices to optimize the contribution of soil microorganisms to plant nutrition. In: Biology of Plant-Microbe Interactions (Eds. Stacey, G., Mullin, B. and Gresshoff, P.M.). International Society of Molecular Plant-Microbe Interactions, St. Paul. P. 493-496. 1996.

KOCH, R. "Untersuchungen über Bakterien: V. Die Ätiologie der Milzbrand-Krankheit, begründet auf die Entwicklungsgeschichte des *Bacillus anthracis*" [Investigations into bacteria: V. The etiology of anthrax, based on the ontogenesis of *Bacillus anthracis*] (PDF). *Cohns Beitrage zur Biologie der Pflanzen* (em alemão). [S.l.: s.n.] v. 2, n.2, p.277–310. 1876.

LEITE, J. Simbiose feijão-caupi e rizóbio: desempenho simbiótico do hospedeiro e diversidade de bactérias associadas aos nódulos. Tese (Doutorado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

MARTENS, M.; DAWYNDT, P.; COOPMAN, R.; GILLIS, M.; DE VOS, P.; WILLEMS, A.; Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic

studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). *Int J Syst Evol Microbiol.* v. 58, p.200–214. 2008.

MENDES, I.C.; HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T.; Soybean response to starter nitrogen and *Bradyrhizobium* inoculation on a cerrado oxisol under no-tillage and conventional tillage systems. *Rev. Bras. Ci. Solo.* v. 27, p. 81-87. 2004.

PATERSON, L. Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *The American journal of medicine.* v. 119, n.6, p. S20-S28. 2006.

QIANG, X.; WEISS, M.; KOEGEL, K.H.; SCHAFFER P.; *Piriformospora indica* - a mutualistic basidiomycete with an exceptionally large plant host range. *Mol Plant Pathol.* v. 13, p. 508–518. 2012.

RIVAS, R.; MARTENS, M.; DE LAJUDIE, P.; WILLEMS, A. Multilocus sequence analysis of the genus *Bradyrhizobium*. *Syst Appl Microbiol.* v. 32, p. 101–110. 2009.

SÁNCHEZ-JUANES, F., FERREIRA, L.; ALONSO DE LA VEGA, P.; VALVERDE, A.; BARRIOS, M.L.; RIVAS, R.; MATEOS, P.F.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; GONZÁLEZ-BUITRAGO, J.M.; TRUJILLO, M.E.; VELÁZQUEZ, E. MALDI-TOF mass spectrometry as a tool for differentiation of *Bradyrhizobium* species: application to the identification of *Lupinus* nodulating strains. *Syst Appl Microbiol.* v. 36, p. 565–571. 2013.

SENG, P.; DRANCOURT; GOURIET, F.; LA SCOLA, B.; FOURNIER, P.E.; Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis.* v. 15, n.49, p. 543-51 .2009.

SOUZA, J.; MARCONDES, A. Perfil transcricional de *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587 “in vitro” e em simbiose com soja (*Glycine max* L. Merrill) através de microarranjo de DNA / Jackson Antônio Marcondes de Souza. Jaboticabal. 2006.

SOMASEGARAN, P.; HOBEN, J.H. Handbook for rhizobia: methods in legume *Rhizobium* technology. New York: Springer-Verlag. p. 450. 1994.

TIAN, C.F.; ZHOU, Y.J.; ZHANG, Y.M.; LI, Q.Q.; ZHANG, Y.Z.; LI D.F.; WANG, S.; WANG, J.; GILBERT, L.B.; LI, Y.R.; CHEN, W.X. Comparative genomics of Rhizobia nodulating soybean suggests extensive recruitment of lineage-specific genes in adaptations. Proc Natl Acad Sci U S A. v. 109, p. 8629–8634. 2012.

TORRES, D.; REVALE, S.; OBANDO, M.; MARONICHE, G.; PARIS, G.; PERTICARI, A.; VAZQUEZ, M.; WISNIEWSKI-DYÉ, F.; MARTÍNEZ-ABARCA F.; CASSÁN, F. Genome sequence of *Bradyrhizobium japonicum* E109, one of the most agronomically used nitrogen-fixing rhizobacteria in Argentina. Genome Announc. v. 3, n. 1, p. 1566-1614. 2015.

VANDAMME, P.; COENYE T. "Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found". Int J Syst Evol Microbiol. v. 54, p 2285–2289. 2004.

VARGAS, M. A. T.; MENDES, I. C.; HUNGRIA, M. Response of field grown bean [*Phaseolus vulgaris* (L)] to *Rhizobium* inoculation and N fertilization in two Cerrados soils. Biology and Fertility of Soils, Berlin. v. 32, p. 228-233. 2001.

WILLEMS, A. The taxonomy of Rhizobia: an overview. Plant Soil. v. 287, p. 3–14. 2006.

YOUNG, J.M.; KUYKENDALL, L.D.; MARTINEZ-ROMERO, E.; KERR, A.; SAWADA, H. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. v. 51, p. 89–103. 2001.

YOUNG, J.P.W.; HAUKKA, K.E. Diversity and phylogeny of rhizobia. New Phytol. v. 133, p. 87–94. 1996.

ZHANG Y.M.; TIAN, C.F.; SUI, X.H; CHEN, W.F.; CHEN, W.X. Robust markers reflecting phylogeny and taxonomy of Rhizobia. PLoS ONE. 2012.

ZIEGLER, D.; POTHIER, P.; ARDLEY, J.; KOUAKOU, J.; PFLÜGER, S.; Ribosomal protein biomarkers provide root nodule bacterial identification

by MALDI-TOF MS. Applied Microbiology and Biotechnology. v. 99, p. 5547-5562. 2005.

ZUCCARO, A.; LAHRMANN, U.; GULDENER, U.; LANGEN, G.; PFIFFI, S.; BIEDENKOPFB, D.; Endophytic life strategies decoded by genome and transcriptome analyses of the mutualistic root symbiont *Piriformospora indica*. PLoS Pathogens 7. 2011.