

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Avaliação dos efeitos de nanotubos de carbono de múltiplas paredes funcionalizados e não funcionalizados na viabilidade e motilidade de *Rhizobium tropici*

MIRIÃ DAYANE DE SOUZA ALMEIDA

Orientador: Profa. Dra. Maria Aparecida de Rezende Stoianoff

Co-orientador: Prof. Dr. Ary Correa Júnior

Belo Horizonte,
Abril de 2019

MIRIÃ DAYANE DE SOUZA ALMEIDA

Avaliação dos efeitos de nanotubos de carbono de múltiplas paredes funcionalizados e não funcionalizados na viabilidade e motilidade de *Rhizobium tropici*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador (a): Profa. Dra. Maria Aparecida de Resende Stoianoff

Co-orientador: Prof. Dr. Ary Correa Júnior

Belo Horizonte,
Abril de 2019

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, ao meu esposo Bruno, à minha querida mãe, Maria Aparecida, às minhas irmãs Laurieth e Aline, ao meu sobrinho Bernardo e a toda minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo. Sou grata à minha família pelo apoio incondicional. Ao meu esposo, pelo incentivo, à minha mãe pelo carinho, às minhas irmãs pelos momentos de descontração e apoio.

Aos meus orientadores: Dra. Maria Aparecida de Resende Stoianoff e ao Dr. Ary Correa Junior pela oportunidade e orientação na condução do trabalho.

À Dra. Renata pelo tempo e ajuda no trabalho.

À amiga Tatiane, pela ajuda nos experimentos.

À Dra. Carla, pelos conselhos.

Aos meus colegas do laboratório de Micologia pelas risadas e apoio.

Aos colegas do Centro de Tecnologia em Nanomateriais - CT nanotubos.

À Nitro 1000 inoculantes, pela doação da amostra de inoculante e à EPAMIG pelas sementes do feijão BRS madreperola.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da UFMG e à CAPES pelo apoio financeiro.

Enfim, agradeço a todos aqueles que contribuíram para que este trabalho acontecesse.

***(...)O homem não pode receber coisa alguma, se não lhe for dada do céu.
(Bíblia Sagrada Jo.3: 27)***

RESUMO

Dentre os muitos desafios enfrentados pela nanotecnologia destaca-se a compreensão de como os nanomateriais interferem nas questões de saúde humana e segurança ambiental. A nanoecotoxicologia é o ramo da toxicologia que se dispõe a avaliar e discutir estas questões. Atualmente, os estudos se concentram principalmente na determinação da taxa de sobrevivência dos organismos - teste na presença dos nanomateriais, bem como em análises dos possíveis efeitos tóxicos em modelos laboratoriais, como células em cultura. Dentre os diversos ambientes de interesse, o meio aquático é o mais estudado, sendo a microbiota do solo um dos menos abordados. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos dos nanotubos de carbono de múltiplas paredes (MWCNT- COOH e MWCNT-NF) na sobrevivência e motilidade de *Rhizobium tropici*, na busca de um modelo alternativo para o estudo dos efeitos dos nanomateriais no solo, tendo em vista a possibilidade de utilização destes materiais em aplicações agrícolas. Para isto, foram realizadas a análise da quantidade total de células após a exposição aos nanotubos de carbono por medição da densidade óptica e a avaliação da viabilidade celular por meio da contagem de unidades formadoras de colônia em placas. Desta forma, foram determinadas curvas de crescimento em diferentes concentrações dos nanomateriais. Os resultados demonstraram que a presença dos MWCNT-NF e MWCNT-COOH nas concentrações de 20mg/L; 15mg/L; 12,5mg/L; 7,5mg/L e 5mg/L, não afetou significativamente o crescimento de *R. tropici in vitro*. Os ensaios de motilidade, entretanto, apresentaram resultados interessantes, demonstrando que estes materiais interferem na motilidade destas bactérias, uma vez que, foi recuperada maior contagem de UFC/mL nas áreas com ausência de nanotubos de carbono.

Palavras-chave: Nanotubos de carbono, nanoecotoxicologia, *Rhizobium tropici*, curva de crescimento, motilidade

ABSTRACT

Among the many challenges facing nanotechnology is the understanding of how nanomaterials interfere with human health and environmental safety issues. Nanoecotoxicology is the branch of toxicology that is willing to evaluate and discuss these issues. At present, the studies focus mainly on the determination of the survival rate of test organisms in the presence of nanomaterials, as well as on analyzes of possible toxic effects in laboratory models, such as cells in culture. Among the different environments of interest, the aquatic environment is the most studied, being the microbiota of the soil one of the least approached. The objective of this work was to evaluate the effects of carbon nanotubes of multiple walls (MWCNT-COOH and MWCNT-NF) on the survival and motility of *Rhizobium tropici* in the search for an alternative model for the study of the effects of nanomaterials in the soil and the use of these materials in agricultural applications. For this, the analysis of the total number of cells after the exposure to the carbon nanotubes by measuring the optical density, and the evaluation of the cellular viability by means of counting of colony forming units in plates were carried out. In this way, growth curves were determined at different concentrations of nanomaterials. The results showed that the presence of MWCNT-NF and MWCNT-COOH at concentrations of 20mg/L; 15mg/L; 12.5mg/L; 7.5mg/L and 5mg/L, did not significantly affect the growth of *R. tropici* *in vitro*. Motility tests, however, showed interesting results, demonstrating that these materials interfere in the bacteria motility, since a higher CFU / mL count was recovered in areas with absence of carbon nanotubes.

Key words: Carbon nanotubes, nanoecotoxicology, *Rhizobium tropici*, growth curve, motility

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	14
2.1. Objetivo Geral	14
2.2 Objetivos específicos	14
3. Revisão Bibliográfica	14
3.1 A Nanotecnologia	14
3.1.1 Nanomateriais.....	15
3.1.2 Ecotoxicologia e a Nanoecotoxicologia.....	17
3.2 Microbiota do solo	18
3.6 Motilidade bacteriana e quimiotaxia	19
3.3.4 Fixação biológica de Nitrogênio.....	21
3.4 Mutualismo: rizóbio- leguminosa	21
3.5 Leguminosa: Feijão comum (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 Verificação da infectividade bacteriana no inoculante	24
4.1.1 Preparo e desinfestação das sementes do feijão.....	24
4.1.2 Plantio e observação dos nódulos.....	24
4.1.3 Isolamento das bactérias nodulíferas.....	24
4.2 Dispersão aquosa dos nanomateriais	25
4.3 Caracterização dos nanomateriais	27
4.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	27
4.3.2 Análise Termogravimétrica (TG).....	28
4.3.3 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS).....	28
4.4 Avaliação da viabilidade bacteriana após a exposição aos MWCNT- COOH e MWCNT- NF	29
4.4.1 Preparo do inóculo inicial.....	29
4.4.2 Avaliação do crescimento de <i>R. tropici</i> por medida da densidade óptica (DO).....	29

4.4.2 Avaliação da viabilidade de <i>R. tropici</i> por contagem padrão em placas.....	30
4.4.3 Cálculo dos parâmetros de crescimento.....	31
4.5 Avaliação da motilidade bacteriana em exposição aos MWCNT-COOH.....	32
4.6 Tratamento Estatístico.....	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
5.1 Caracterização dos MWCNT's por Microscopia Eletrônica de Varredura.....	35
5.2 Caracterização por análise termogravimétrica.....	38
5.3 Caracterização das soluções estoque de MWCNT's por (DLS).....	41
5.4 Avaliação da infectividade do inoculante.....	42
5.5 Análises de viabilidade de <i>R. tropici</i> em exposição aos MWCNT's.....	42
5.5.1 Determinação das curvas de crescimento para <i>R. tropici</i> em presença de MWCNT-COOH.....	42
5.5.2 Determinação das curvas de crescimento para <i>Rhizobium tropici</i> em presença de MWCNT não funcionalizados.....	44
5.5.3 Comparação entre os resultados da exposição aos MWCNT-COOH e MWCNT-NF.....	47
5.7 Análise de motilidade bacteriana após exposição aos MWCNT-COOH.....	48
6. CONCLUSÕES.....	51
PERSPECTIVAS.....	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
APÊNDICE.....	63
ANEXO.....	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Processo de avaliação da infectividade do inoculante.....	25
Figura 2 Ultrassom de ponta	26
Figura 3 Soluções estoque de MWCNTs após dispersão por Ultrassom de ponta	26
Figura 4 Desenho Experimental Análise do crescimento por Densidade óptica	30
Figura 5 Desenho experimental contagem de UFC/mL	30
Figura 6 Desenho experimental da avaliação do crescimento por contagem de UFC/mL.....	31
Figura 7 Desenho experimental da avaliação da motilidade bacteriana em exposição aos MWCNT-COOH.....	33
Figura 8 Fotomicrografias por MEV evidenciando a morfologia dos MWCNT. 36	
Figura 9 Análise termogravimétrica dos MWCNT-Não Funcionalizados.....	39
Figura 10 Análise Termogravimétrica dos MWCNT-COOH	40
Figura 11 Distribuição de tamanho aparente por Intensidade da dispersão de MWCNT-COOH.....	41
Figura 12 Crescimento de <i>Rhizobium tropici</i> em meio YM em diferentes concentrações de MWCNT-COOH medido por DO _{625 nm}	43
Figura 13 Unidades Formadoras de Colônia (UFC/mL) de <i>Rhizobium tropici</i> em meio YM em diferentes concentrações de MWCNT- COOH.....	43
Figura 14 Taxa de crescimento de <i>R. tropici</i> em diferentes concentrações de MWCNT-COOH.....	44
Figura 15 Crescimento de <i>Rhizobium tropici</i> em meio YM, em diferentes concentrações de MWCNT-NF medido por DO _{625 nm}	45
Figura 16 Unidades formadoras de colônia (UFC/mL) de <i>Rhizobium tropici</i> em meio YM, em diferentes concentrações de MWCNT-NF.....	46
Figura 17 Taxa de crescimento de <i>R. tropici</i> em presença de MWCNT-NF.....	46
Figura 18 Controle: Média de UFC/mL recuperados dos poços central e adjacente.....	48
Figura 19 Tratamento 1: Média de UFC/mL recuperados dos poços central e adjacente após 24h	49
Figura 20 Tratamento 2: Média de UFC/mL recuperados dos poços central e adjacente após 24h	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CNT: Nanotubos de carbono, do inglês *Carbon Nanotubes*

DLS: Espalhamento Dinâmico de Luz, do inglês *Dynamic Light Scattering*

MWCNT -COOH: Nanotubos de Carbono de Parede Múltiplas funcionalizados ou carboxilados do inglês *Functionalized Multi-Walled Carbon Nanotubes*

MWCNT NF: Nanotubos de Carbono de Parede Múltiplas não funcionalizados

MEV: Microscópio Eletrônico de Varredura

TG: Termogravimetria

UFC: Unidades formadoras de colônias

YMA: Ágar Extrato de Levedura e Manitol, do inglês *Yeast Manitol Agar*

YM: *Yeast Manitol*

1.INTRODUÇÃO

A nanotecnologia é o ramo da ciência que estuda materiais em escala nanométrica com o objetivo de produzir, caracterizar e possibilitar aplicações tecnológicas de acordo com o *Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks* – SCENIHR da União Européia (2006). Atualmente, a demanda por nanomateriais tem aumentado de forma significativa dada as várias possibilidades de utilização na indústria, na biomedicina e na agricultura. Por outro lado, até o momento, não existe uma regulamentação robusta que facilite a produção destes materiais em larga escala de forma sustentável, como apontam Teunenbroek, Baker e Dijkzeul (2017).

Desta forma, estudos que abordem processos de utilização e descarte dos nanomateriais, tendo em vista a saúde humana e a proteção ambiental são especialmente relevantes. Para isto, têm sido criados vários projetos internacionais com o objetivo de regulamentar o uso seguro destes materiais. Um importante projeto a ser destacado é o NANoReg, em que houve colaboração entre Brasil, União Européia, Noruega, Suíça e Coréia do Sul para a criação de um banco de dados com informações sobre os efeitos dos nanomateriais no meio ambiente e na saúde, para utilização no contexto regulatório (*National Institute for Public Health and Environmental in the Netherlands*, 2017).

Atualmente, alguns dos nanomateriais mais utilizados em produtos são os nanotubos de carbono (NTC) e fulerenos, como apontam Kahru e Dubourguier (2010), os quais despertam grande interesse comercial devido às suas propriedades únicas. A UFMG é a sede de diversos projetos que lidam com NTCs e nanomateriais como o INCT de Nanocarbono, o CTNano e o Mgrafeno e conta com uma vasta equipe de pesquisadores na área. Vários projetos pioneiros resultaram em patentes e protótipos de interesse comercial, sendo alguns de uso agrícola. Já existe uma patente de fungicida composto por nanotubos de carbono associados a uma sequência antissenso de RNA, o qual é capaz de controlar a invasão de fungos do gênero *Uromyces*, causador da ferrugem no feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*). Este foi desenvolvido pelo

Laboratório de Mecanismos de Infecções Fúngicas chefiado pelo Professor Dr. Ary Correa Jr.

Dada a possibilidade de contato dos nanotubos de carbono com o solo, o presente trabalho, propôs avaliar os efeitos da presença destes materiais sobre as bactérias nodulíferas fixadoras de nitrogênio. Bactérias do gênero *Rhizobium* foram testadas como um bioindicador de sanidade ambiental, uma vez que apresentam tanto relevância ecológica como agrícola. Além disso, é um gênero bem descrito, de manipulação simples em laboratório e possui características biológicas facilmente monitoráveis como motilidade, quimiotaxia e a capacidade de gerar alterações fenotípicas em plantas superiores, o que permitiria a obtenção de resultados rápidos e satisfatórios do ponto de vista ecotoxicológico. Vale ressaltar, que até o momento, poucos são os estudos ecotoxicológicos que destacam a exposição dos nanomateriais no solo como apontam Kerfahi e colaboradores (2015).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Aferir o efeito da exposição de *Rhizobium tropici* aos nanotubos de carbono de múltiplas paredes funcionalizados e não funcionalizados, a fim de propor um modelo de estudos para os nanomateriais no solo.

2.2 Objetivos Específicos

Observar a cinética de crescimento de *Rhizobium tropici* em meio de cultura acrescido de MWCNT funcionalizados e não funcionalizados em diferentes concentrações.

Analisar a motilidade de *Rhizobium tropici* em exposição aos MWCNT funcionalizados.

3. Revisão Bibliográfica

3.1 A Nanotecnologia

A possibilidade de manipulação de átomos e moléculas para a obtenção de materiais em escala nanométrica desencadeou o surgimento da nanotecnologia como apontam Wiley & Sons (2006). Materiais em escala nanométrica apresentam propriedades inovadoras assim como alto grau de desempenho, com possibilidade de aplicações em áreas como, cosméticos, vestuário, eletrônicos, materiais agrícolas, alimentos, engenharia ambiental, energética, além da biomedicina (BISWAS & WU, 2005).

O uso da nanotecnologia na agricultura já avista vários processos como abordam Ghormade e colaboradores (2011) como, *delivery* de nano-pesticidas encapsulados em nanomateriais, estabilização de biopesticidas, entrega controlada de fertilizantes, micronutrientes ou de material genético para a melhoria de cultivares. Nanomateriais também podem ser usados na confecção de nanossensores utilizáveis para rastrear poluentes e patógenos, além de técnicas para avaliar parâmetros físico-químicos de interesse no solo. Dessa maneira, segundo Baruah & Dutta (2009) a nanotecnologia poderia permitir a prevenção ou tratamento de doenças em plantas, bem como reduzir o uso de pesticidas e fertilizantes nas lavouras.

3.1.1 Nanomateriais

Nanomateriais podem ser de origem natural ou manufaturada, apresentando partículas agregadas ou não, ligadas entre si e que tenham pelo menos uma ou mais dimensões externas entre 1nm e 100nm (EUROPEAN COMMITION, 2011).

Dentre os principais tipos de nanomateriais podem ser destacados: nanomateriais baseados em carbono (nanotubos de carbono, fulerenos, grafenos), os metálicos (óxidos de metais ou nanopartículas de metais como nanopartículas de prata e ouro) e os pontos quânticos (nanomarcadores biológicos) (PASCHOALINO et al., 2010).

Os nanotubos de carbono (NTC) são estruturas de carbono formando tubos coaxiais de folhas de grafite descritos por Iijima (1991). Eles apresentam diâmetros variando entre um até dezenas de nanômetros e o comprimento entre micrômetros e frações de milímetros, em que os átomos de carbono formam ligações covalentes entre si (FERNANDES, 2008). Além disso,

despertam interesse devido às suas peculiares propriedades mecânicas, elétricas, térmicas e químicas. Tendo em vista sua arquitetura, podem ser formados por uma única parede, *Single-Walled Carbon Nanotubes* (SWNT), apresentarem paredes duplas, conhecidos como *Double-walled carbon nanotubes* (DWCNT), ou mesmo múltiplas paredes, sendo denominados *Multi-Walled Carbon Nanotubes* (MWCNT).

Nanotubos de carbono podem ser sintetizados por meio de diferentes técnicas: descarga por arco elétrico, ablação a laser e deposição química de vapor. No entanto, a técnica mais viável para a produção de NTCs em larga escala é a deposição química de vapor devido a facilidade de obtenção de nanomateriais com maior pureza a um menor custo, como apontam Prasek e colaboradores (2011). A deposição química de vapor consiste em um processo no qual há utilização de hidrocarbonetos como metano, etano, etileno, acetileno e xileno como fonte de carbono para a síntese dos nanotubos de carbono. Adicionalmente, metais de transição como Fe, Co e Ni funcionam como catalizadores da reação para a decomposição da fonte de carbono, por meio de irradiação de plasma ou calor, permitindo o crescimento dos nanotubos de carbono, de acordo com Prasek e colaboradores (2013).

Após a síntese, os NTC podem ainda ser submetidos à funcionalização, no qual há adição de grupos químicos funcionais como, a carboxila, amidas, e hidroxila, entre outros. Um destes processos é a carboxilação, que confere aos NTCs, antes hidrofóbicos, adquirirem propriedades hidrofílicas após adição do grupamento -COOH (SILVA, 2007).

Vale ressaltar que NTCs e fulerenos destacam-se como alguns dos principais nanomateriais produzidos e utilizados mundialmente, como afirmam Kahru & Dubourguier (2010). Isto ocorre devido a diversas possibilidades de aplicações: compósitos de materiais, precursores de resinas mais resistentes, tintas com propriedades eletrostáticas para automóveis, fios supercondutores, eletrodos de células de combustíveis, substituição de cobre em artefatos microeletrônicos, tecidos auto-limpantes, melhoramento de artigos esportivos, plásticos com aditivos para retardantes de chama, substituição de membranas

filtrantes, armazenamento de energia no uso em baterias para notebooks e aparelhos celulares, entre outros (De Volder et al., 2013).

Há ainda um crescente interesse para que NTCs sejam utilizados em aplicações biotecnológicas e biomédicas, devido à relação entre largura e comprimento, que resulta em grande área superficial (Singh et al., 2005). Esta propriedade pode ser explorada em processos de entrega controlada de fármacos carregadas por NTC para o interior da célula, como alternativa para tratamento de doenças neurodegenerativas (Oliveira et al., 2011). Por outro lado, materiais em escala nanométrica apresentam propriedades distintas daqueles em escala macro, e por isso devem ser cuidadosamente avaliados sobre seu potencial tóxico para células humanas e o próprio meio ambiente (Pulskamp et al., 2007). Outras aplicações a serem mencionadas é a utilização dos NTCs como ferramentas de diagnóstico por meio de nanobiossensores (Caires et al., 2015); ou como suporte para a imobilização enzimática para aplicações em processos de remediação de efluentes da indústria têxtil (OLIVEIRA et al., 2016).

Com relação a aplicações agrícolas, nanotubos de carbono podem penetrar sementes de tomate e estimular o desenvolvimento da plântula (Khodakovskaya et al., 2012, Ratnikova et al. 2015). MWCNT podem favorecer a germinação de sementes de soja, cevada e milho (Lahiani et al., 2013). Desta maneira, há possibilidade de utilização destes materiais em processos de entrega controlada de nutrientes para plantas na forma de nanofertilizantes. Isto poderia permitir o uso eficiente de fertilizantes nitrogenados, por exemplo, com redução de perdas e diminuição de impactos ambientais como propõem De Rosa e colaboradores (2010). No entanto, Thul e colaboradores (2013), destacam a importância da avaliação dos efeitos positivos e negativos da introdução dos nanomateriais nos ambientes, tendo em vista, a bioquímica e fisiologia de plantas e micro-organismos, de importância ecológica como fixadores de nitrogênio, solubilizadores de fosfato e microrrizas.

3.1.2 Ecotoxicologia e a Nanoecotoxicologia

A ecotoxicologia foi definida por René Truhaut em 1977, como a ciência que estuda os efeitos tóxicos de agentes químicos ou físicos nos organismos, especialmente em populações e comunidades contidas em um ecossistema, incluindo as vias de transferências destes agentes e sua integração com o meio ambiente. Os principais *endpoints* ou parâmetros avaliados na ecotoxicologia para definir toxicidade de um agente químico, segundo Clément e colaboradores (2004) incluem, sobrevivência, crescimento e reprodução dos organismos expostos. Desta forma, com a crescente demanda por nanomateriais ocorrerá um aumento da exposição destes materiais, tanto para o homem como para o ambiente. Estima-se que desde 2006 houve um aumento de dez vezes na capacidade de produção de nanotubos de carbono com tendência a um aumento progressivo (DE VOLDER et al., 2013).

Em meio ao surgimento e utilização destes novos materiais surge a nanoecotoxicologia que, de acordo com Schirmer & Auffan (2015) objetiva identificar e, ao mesmo tempo, prever os efeitos da introdução dos nanomateriais nos ecossistemas por meio da análise de alterações no funcionamento dos organismos, seja para uma única célula ou para uma comunidade complexa.

Atualmente, os estudos voltados para interação de micro-organismos e nanomateriais são principalmente focados na utilização de modelos patogênicos. Dong, Henderson e Field (2012), investigaram os efeitos dos nanotubos de carbono de única parede (SWCNT), quando associados a diferentes surfactantes para a promoção da dispersão do nanomaterial tendo constatado efeito antimicrobiano destes compostos contra *E. coli* e *Salmonella enterica*.

Chen e colaboradores (2013), avaliaram o efeito de diferentes configurações de MWCNT de diferentes tamanhos, puros ou com adição de grupos funcionais como COOH e sua atividade antimicrobiana nas bactérias entéricas: *Lactobacillus* spp., *Bifdobacterium adolescentis*, *Enterococcus faecalis*, e *E. coli* além de *Staphylococcus* spp. O efeito antimicrobiano foi constatado para todas as configurações de MWCNT e SWCNT.

Ruiz e colaboradores (2011), avaliaram o efeito antimicrobiano do grafeno, outro tipo de nanomaterial derivado de carbono, utilizando *E. coli* como modelo. No estudo, observaram a ocorrência de decantação do nanomaterial no meio de cultura e a formação de um biofilme bacteriano associado com produção de polissacarídeos extracelulares. Os autores descreveram um efeito de promoção de crescimento em relação ao controle.

Com relação aos estudos envolvendo a microbiota do solo, podem ser mencionados Kerfahi e colaboradores (2015), os quais avaliaram os efeitos da exposição da comunidade bacteriana do solo aos MWCNT, puros e funcionalizados. Foram observadas alterações na composição da comunidade bacteriana do solo, quando expostos aos MWCNT funcionalizados, porém, em relação aos compostos puros, este resultado não repetiu. Por fim, Yuan e colaboradores (2017), descreveram os efeitos dos SWCNT, óxido de grafeno, MWCNT e carvão ativado no crescimento de *Mesorhizobium loti* associado à leguminosa *Lotus japonicum* e seus efeitos na nodulação e atividade da nitrogenase.

3.2 Microbiota do Solo

São vários os papéis desempenhados pelos micro-organismos no solo, entre os quais, participação em ciclos biogeoquímicos, síntese de substâncias para a manutenção estrutural do solo e atividade desintoxicante. É conhecido que micélios fúngicos e várias bactérias são capazes de secretarem polissacarídeos e outros compostos orgânicos, que promovem a formação de micro-agregados e macro-agregados, contribuindo para a estruturação do solo (DUARTE, 2011; BRADY & WEIL, 2013).

Os rizóbios são um dos grupos mais importantes que compõem a microbiota do solo e estão envolvidos na fixação biológica de nitrogênio. Bactérias do gênero *Rhizobium* são classificadas como bastonetes de 0,5 µm a 0,9 µm de diâmetro por 1,2 µm a 3,0 µm de comprimento, Gram negativos, flagelados (móveis), aeróbios e não esporulantes. Estes micro-organismos geralmente, fazem associação mutualística com plantas da família das leguminosas, com exceção da *Parasponia* da família Ulmanaceae, conforme afirma Cordeiro (2008). Rizóbio é uma forma coletiva para designar tais bactérias do qual podem ser

citados os seguintes gêneros: *Rhizobium*, *Bradirhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azorhizobium* e *Protorhizobium*. (SANTOS & REIS; 2008).

3.3 Motilidade bacteriana e quimiotaxia

Uma característica fisiológica importante para os rizóbios é a motilidade, e refere-se a um rápido e coordenado movimento de migração de uma população bacteriana em uma superfície semi-sólida. Tem sido sugerido que a motilidade seja uma característica relevante em muitos grupos bacterianos, o que facilitaria a colonização de diversos ambientes naturais e aceleraria a produção de biomassa (FRASER & HUGHES, 1999).

O movimento bacteriano ativo ocorre quando há uma fonte atraente para o micro-organismo ou apresenta uma resposta de fuga a uma fonte repelente. Diferentes estímulos do ambiente podem ser percebidos pelas bactérias, tornando-as capazes de disparar um movimento como, a concentração de nutrientes, toxinas, pH, luminosidade, oxigênio, osmolaridade e temperatura. A quimiotaxia é uma importante ferramenta de interação entre bactérias de vida livre e processos de simbiose com outros organismos como bactérias do gênero *Rhizobium*. Este processo pode ainda estar associado a patogenicidade em muitos outros micro-organismos (WADHAMS & ARMITAGE, 2004).

O flagelo bacteriano é a estrutura responsável pelo movimento natatório. Este é composto por flagelina e apresenta uma forma helicoidal. Sua base é mais larga, formando um gancho que se conecta a uma região motora na célula. Esse motor é formado por anéis contendo um bastão central. No caso de bactérias Gram negativas, como os rizóbios, o anel mais externo (L) está localizado na camada lipopolissacarídica. Em seguida vem o anel P ancorado na camada de peptidoglicano na parede celular e, internos à membrana citoplasmática, estão os anéis MS e C respectivamente. O flagelo bacteriano é impulsionado por uma força próton motiva gerada por um gradiente de prótons que permite sua rotação (MADIGAN et al., 2010).

3.4 Fixação biológica de Nitrogênio

A fixação biológica de nitrogênio consiste na redução do nitrogênio atmosférico (N_2) em uma forma biologicamente utilizável pelas plantas, a amônia. Isto ocorre por meio de um complexo enzimático denominado nitrogenase (GAGE, 2004). No caso da fixação biológica de nitrogênio envolvendo rizóbios e leguminosas, existe uma molécula que tem o papel de facilitar o efluxo de O_2 em baixíssimas concentrações para permitir a respiração dentro do nódulo sem que haja inativação da nitrogenase, conhecida como leghemoglobina (DOBEIREINER 1997).

Dentre os organismos que realizam esse processo estão: archeas, bactérias e cianobactérias que, de acordo com Zahran (1999), podem ser, tanto de vida livre como mutualistas. Um exemplo da fixação biológica de nitrogênio por cianobactérias é observado em *Anabaena azollae* que fixa nitrogênio na *Azolla*, uma pteridófita importante na fertilização de campos de arroz. Ainda podem ser citados os actinomicetos do gênero *Frankia* que se associam aos amieiros (GAULKE et al., 2006; BOCCHI & MALGIOGLIO, 2010).

3.5 Mutualismo: rizóbio-leguminosa

O mutualismo trata de uma relação em que ambos os envolvidos são beneficiados, uma vez que cada sócio tem uma habilidade que complementa as do outro. Um forte exemplo é a associação entre rizóbios e leguminosas. Os primeiros são capazes de utilizar o nitrogênio molecular e fixá-lo na forma de amônia disponibilizando-o para a planta enquanto estas os suprem com os carboidratos produzidos por seu metabolismo (RICKELEFS, 2001).

No processo de infecção e nodulação das leguminosas, a planta secreta exudatos capazes de atuar como agentes de atração química para a bactéria – quimioattractantes. São eles: (iso) flavonóides, betaínas, carboidratos, aminoácidos além de outros atrativos químicos (GAWORZEWSKA & CARLILE 1981, AGUILAR et al., 1988). Estes favorecem a multiplicação do rizóbio no entorno da raiz, além de induzirem a produção de fatores de nodulação (Nod)

pelo rizóbio como reportado por Bloom (2006). Os fatores Nod são proteínas secretadas pelo gênero *Rhizobium* sendo importantes para facilitar a formação do nódulo e determinar a especificidade hospedeiro –simbionte.

A produção da proteína Nod D pelo rizóbio ativa a transcrição de genes responsáveis por induzir a nodulação na planta, promovendo o início das mudanças nos pêlos radiculares para permitir a infecção. Assim o processo de infecção pode ocorrer de três maneiras: pelo dobramento do pêlo radicular, com a digestão e invaginação da parede celular. Pode ocorrer também apenas pela digestão da parede das células radiculares, ou ainda por meio de injúrias geradas com a formação de raízes laterais, prosseguindo na formação de um canal de infecção. O canal de infecção se desenvolve da extremidade do pêlo radicular em direção ao córtex, permitindo com que os rizóbios alcancem outras células (ARAÚJO & HUNGRIA, 1994; BLOOM, 2006).

Na planta há formação de um meristema próprio do nódulo, dando origem ao primórdio nodular. A infecção se dará de célula a célula individualmente permanecendo as bactérias no seu citoplasma. Desta forma, o canal de infecção preenchido de rizóbios se alonga e alcança a região do primórdio do nódulo. Neste momento, quando a membrana da célula do pêlo radicular alcança esta estrutura da célula hospedeira, ocorre uma fusão entre as mesmas. Como conseqüência ocorre a formação de uma membrana que envolve os rizóbios (membrana peribacteroidal). O canal de infecção ramifica, permitindo que os rizóbios alcancem mais células (ARAÚJO & HUNGRIA, 1994; BLOOM, 2006). A bactéria assume a forma de um bacterióide tornando-se uma célula intumescida, deformada e ramificada, sendo envolvida pela membrana citoplasmática da própria célula vegetal, originando um simbiossomo. Após a formação desta estrutura e a expressão dos genes *nif* (*nitrogen fixation*) e *fix* (*fixation*), a dinitrogenase começa a funcionar, iniciando o processo de fixação (ARAÚJO & HUNGRIA, 1994; MADINGAN et al. 2010).

O nitrogênio molecular é fixado na forma de amônia, e logo convertido em formas orgânicas (amidas ou ureídeos), como abordam Santos e Reis (2008), no próprio nódulo. Em seguida estes compostos são exportados através do xilema até a parte aérea para assimilação.

3.6 Leguminosas: feijão comum (*Phaseolus vulgaris*)

As leguminosas são plantas da família Fabaceae que é dividida em três subfamílias: Papilionoideae ou Faboideae, Caesalpinoideae e Mimosoideae. As leguminosas são uma das maiores famílias das Angiospermas. Dentre as espécies de importância econômica estão aquelas utilizadas na alimentação, como o feijão (*Phaseolus vulgaris*), a soja (*Glycine max*), o amendoim (*Arachis hypogaea*), a ervilha (*Pisum sativum*) e o grão de bico (*Cicer arietinum*) entre outros. Podem também ser utilizadas na adubação verde como o feijão gandu (*Cajanus cajan*) (SOUZA & LORENZI, 2008).

Dentre as espécies do gênero *Phaseolus*, o feijão comum é a espécie mais cultivada no mundo. Este se encontra classificado na subfamília Faboideae. A espécie constitui-se como uma importante fonte proteica em países em desenvolvimento das regiões tropicais e subtropicais e o Brasil foi o país com maior produção mundial em 2006 (BARBOSA & GONZAGA; 2012). De acordo o portal Agência Brasil, a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), a safra do grão entre 2016/2017 no Brasil era estimada em 227,9 milhões de toneladas, com um aumento de 22,1% em relação à safra passada.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O inoculante comercial Nitro 1000 para o feijão foi utilizado para a obtenção das culturas de *Rhizobium tropici* CIAT 899, o qual foi gentilmente cedido pela empresa Nitro1000 Inoculantes Biológicos. *Rhizobium tropici* CIAT 899 é a estirpe de referência para produção de inoculantes para feijão comum no Brasil recomendada pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento de acordo com a Normativa Nº13 de 24 de março de 2011. A infectividade do inoculante foi testada no feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), cultivar BRS madrepérola, doado pela EPAMIG- Viçosa.

Os nanotubos de carbono foram doados pelo CT-Nano, sendo utilizado o mesmo lote de síntese para ambas as formas: Não funcionalizados e funcionalizados.

O meio de cultura 79 ou Extrato de Levedura Manitol – YM de Vincent (1970) foi utilizado para o crescimento de *Rhizobium* sp. com adição de vermelho congo para a identificação de possíveis contaminantes. Além da adição de um indicador de pH, azul de bromotimol. A descrição da composição e preparo do meio de cultura está disponível no Anexo 1.

4.1 Verificação da infectividade bacteriana no inoculante

O potencial infectivo do inoculante foi testado no feijão comum cultivar BRS-Madrepérola em casa de vegetação.

4.1.1 Preparo e desinfestação das sementes do feijão:

As sementes foram desinfestadas com etanol 90% por 1 min e hipoclorito de sódio a 3% por 2 min. Em seguida, foram lavadas 10 vezes com água destilada estéril.

4.1.2 Plantio e observação de nódulos:

As sementes foram plantadas em bandejas de germinação. Após a germinação foram transferidas para vasos contendo substrato e vermiculita (Figura 1). Após o aparecimento do primeiro par de folhas, 2 ml de inoculante foram aplicados junto a base da planta próximo as raízes, na concentração aproximada de 1×10^9 UFC/mL. Quando os primeiros botões florais se desenvolveram, as plantas foram retiradas dos vasos e avaliadas quanto a presença dos nódulos nas raízes.

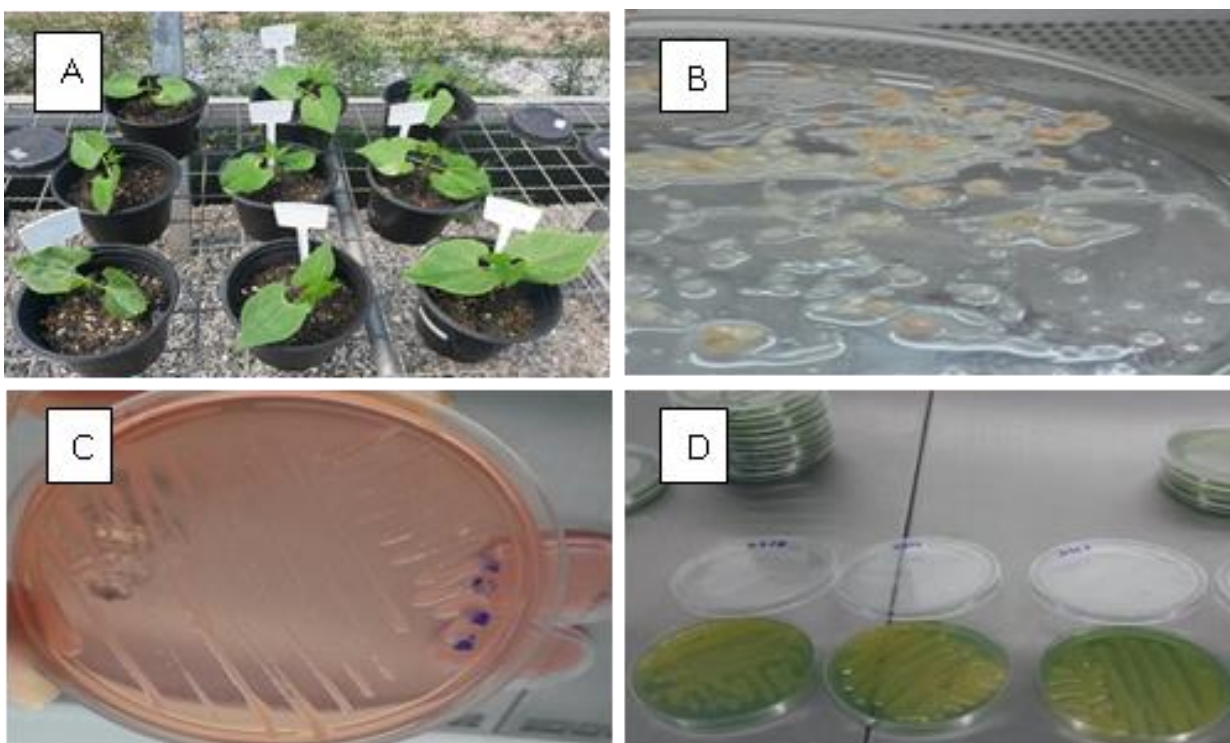
Os nódulos foram retirados e desinfestados com etanol absoluto por 10 a 15 segundos e solução de hipoclorito de sódio a 3 % por 1 min. Em seguida foram lavados 5 vezes com água destilada estéril.

4.1.3 Isolamento das bactérias nodulíferas

Os nódulos foram macerados e o conteúdo estriado em placas contendo meio YMA e Vermelho Congo para isolamento dos rizóbios. Este processo foi feito por meio de duas passagens nas plantas. As bactérias isoladas em meio YMA adicionado de Vermelho Congo foram transferidas para placas de YMA contendo Azul de bromotimol e caracterizadas quanto à sua capacidade de acidificar o meio. É conhecido que espécies de *Rhizobium* sp. de crescimento

rápido, como *Rhizobium tropici*, geralmente acidificam o meio de cultura, mudando-o de verde para amarelado, enquanto aquelas de crescimento mais lento o tornam mais alcalino apresentando a coloração azulada, como abordam Martins e colaboradores (1997).

Figura 1- Processo de avaliação da infectividade do inoculante.



Legenda: a) Cultivo do feijão BRS- Madre Pérola. b) Macerado dos nódulos. c) Isolamento das bactérias em meio YMA com Vermelho Congo. d) Isolamento em YMA e Azul de Bromotimol.

4.2 Dispersão aquosa dos Nanomateriais

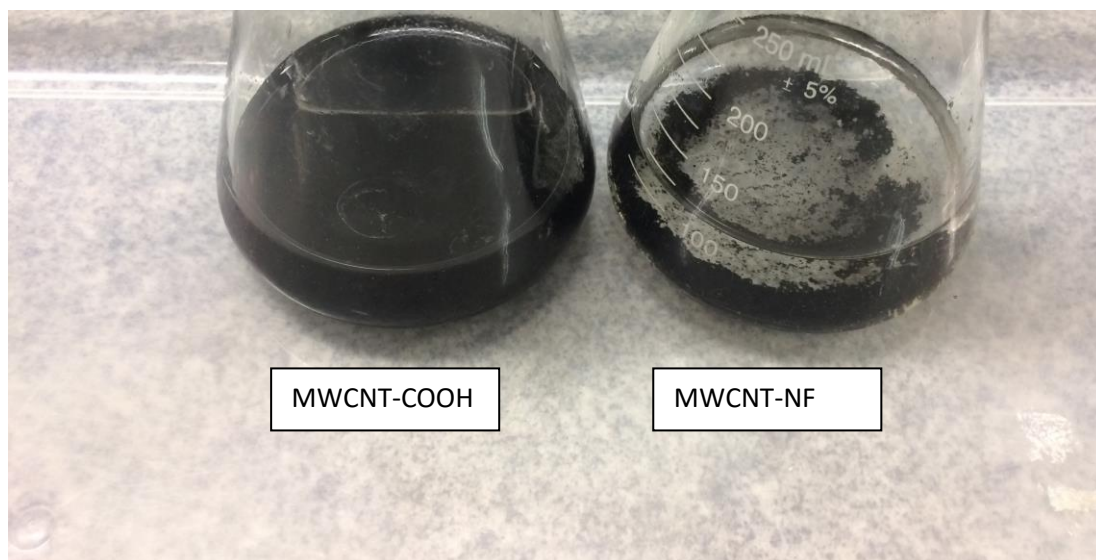
Os nanotubos de carbono foram dispersos em água ultrapura com o auxílio de um ultrassom de ponta Branson Digital Sonifer por 12 minutos a uma amplitude de 20% de acordo com o protocolo para a produção de dispersões reprodutíveis de nanomateriais (BOOTH & JENSEN, 2015) figura 2.

Figura 2 Ultrassom de ponta



Legenda: Ultrassom utilizado para a dispersão dos NTCs para a obtenção das soluções estoque, utilizadas nos ensaios.

Figura 3 Soluções estoque de MWCNTs após dispersão por Ultrassom de ponta



Legenda: Da esquerda para direita: Solução estoque para MWCNT-COOH e solução estoque para MWCNT-NF.

Foram armazenadas soluções estoques de 250mg/L de MWCNT funcionalizados e não funcionalizados num volume final de 200 ml, as quais foram posteriormente esterilizadas em autoclave. É possível observar que os MWCNT-COOH apresentaram uma melhor dispersão em água do que os

MWCNT-NF que apresentaram agregados. Isto ocorre devido a presença dos grupos funcionais que lhes confere um caráter hidrofílico, uma vez que nanotubos de carbono puros são hidrofóbicos, conforme a figura 3.

As concentrações utilizadas nos ensaios foram baseadas no protocolo padrão *Toxicity Test with Microalgae Pseudokirchneriella subcapitata* (atualmente *Raphidocelis subcapitata*) for NANoREG core nanomaterials utilizado para os ensaios de toxicidade para nanomateriais de acordo com protocolo de Cerrillo e Gemma (2015). Este foi utilizado como base, uma vez que até o momento não há um protocolo estabelecido para testes de toxicidade para nanomaterial com bactérias do solo. O protocolo NANoREG preconiza 5 concentrações iniciais para os ensaios: 25mg/L, 2,5mg/L, 0,25 mg/L, 0,025mg/L e 0,0025 mg/L do nanomaterial em meio de cultura. Foram realizados ensaio-piloto utilizando a concentração de 2,5 mg/L e não foi constatado efeito de inibição ou estimulação do crescimento. Desta forma, optou-se por utilizar concentrações acima de 2,5 mg/L, mas dentro da faixa proposta no protocolo para avaliação de toxicidade para nanomateriais utilizando a microalga. Optou-se por utilizar: 20 mg/L, 15mg/L, 12,5mg/L, 7,5mg/L e 5mg/L.

4.3 Caracterização dos nanomateriais

A caracterização físico-química dos nanomateriais utilizados em processos ecotoxicológicos é requerida de acordo com o protocolo Nanoreg para produção e caracterização de dispersões reprodutíveis de nanomateriais manufaturados (BOOTH & JENSEN, 2015).

4.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Amostras de nanotubos de carbono foram avaliadas por meio de microscopia eletrônica de varredura pelo Centro de Microscopia Eletrônica da UFMG. A análise das imagens para mensurar a variação do diâmetro dos nanotubos de carbono foi realizada por meio do Software Image J. Foram analisadas as imagens de 200 nm e 1 micrometro. Em cada uma das imagens foram medidos pelo menos 9 diferentes diâmetros dos nanotubos de carbono, tendo como base a escala informada pelo Centro de Microscopia. Foi calculado o intervalo dos valores medidos, bem como a média.

4.3.2 Análise Termogravimétrica (TG)

Foi realizada a análise termogravimétrica, a fim de determinar a qualidade do nanomaterial por meio do grau de pureza das amostras. No caso dos MWCNT funcionalizados foi avaliada a presença dos grupos funcionais (COOH) adicionados. Toda a análise foi conduzida com o auxílio de Termobalança Shimadzu TA 60WS FC 60A. A avaliação baseia-se na perda de massa da amostra em função da temperatura ou do tempo, sendo geradas curvas de aquecimento entre 20 a 900°C, a uma taxa de 10°C/min, em atmosfera de ar seco. Os resultados gerados são expressos utilizando a curva termogravimétrica (TG) e pela derivação, obtém-se a curva termogravimétrica derivativa (DTG).

4.3.3 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

Amostras da solução-estoque de MWCNT-COOH (250mg/L) foram diluídas em água deionizada, sendo 2 microlitros da solução estoque em 2 mL de água ultrapura e avaliadas à temperatura de 25°C com o auxílio do equipamento ZETA-SIZER Nano ZS90, MALVERN. Este equipamento permite determinar o diâmetro hidrodinâmico médio dos materiais em uma dispersão, bem como informar sobre as características de dispersão por meio do índice de polidispersão.

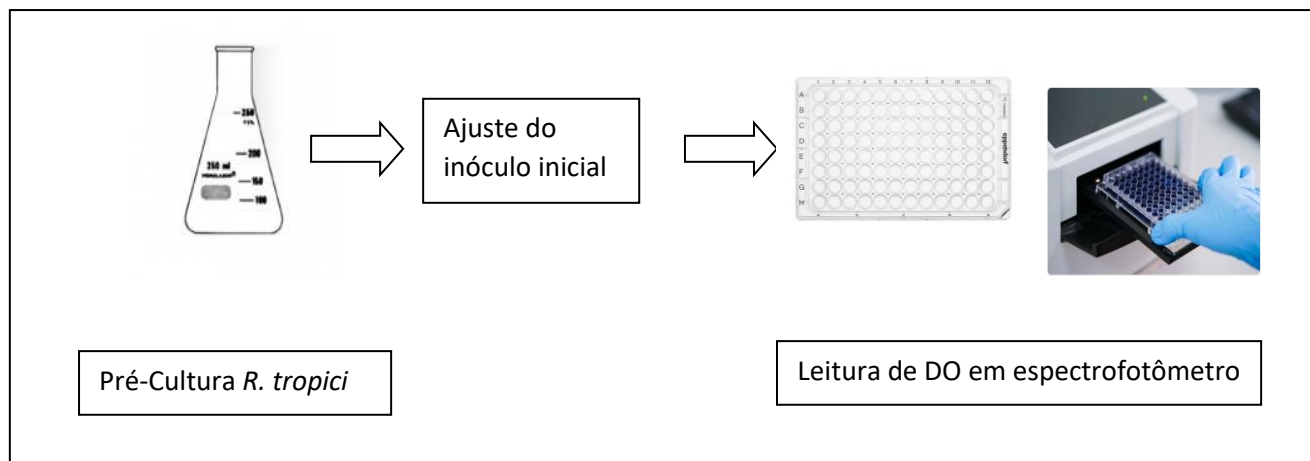
4.4 Avaliação da viabilidade bacteriana após a exposição aos MWCNT-COOH e MWCNT-NF

4.4.1 Preparo do inóculo inicial

Foi preparada uma pré-cultura de *R. tropici* cultivada em meio YM líquido e incubada por até 48 h, sob agitação de 100 RPM a 28 °C. A partir desta pré-cultura foram tomadas alíquotas e adicionadas a solução salina (0,85%) para o ajuste do inóculo inicial. Um espectrofotômetro foi utilizado para leitura da densidade óptica medida a uma absorbância de 625nm. Foi definido o inóculo quando a leitura alcançou o valor de 0,07, o qual correspondeu a aproximadamente 4×10^7 UFC/ml.

4.4.2. Avaliação do crescimento de *R. tropici* por medida da densidade óptica (DO)

Após o ajuste do inóculo inicial foi preparada a placa de 96 poços para a condução do ensaio. O branco foi feito com meio de cultura sem adição de inóculo. Para o controle foi adicionado meio de cultura e o inóculo completando o volume final do poço para 200 μ l. No tratamento, o meio de cultura foi adicionado aos MWCNT-COOH e MWCNT-NF, nas cinco concentrações definidas juntamente com o inóculo bacteriano (tabela 1). As placas foram incubadas a uma temperatura de 28°C, a uma absorbância de 625nm por até 96 horas no espectrofotômetro. A densidade óptica foi medida a cada 12 horas para obtenção da curva de crescimento após a exposição aos nanotubos de carbono (figura 3). Foram realizados dois ensaios com quatro réplicas cada.



Legenda: Foram realizados 2 ensaios em momentos distintos com pelo menos 4 replicatas cada.

A microplaca foi preenchida de acordo com a tabela 1 para análise do crescimento por meio da Densidade óptica com auxílio de espectrofotômetro.

Tabela 1- Disposição de Controle e Tratamentos na microplaca

Réplicas	Branco	Controle	Tratamento (Concentração de NTC)				
			C1:	C2:	C3:	C4:	C5:
			5mg/L	7,5mg/L	12,5mg/L	15mg/L	20mg/L
1	YM	YM/inóculo	NTC/ YM/ Inóculo				
2	YM	YM/inóculo	NTC/ YM/ Inóculo				
3	YM	YM/inóculo	NTC/ YM/ Inóculo				
4	YM	YM/inóculo	NTC/ YM/ Inóculo				

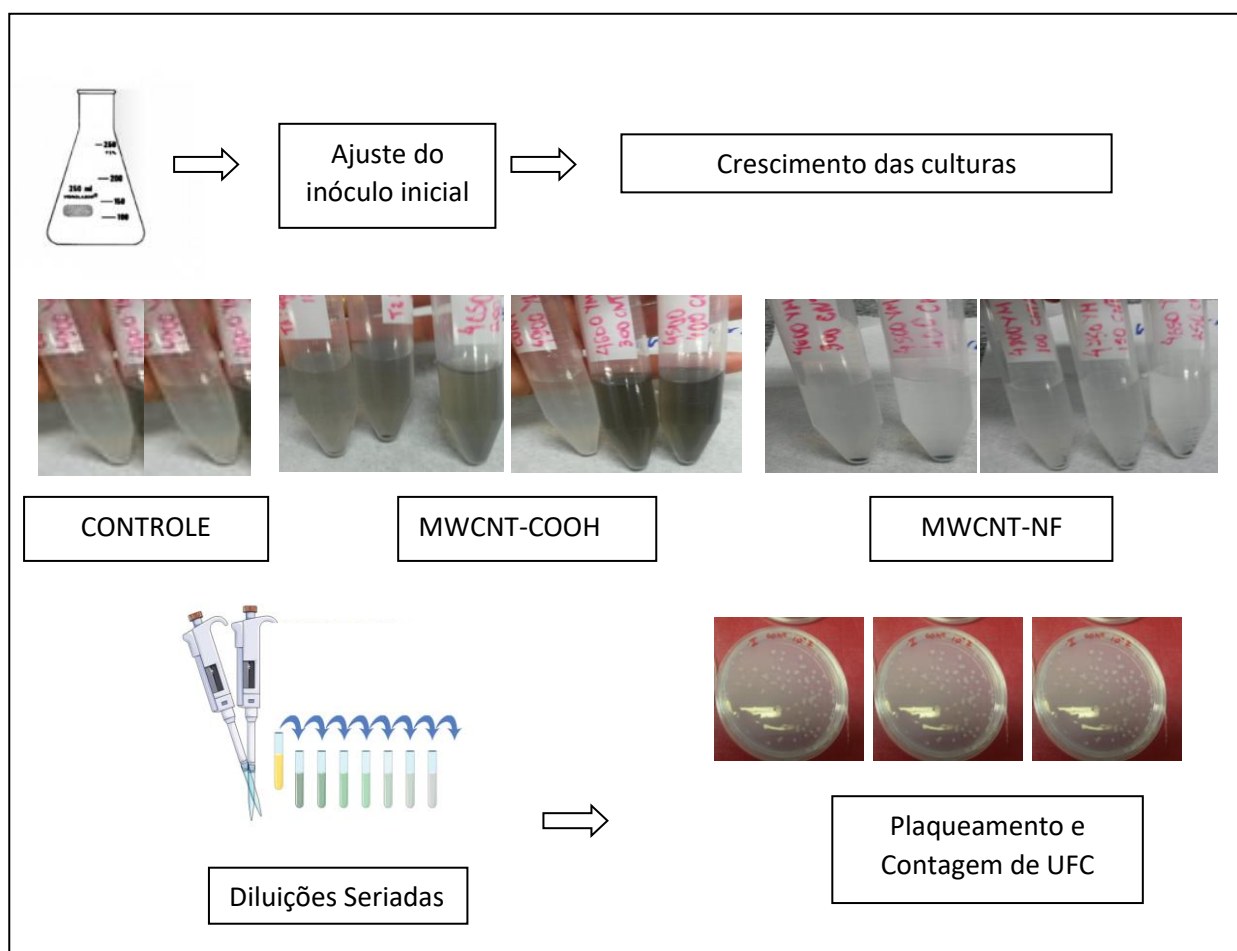
Legenda: YM: Meio de Cultura Extrato de Levedura Manitol, C1-C5 Concentrações de NTC utilizadas nos tratamentos.

4.4.3 Avaliação da viabilidade de *R. tropici* por contagem de UFC/mL

O inóculo previamente ajustado foi semeado em tubos falcon contendo meio de cultura para o controle e adicionados das respectivas concentrações de NTC,

para os tratamentos. Os tubos foram colocados em incubadora refrigerada a 28° C, sob agitação a 100 RPM, por até 96 horas. A cada 24 horas foram retiradas alíquotas de 100 µl dos tubos para as diluições seriadas em salina a 0,85% na proporção de 1:10 a 1: 1.000.000. Em seguida, foi realizada a semeadura em placas com meio Agar manitol extrato de levedura (YMA) em triplicatas (figura 4). Após o crescimento, as placas foram contadas para a obtenção dos valores de UFC/mL, comparando-se controle e tratamentos. Este ensaio foi realizado por 3 vezes.

Figura 6 Desenho experimental da avaliação do crescimento por contagem de UFC/mL



Legenda: O ensaio foi realizado com 3 replicatas e repetido por 3 vezes.

4.4.4 Cálculo dos parâmetros de crescimento

Para o cálculo dos parâmetros de crescimento: taxa de crescimento, número de gerações e tempo de geração, foi utilizada a equação da taxa específica de

crescimento (μ) (Eq. 1). Esta torna-se aplicável apenas para período de crescimento exponencial de acordo com Madingan et. al. (2010):

Equação 1: $N_t = N_0 . e^{\mu.t}$

Em que:

N_t : Número de células no tempo no intervalo da fase exponencial

N_0 : Número de células no início da fase exponencial

μ : taxa específica de crescimento

t : tempo

Para obter a representação logarítmica do crescimento, podem ser aplicados logaritmos naturais em ambos os lados da equação:

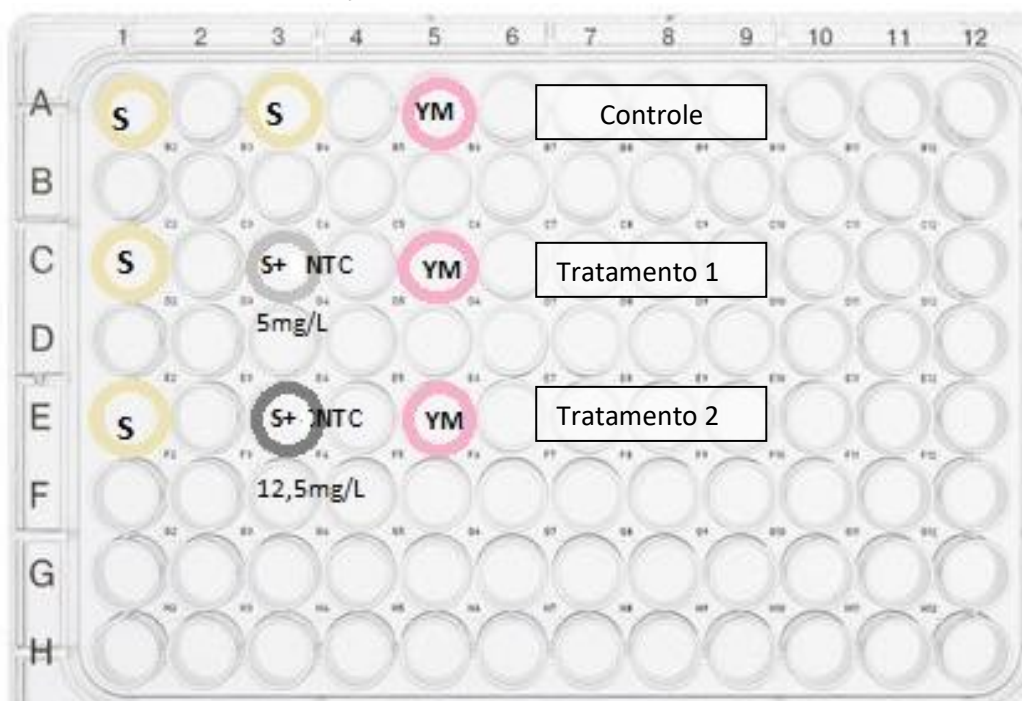
Equação 2: $\ln . N_t = \ln . N_0 + \mu.t$
--

4.5 Avaliação da motilidade bacteriana em exposição aos MWCNT-COOH

Foi confeccionado um aparato para avaliar a motilidade bacteriana. Para isto foi utilizada uma placa de 96 poços, na qual foram conectados três poços com dois segmentos de capilares de vidro com diâmetro interno de 0,8mm (Figura 4). Para a avaliação da motilidade bacteriana com o tubo capilar foi utilizada a metodologia de Chuiko, Kurdish e Antonyuk (1999) modificada. Alíquotas de uma pré-cultura crescida até 48 h foram diluídas em salina a 0,85% e centrifugadas a 6000 g por 2 minutos. Após foram lavadas três vezes com salina para remoção dos resíduos do meio de cultura. As células presentes no

fundo dos microtubos foram re-suspensas em salina a 0,85% para ajuste do inóculo inicial correspondente a uma densidade óptica de 0,09 medido a uma absorvância de 625 nm, equivalente a $4,5 \times 10^8$ UFC/ml. Este inóculo foi adicionado apenas aos poços centrais para a observação da motilidade bacteriana em direção aos adjacentes. As placas foram preenchidas de acordo com a figura 5.

Figura 7 Desenho experimental da avaliação da motilidade bacteriana em exposição aos MWCNT-COOH



Legenda: S: Salina (creme), NTC: Nanotubos de Carbono (cinza e preto), YM: Meio de Cultura Extrato de levedura Manitol (rosa)

Para avaliar a motilidade, foi realizada a contagem de UFC/mL após 24h de incubação. Para tanto, foi tomada uma alíquota de 100 μ l de cada poço e feitas diluições seriadas (1:10). Em seguida foi realizada a semeadura em meio de cultura YMA. As placas foram incubadas a 28° C em incubadora B.O.D. para a contagem posterior.

4.6 Tratamento Estatístico

O tratamento estatístico dos dados foi realizado através dos programas GraphPad Prism 8 e BioEstat 5.0. A normalidade dos dados foi verificada através da construção de histogramas e a aplicação do teste de Shapiro-Wilk. Para os dados que apresentaram distribuição normal, testes paramétricos foram utilizados, enquanto para os não normais, procedimentos não-paramétricos foram selecionados. Em todos os testes, foi considerado o nível de significância de 5 % ($\alpha = 0,05$).

A distribuição dos dados das réplicas dos ensaios de viabilidade (densidade ótica) não diferiu estatisticamente entre si (Teste de Kruskal-Wallis - KW) com *post hoc* Conover-Inman). Deste modo, médias aritméticas foram calculadas para cada período, as quais foram utilizadas para a comparação dos diferentes tratamentos com MWCNT-COOH e MWCNT-NF com o controle, por meio do teste de análise de variância (ANOVA *one-way*) com *post hoc* Bonferroni.

A comparação entre as taxas de crescimento do experimento controle com os tratamentos com MWCNT-COOH foi realizada através da ANOVA *one-way* com *post hoc* Bonferroni, enquanto entre os tratamentos com MWCNT-NF foi aplicado o Teste de KW com *post hoc* Conover-Inman. O número e o tempo de geração do controle e tratamentos com MWCNT-COOH e MWCNT-NF não foram comparados estatisticamente, considerando a derivação dos seus valores a partir das taxas de crescimento. (Tabelas apresentadas no Apêndice 1).

Para os ensaios de motilidade, foi utilizado o teste t para a comparação das médias das contagens de UFC entre os poços com nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a adição dos MWCNT-COOH em meio de cultura foram geradas soluções polidispersas com coloração variando de cinza clara a negra. As soluções contendo apenas MWCNT-NF apresentaram coloração transparente com pequenas partículas em suspensão, tendo decantado rapidamente, fato

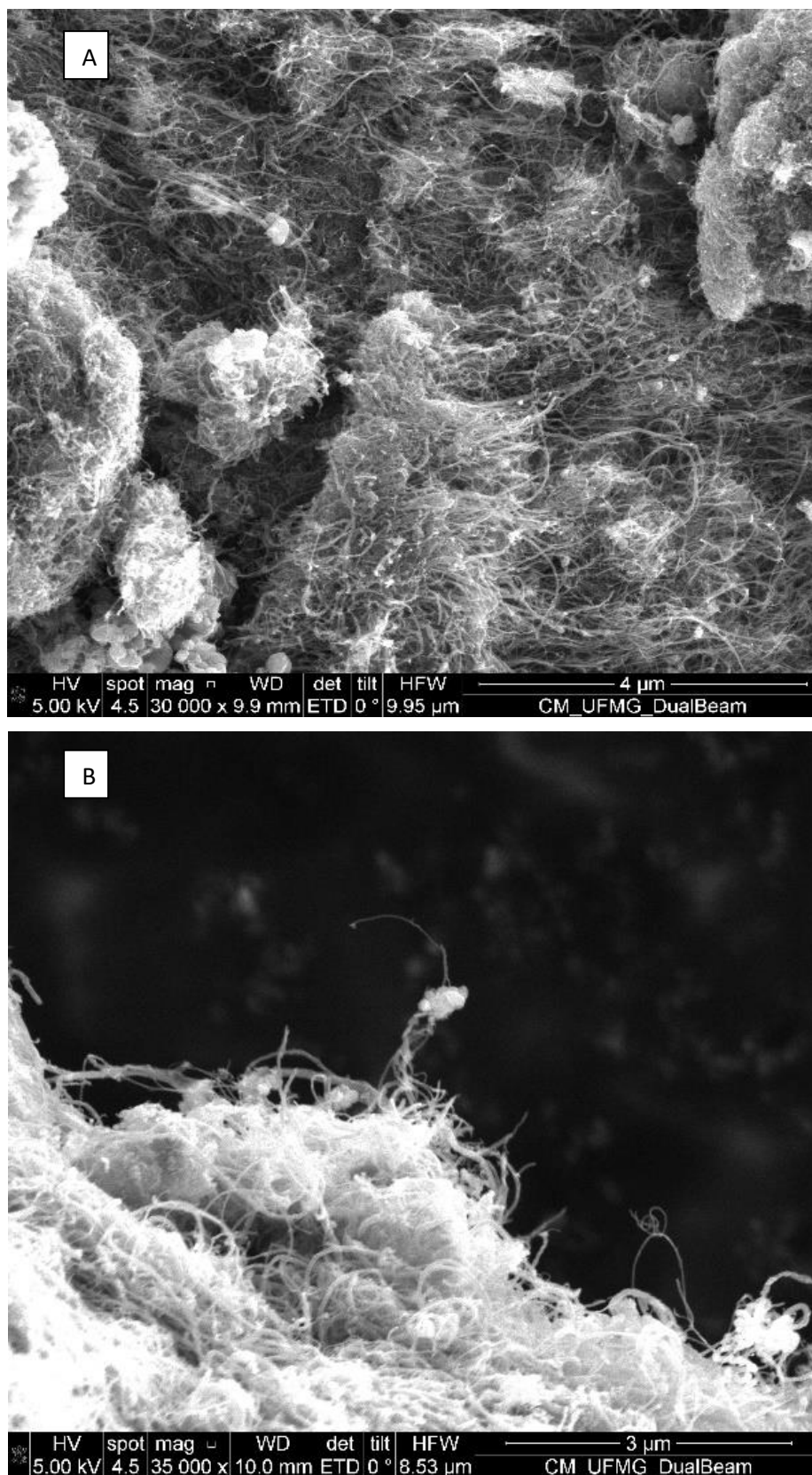
esperado, devido a característica hidrofóbica dos nanotubos de carbono não funcionalizados.

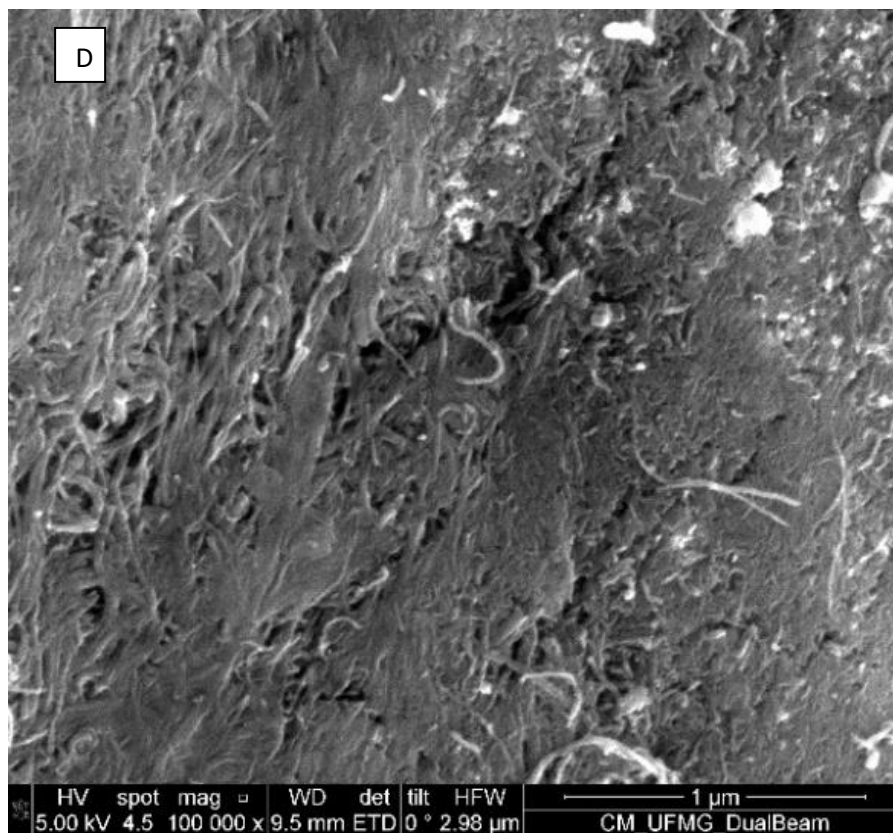
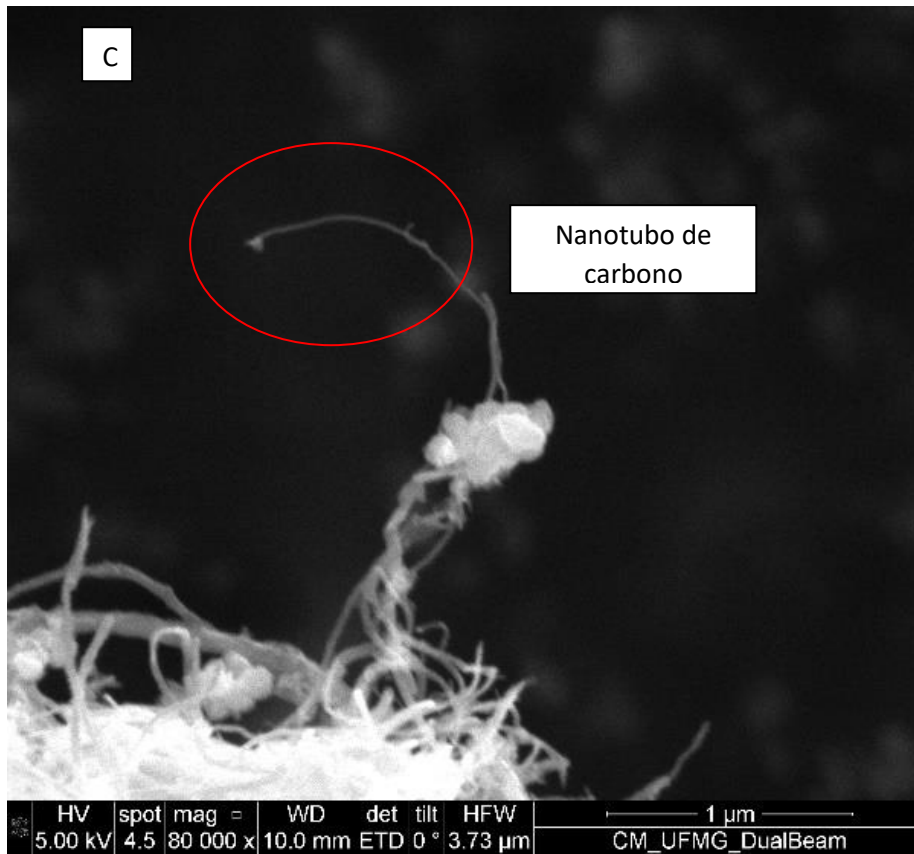
A funcionalização dos NTCs é um processo capaz de elevar a disponibilidade destes materiais em uma dispersão, facilitando seu contato com a célula. Nanotubos de carbono poderiam, até mesmo, atravessar membranas e alcançarem compartimentos intracelulares (COSTA et al., 2016).

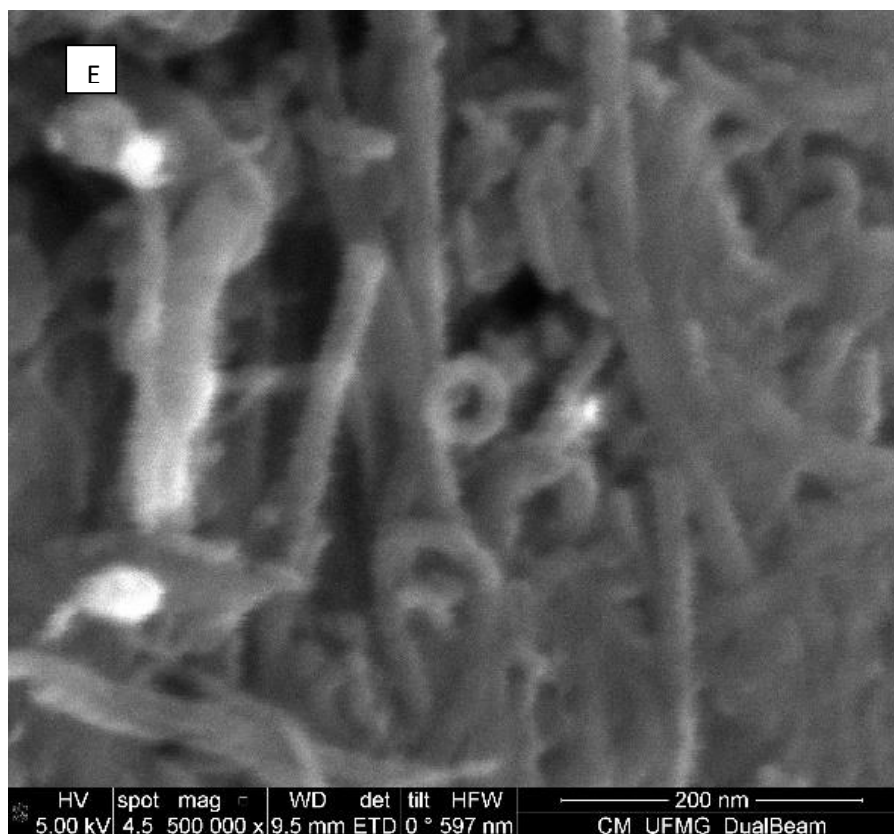
5.1 Caracterização dos MWCNTs por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As imagens a seguir revelam aspectos da morfologia dos MWCNTs por meio da microscopia eletrônica de varredura. Os nanotubos de carbono se apresentam na forma de filamentos ultrafinos, conforme mostrado nas micrografias 6A – 6E. Foi possível visualizar um filamento de NTC individualizado na micrografia 6C, destacado pelo círculo vermelho na imagem. Para analisar as imagens obtidas foi utilizado o Software Image J. O diâmetro dos nanotubos foi medido e variou entre 14,397 nm e 48,000 nm, com média de 29,444 nm. Estes valores são compatíveis com o esperado para NTCs, que podem ocorrer entre 1nm e 100 nm, como apontado por Fernandes (2008).

Figura 8 Fotomicrografias por MEV evidenciando a morfologia dos MWCNT.







Legenda: A. Imagem na escala de 4 μm . B. Imagem na escala de 3 μm . C. Imagem na escala de 2 μm , o círculo vermelho evidencia um filamento de NTC. f. D. Imagem escala de 1 μm . E. Imagem a 200 nm.

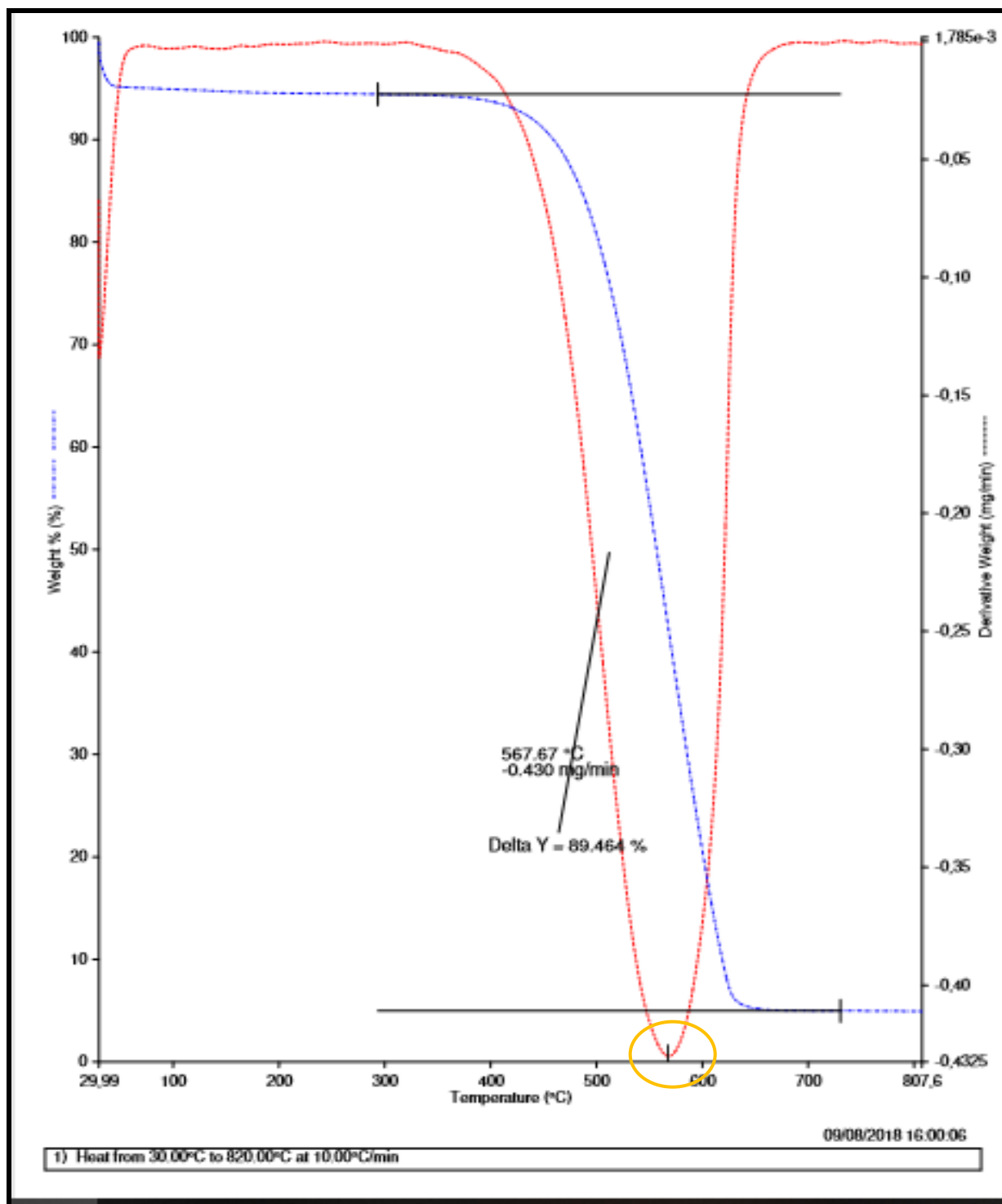
5.2 Caracterização por Análise Termogravimétrica (TG)

A análise termogravimétrica caracteriza os nanomateriais pelos perfis de perda de massa. A curva em vermelho demonstra a perda de massa do material em função da temperatura (figuras 7 e 8). As análises dos MWCNT-NF e MWCNT-COOH demonstraram uma pureza de 89,46% e 88,66% respectivamente. Garantir alta pureza é importante para minimizar a intervenção de resíduos metálicos provenientes dos processos de síntese dos NTCs. De acordo com Oliveira e colaboradores (2011) o grau de pureza é um dos fatores relacionados a toxicidade dos nanotubos de carbono. No caso, os nanotubos de carbono avaliados apresentaram alta pureza.

As amostras apresentaram comportamento de perda de massa compatível para nanotubos de carbono, que ocorre entre 450°C e 650°C de acordo com Silva e colaboradores (2012). Em relação aos MWCNT-COOH, a perda de massa iniciou-se entre 200°C e 300°C devido à presença da carboxila. Para os

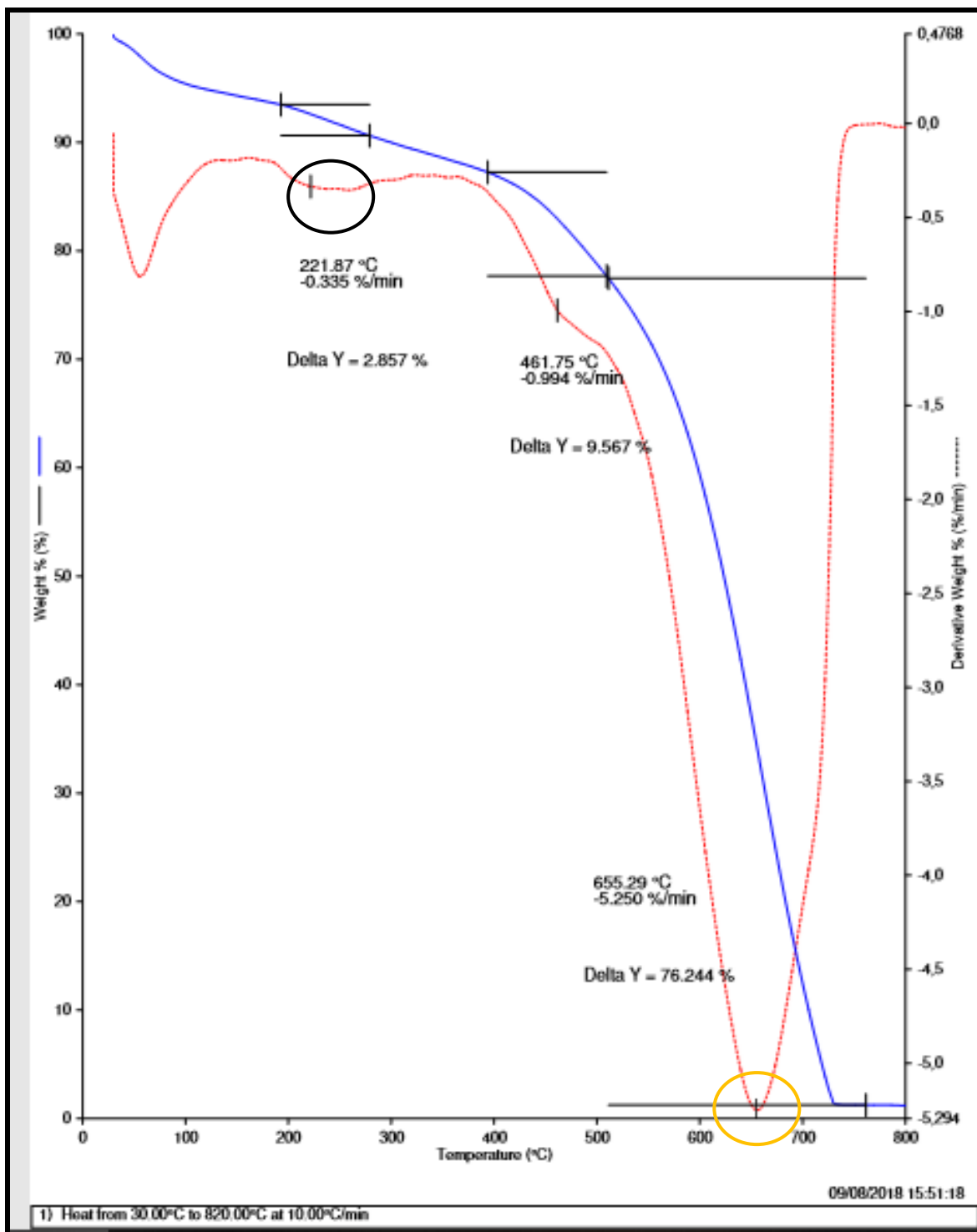
nanotubos de carbono a temperatura de perda de massa variou entre 400° C e 650° C.

Figura 9 Análise termogravimétrica dos MWCNT-Não Funcionalizados



Legenda: A Perda de massa para MWCNT apontada pelo círculo laranja entre 500° e 600 ° C.

Figura 10 Análise Termogravimétrica dos MWCNT-COOH

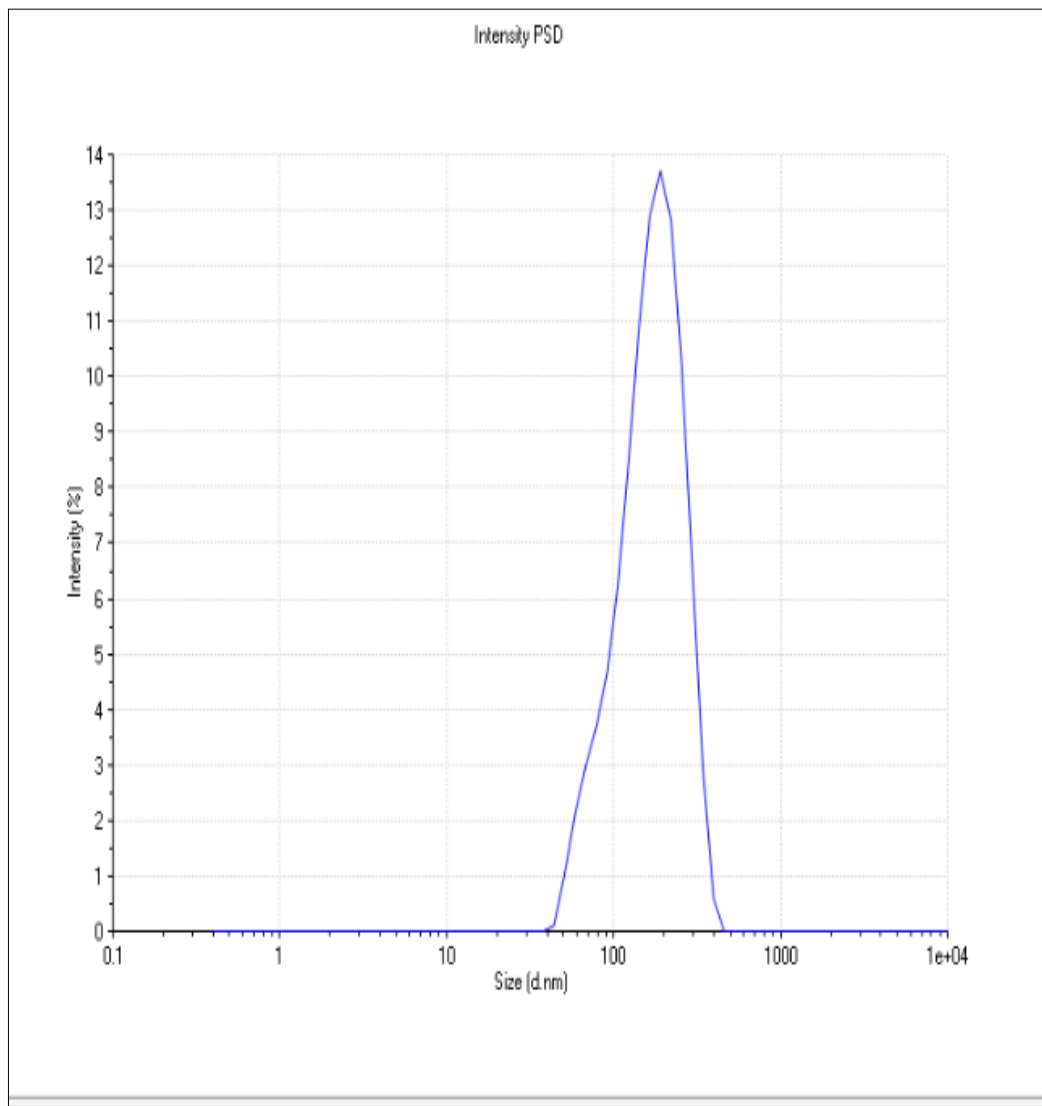


Legenda: O círculo preto destaca o intervalo de perda de massa correspondente à carboxila. O círculo laranja evidencia o intervalo de temperatura para perda de massa para MWCNT.

5.3 Avaliação das soluções estoque de MWCNTs por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

A técnica de DLS permite medir a intensidade de luz espalhada pela distribuição dos tamanhos das partículas em suspensão. Desta forma, foi avaliada apenas a dispersão da solução de MWCNT-COOH, uma vez que a solução de MWCNT- NF apresentou muitos agregados, o que era esperado, dada a característica hidrofóbica do nanomaterial.

Figura 11 Distribuição de tamanho aparente por Intensidade da dispersão de MWCNT-COOH



Legenda: Intervalo para o tamanho hidrodinâmico médio das partículas dispersas.

De acordo com o gráfico obtido na figura 11, a amostra de MWCNT-COOH dispersa apresentou pico próximo a 100nm, com média de 196,9nm, representando o diâmetro hidrodinâmico predominante. O índice de polidispersão foi de 0,420, compatível com o previsto no protocolo para produção e caracterização de dispersões reprodutíveis de nanomateriais manufaturados (BOOTH & JENSEN, 2015), revelando boa qualidade na dispersão.

5.4 Avaliação da infectividade do inoculante

O inoculante foi capaz de promover a nodulação do feijoeiro, evidenciando seu potencial de infecção. Desta forma, foram isolados os rizóbios provenientes dos nódulos do feijoeiro para a continuidade dos ensaios.

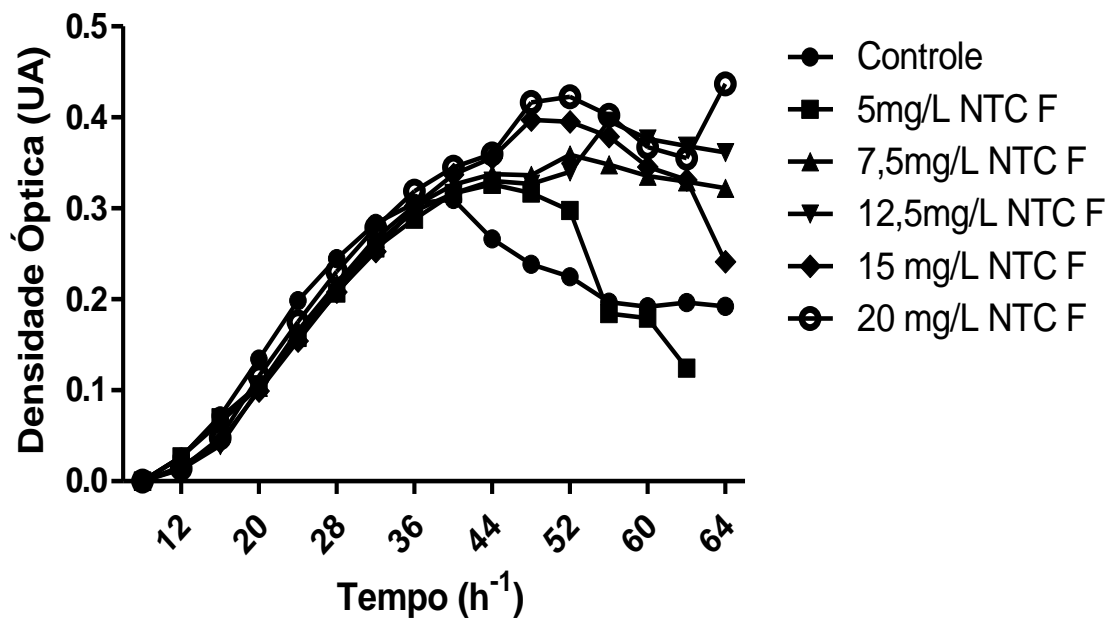
Com relação à morfologia, as colônias isoladas dos nódulos apresentaram coloração creme em meio YMA com bordas regulares, mucóides e produção de ácido em meio de cultura YMA adicionado de azul de bromotimol.

5.5 Análises de viabilidade de *Rhizobium tropici* em exposição aos MWCNT's

5.5.1 Determinação das curvas de crescimento para *R. tropici* em presença de MWCNT-COOH

A seguir são mostrados os resultados das curvas de crescimento de *R. tropici* obtidas após ensaios com avaliação da densidade óptica em relação ao tempo e por meio da contagem de UFC.

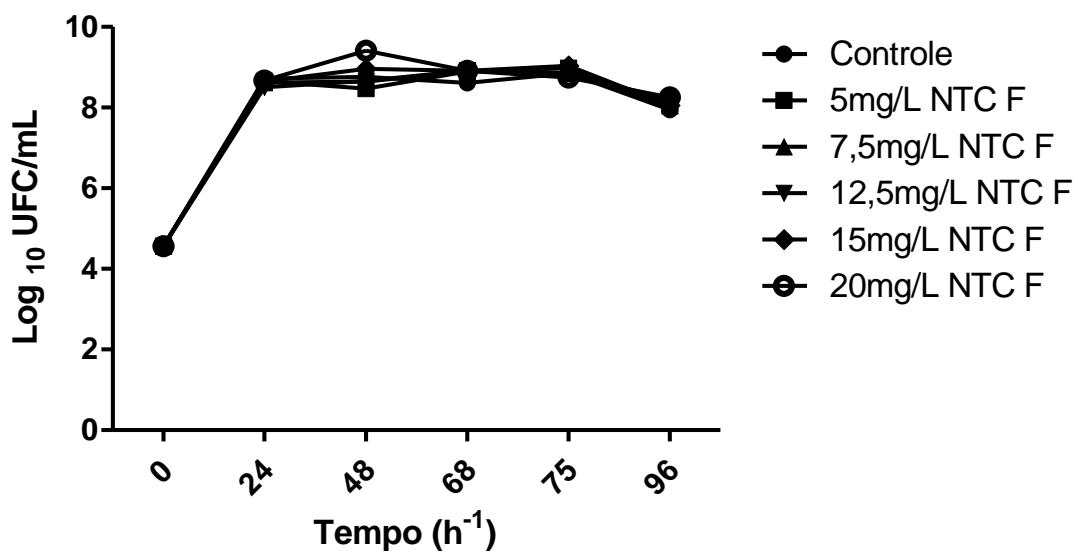
Figura 12 Crescimento de *Rhizobium tropici* em meio YM em diferentes concentrações de MWCNT-COOH medido por DO_{625 nm}.



Legenda: UA – Unidades Arbitrárias

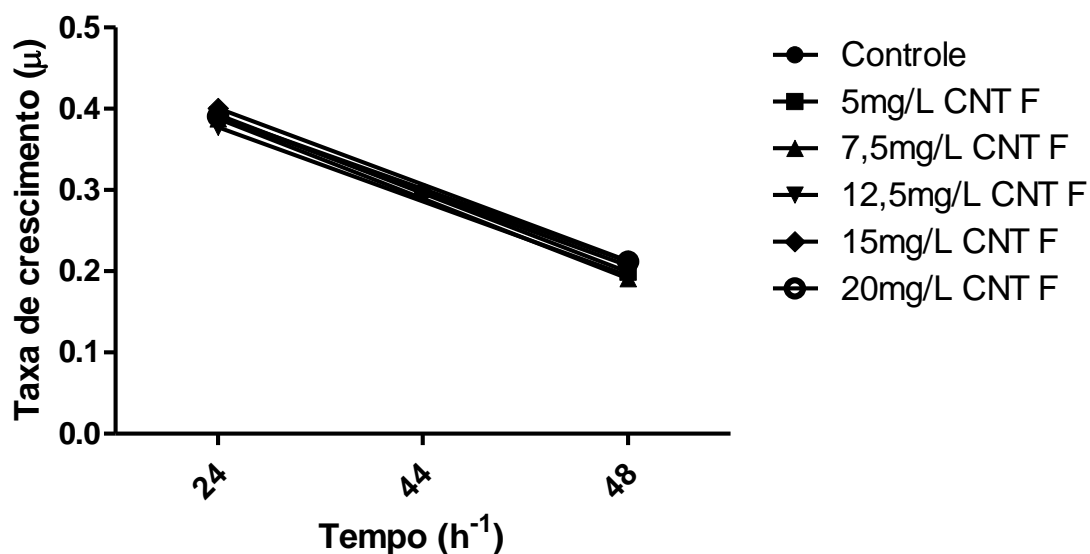
As análises estatísticas não apontaram diferença significativa entre as médias para cada tratamento em relação ao controle (figura 12). Anova ($F = 1,60$; $p > 0,05$). Desta forma, a presença de MWCNT-COOH não interferiu no crescimento de *R. tropici*

Figura 13 Unidades Formadoras de Colônia (UFC/mL) de *Rhizobium tropici* em meio YM em diferentes concentrações de MWCNT- COOH



A contagem de UFC ao longo do tempo permitiu avaliar a dinâmica de crescimento para células viáveis após adição das concentrações de MWCNT-COOH (figura 13). Com base nos resultados foi possível verificar que a presença do nanomaterial não afetou o crescimento de *R. tropici*.

Figura 14 Taxa de crescimento de *R. tropici* em diferentes concentrações de MWCNT-COOH

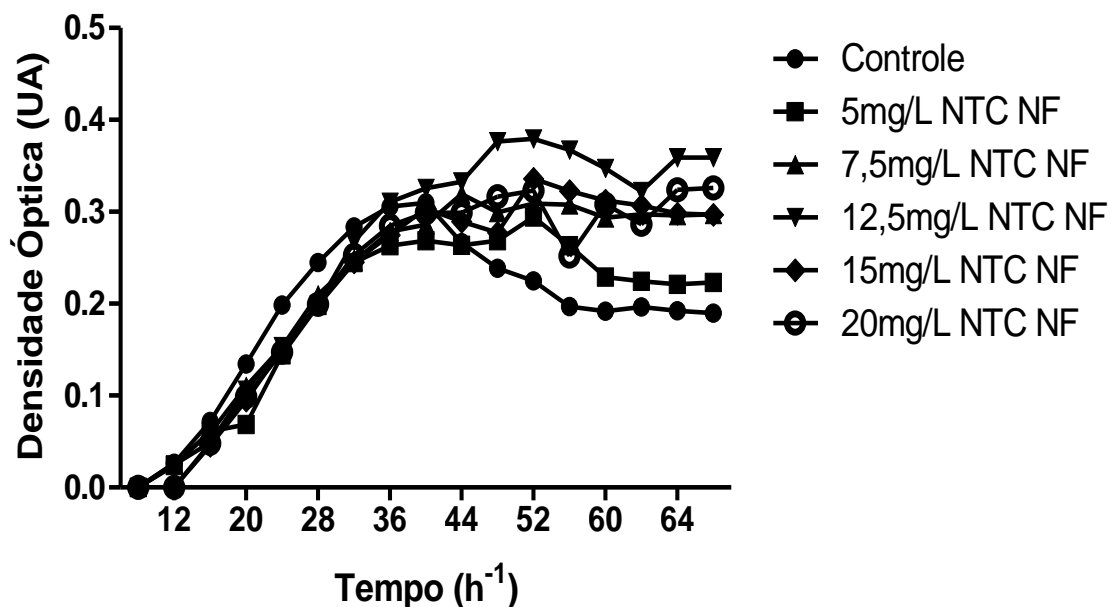


A taxa de crescimento evidenciada pela figura 14, entre controle e tratamentos seguiu um padrão semelhante. As análises estatísticas não apontaram diferença entre as taxas de crescimento do controle e de cada tratamento. Anova ($F= 0,016$; $p > 0,05$). Estes dados confirmam os resultados obtidos por meio da avaliação do crescimento pela medida da densidade óptica.

5.5.2 Determinação das curvas de crescimento de *R. tropici* em presença de MWCNT não funcionalizados

Os dados mostrados demonstram as curvas de crescimento obtidas após a exposição aos MWCNT não funcionalizados por meio da avaliação da densidade óptica e contagem de UFC em função do tempo.

Figura 15 Crescimento de *Rhizobium tropici* em meio YM, em diferentes concentrações de MWCNT-NF medido por DO_{625 nm}.



Os resultados demonstraram que não houve diferença significativa entre as médias para o controle e cada tratamento. Anova ($F= 1,25$; $p > 0,05$). Com base nas análises (figura 15), a presença de MWCNT- não funcionalizados nas concentrações avaliadas, não interferiram no crescimento de *R. tropici*.

De acordo com as análises estatísticas não houve diferenças estatísticas significativas entre as taxas de crescimento entre controle e tratamentos em presença de MWCNT-NF (figura 17). Kruskal Wallis = 0,485 $p > 0,05$. Estes resultados corroboram aqueles encontrados para avaliação da dinâmica de crescimento de *R. tropici* após as medidas da densidade óptica descritos anteriormente.

5.5.3 Comparação entre os resultados de exposição aos MWCNT-COOH e MWCNT-NF

Devido as suas características físico-químicas, nanotubos de carbono não funcionalizados dificilmente se dispersam em água, antes tendem a formar agregados, tornando-se pouco disponíveis para o contato com as células. Esta característica poderia ser uma justificativa para a ausência de toxicidade quando em contato com *R. tropici* no presente trabalho. Outros estudos corroboram os resultados encontrados. Yuan e colaboradores (2017), também não encontraram toxicidade para *Mesorhizobium loti* expostos aos MWCNT na concentração de 50 microgramas/mL, ao avaliarem o crescimento bacteriano. Adicionalmente, Kerfahi e colaboradores (2015), por meio de análises por metagenômica confirmaram que a presença de MWCNT-NF, não alterou significativamente a composição da microbiota do solo.

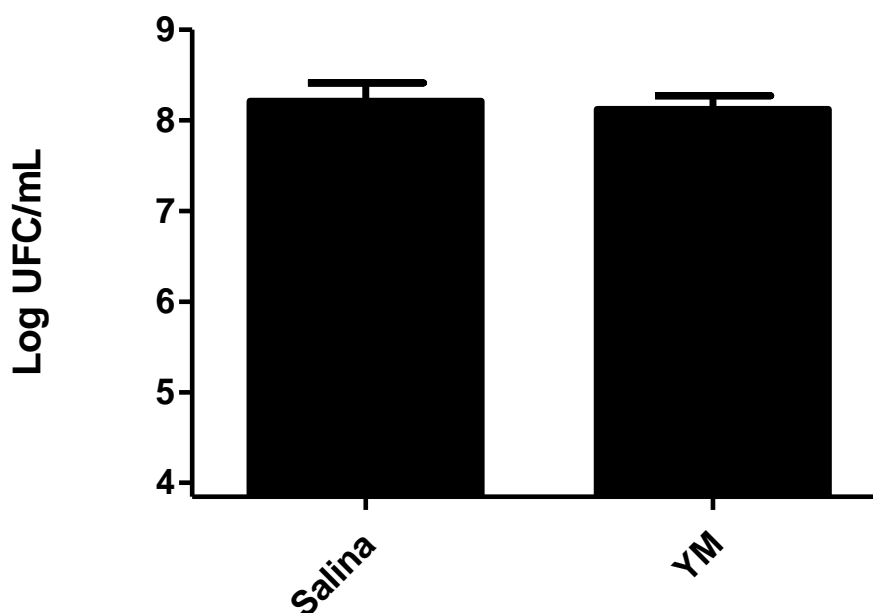
Por outro lado, quando avaliada a exposição de MWCNT funcionalizados a *R. tropici*, o crescimento bacteriano não foi afetado pela presença do nanomaterial. Este fato é obtido mesmo observando-se que MWCNT funcionalizados apresentam mais possibilidades de contato com a célula bacteriana.

Todavia, outros trabalhos utilizando bactérias potencialmente patogênicas ou comensais apresentaram diferentes resultados. Kang e colaboradores (2008), demonstraram que MWCNT funcionalizados foram capazes de provocar alterações na parede celular de *E. coli*, com conseqüente extravasamento do material genético. Adicionalmente, Chen e colaboradores (2013), constataram efeito antibacteriano para MWCNT-COOH contra bactérias como, *E. coli*, *Lactobacillus* spp., *Bifdobacterium adolescentis*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus* spp.

5.6 Análise da motilidade bacteriana após exposição aos MWCNT-COOH

Para a avaliação dos resultados foi realizada a contagem de UFC/mL do conteúdo recuperado do poço central e do poço adjacente direito. Estes foram comparados para determinar a direção, ou tendência de movimentação adotada por *Rhizobium tropici* em relação aos poços. O controle foi caracterizado por conter salina no poço de inoculação e apenas meio YM no adjacente. Com base nas contagens de UFC/mL, as análises estatísticas demonstraram que não houve diferença significativa entre as médias dos valores de UFC/mL recuperados após 24h ($p > 0,05$), figura 18. Resultado do teste $t = 0,6120$ $p = 0,56$ com alfa 0,05.

Figura 18 Controle: Média de UFC/mL recuperados dos poços central e adjacente



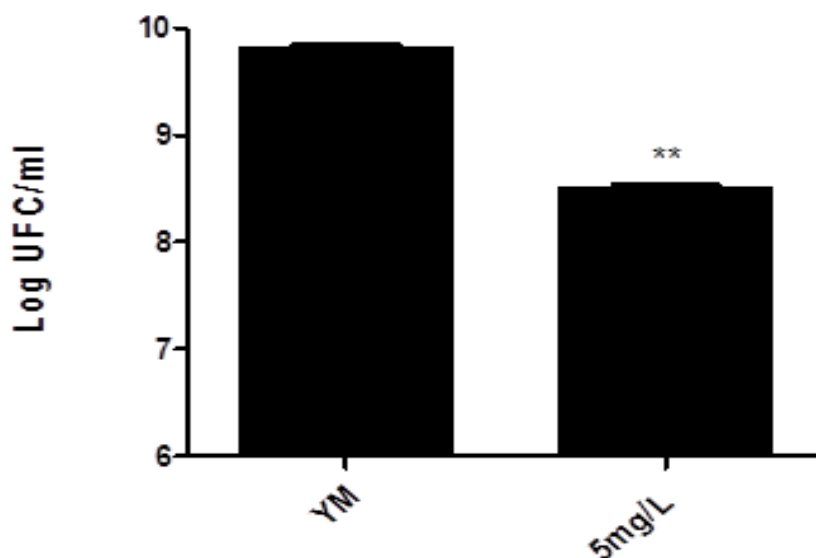
Legenda: Poço central (salina) e poço adjacente (Meio de Cultura YM). Ensaios realizados em triplicatas com 3 repetições.

Desta forma, é possível que o meio de cultura YM não tenha se apresentado como uma fonte atrativa para *R. tropici*, uma vez que a bactéria não se concentrou no poço contendo apenas meio YM. De acordo com Yang e

colaboradores (2015) as substâncias atrativas são aquelas que interagem com receptores na parede celular bacteriana, disparando uma rede de sinalização interna que desencadeia uma resposta de movimento em direção ao gradiente químico. No entanto, sugere-se que as bactérias estivessem movimentando-se de forma randômica entre a salina e o meio de cultura. Este comportamento pode ser explicado como movimento bacteriano aleatório, que segundo Adler & Dahl (1969) apresenta direção igualmente provável em todos os instantes. Ainda, de acordo com Taktikos, Stark e Zabudaerv (2013) a movimentação bacteriana aleatória ocorre naturalmente, até que haja mudança em sua trajetória pela presença de um agente químico com capacidade de atração, ou mesmo repulsão do micro-organismo.

Entretanto, para o tratamento 1 (Figura 19), quando avaliadas as contagens das médias de UFC/mL recuperadas do poço de inoculação contendo 5mg/L de MWCNT-COOH em salina e do adjacente contendo apenas meio de cultura, foi possível verificar que ocorreu migração das bactérias para o poço contendo meio de cultura.

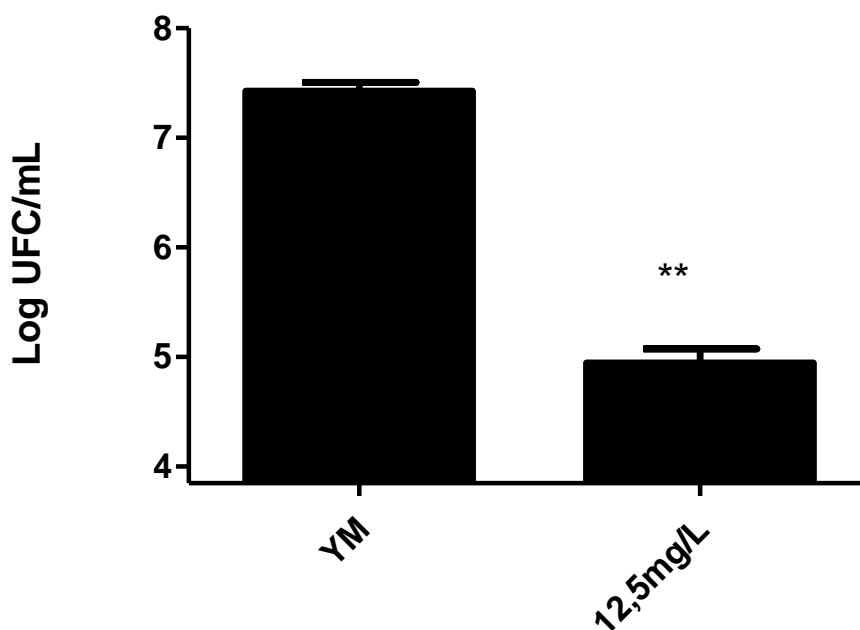
Figura 19 Tratamento 1: Média de UFC/mL recuperados dos poços central e adjacente após 24h



Legenda: Ensaios realizados em triplicatas, com 2 repetições. Poço de inoculação (NTC 5mg/L) e poço adjacente (Meio YM).

Após as análises estatísticas, foi verificado que houve diferença significativa entre as contagens dos poços ($p < 0,05$), evidenciando que as bactérias se concentraram no poço contendo meio de cultura.

Figura 20 Tratamento 2: Média de UFC/mL recuperados dos poços central e adjacente após 24h



De acordo com o tratamento 2 (figura 20), o poço contendo meio de cultura apresentou uma média de contagem bacteriana (UFC/mL) significativamente superior ao de inoculação preenchido com NTC [12,5mg/L] em salina. Resultado teste $t=4,932$; $p= 0,0079$ ($p < 0,05$).

A partir dos resultados encontrados nos tratamentos 1 e 2 que apresentaram nanotubos de carbono nos poços de inoculação, houve uma tendência significativa de migração de *R. tropici* para os poços contendo apenas meio de cultura. Isto indica que a presença dos MWCNT funcionalizados é capaz de interferir na motilidade da referida bactéria nas concentrações avaliadas.

Embora tenha sido demonstrado nos ensaios anteriores, que MWCNT-NF e funcionalizados não alteram a multiplicação de *R. tropici* nas concentrações de testadas 5mg/L, 7,5 mg/L, 12,5 mg/L 15mg/L e 20mg/L, esses materiais são capazes de afetar a motilidade da bactéria. Vale ressaltar que um dos fatores chave para a interação de *R. tropici* com a planta simbiote é o acesso à suas raízes por meio dos processos de quimiotaxia e motilidade.

Contudo, os resultados obtidos apontam para uma nova abordagem nos estudos nanoecotoxicológicos, tornando a motilidade um possível *endpoint* para avaliação dos efeitos dos nanomateriais nos organismos. Foi apontado no relatório da conferência *Science based support for regulation of Manufactured Nanomaterials* promovido pelo projeto ProSAFE e a OECD (2016), a necessidade do desenvolvimento de novos *endpoints*, que permitam a melhor compreensão dos efeitos dos nanomateriais nos ecossistemas. Uma vez que os parâmetros ecotoxicológicos clássicos não seriam os mais adequados para fornecer informações sobre todos os possíveis efeitos destes materiais nos ecossistemas.

6. CONCLUSÕES

Nanotubos de carbono de múltiplas paredes não funcionalizados nas concentrações de 5mg/L, 7,5mg/L, 12,5mg/L, 15mg/L e 20 mg/L em meio de cultura extrato de levedura e manitol, não alteraram a dinâmica de multiplicação de *R. tropici*. Isso foi observado quando as bactérias foram expostas também aos MWCNT-COOH.

No entanto, a presença de MWCNT-COOH interferiu na motilidade de *R. tropici* nas concentrações de 5mg/L e 12,5mg/L.

O presente trabalho aponta para uma nova linha de avaliação dos efeitos dos nanomateriais nos ambientes considerando a motilidade bacteriana.

Todavia, é preciso que haja o desenvolvimento de novos estudos que aumentem as informações sobre os mecanismos envolvidos na influência dos nanotubos de carbono na motilidade de *R. tropici*.

PERSPECTIVAS

Levantamento de novos ensaios que permitam elucidar os mecanismos envolvidos na motilidade bacteriana, tanto para *Rhizobium* spp. como para outros gêneros de importância ecológica e agrícola, em relação aos nanotubos de carbono.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR, M.M.et al. Chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli towards Flavonoid Inducers of the Symbiotic Nodulation Genes. **Journal of General Microbiology**. v.134, p. 2741 – 2746, 1988.

BARBOSA, F.R.; GONZAGA, A.C.G. Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na Região Central-Brasileira: p.2012-2014. Documentos 272. EMBRAPA. 2012.

BARUAH, S.; DUTTA, J. Nanotechnology applications in pollution sensing and degradation in agriculture. **Environmental Chemistry Letters**, v. 7, n. 3, p. 191–204, 2009.

BEYTH, N. et al. Alternative Antimicrobial Approach: Nano-Antimicrobial Materials. **Hindawi Publishing Corporation**. p.1-16. 2015.

BISWAS, P.; WU, C.-Y. Nanoparticles and the Environment. **Journal of the Air & Waste Management Association**, v. 55, n. 6, p. 708–746, 2005. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10473289.2005.10464656>>. Acesso em: 10 mar. 2016.

BLOOM, A. Nutrição Mineral. In: Artmed (Ed.); **Fisiologia Vegetal**. 3ª ed. Porto Alegre, p.96–114, 2006.

BOCCHI, S.; MALGIOGLIO, A. Azolla-Anabaena as a Biofertilizer for Rice Paddy Fields in the Po Valley, a Temperate Rice Area in Northern Italy. **International Journal of Agronomy**, p.5, 2010.

BOOTH, A.; JENSEN, A.K. Protocol for producing reproducible dispersions of manufactured nanomaterials in environmental exposure media. **NANOREG**. 2015.

BRADY, N.C. NEIL, R, R. Organismos e ecologia do solo. IN: **Elementos da Natureza e Propriedades dos Solos**. 3ed. Porto Alegre. Bookman, p. 386-387, 2008.

BRADY, N.C. NEIL, R, R. Ciclagem de nutrientes e fertilidade do solo. IN: **Elementos da Natureza e Propriedades dos Solos**. 3ed. Porto Alegre. Bookman. p. 437, 2013.

BRASIL. Instrução Normativa Nº13 de 24 de março de 2011. **Normas sobre Especificações, Garantias, Registro, Embalagem e Rotulagem dos Inoculantes destinados à Agricultura**. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/barreirastecnicas/pontofocal/.%5Cpontofocal%5Ctextos%5Cregulamentos%5CBRA_347_ADD_1.pdf> Acesso em: 27 mai.2016.

CAI, W. et al. Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnology. **Nanotechnol Sci App**. p.1-15, 2008.

CAIRES, A. J.; VAZ, R. P.; FANTINI, C.; LADEIRA, L. O. Highly sensitive and simple SERS substrate based on photochemically generated carbon nanotubes-gold nanorods hybrids. **Journal of Colloid and Interface Science**. p.18, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2015.04.071>>. Acesso em: 26, mai. 2015

CASANOVA, M.C.R. **Síntese, caracterização e estudo da estabilidade de nanopartículas metálicas estabilizadas com polifenóis e tióis**. Dissertação (Mestrado em Ciências - Química Analítica) Instituto de Química de São Carlos. Universidade de São Paulo. São Carlos, 2010.

CASTELLANE, C. et al. Characterization of new exopolysaccharide production by *Rhizobium tropici* during growth on hidrocarbon substrate. **International Journal of Macromolecules**. v. 96.p. 361-369, 2017.

CERRILLO, C.et al. Standard Operating Procedure: Toxicity Test with Microalgae *Pseudokirchneriella Subcapitata* for NANoREG core nanomaterials. **NANOREG**. 2015.

CLÉMENT B. Assessment of Sediment Ecotoxicity And Genotoxicity in Freshwater Laboratory Microcosms. **Ecotoxicology**. v.12, p. 323–333, 2004.

CHATTERJEE, S. et al. Effect of iron oxide and gold nanoparticles on bacterial growth leading towards biological application. **Journal of Nanobiothecnology**. v.9, 2011.

CHEN, X. SCHLUESENER, H. J. Nanosilver: A nanoproduct in medical application. **Toxicology Letters**.v.176, p.1-12, 2008.

CHEN, H. et al. Broad-Spectrum Antibacterial Activity of Carbon Nanotubes to Human Gut Bacteria. **Small**. v. 9, n. 16, p.2735–2746, 2013.

CHOW, J. C., et al. Nanoparticles and the Environment Nanoparticles and the Environment. **Journal of the Air & Waste Management Association**, v. 2247, 2012.

CHUIKO, N.V., ANTONYUK, T.S., KURDISH, I.K. The Chemotactic Response of Bradyrhizobium japonicum to Various Organic Compounds. **Microbiology**., v.71., n.4., p. 391-396, 2002.

CORDEIRO, L. Fixação de Nitrogênio.IN: KERBAUY, G.B.(Ed.) **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro. Ed. Guanabara Koogan S.A. p.76-96. 2008.

COSTA, P. M. et al. Functionalised carbon nanotubes: From intracellular uptake and cell-related toxicity to systemic brain delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 241, p.200-219, 2016.

DE ROSA M.C., Monreal C, Schnitzer M., Walsh R., Sultan Y. **Nanotechnology In Fertilizers. Nature Nanotechnology** v. 5, n.91, 2010.

DE VOLDER, M. F. L. De; Tawfick, S. H.; Baughman, R. H.; Hart, A. J. Carbon Nanotubes: Present and Future Commercial Applications. **Science**.vol.339, p.535-539, 2013.

DONG L., Anderson A. Field C. Antimicrobial Activity of Single-Walled Carbon Nanotubes Suspended in Different Surfactants. **Journal of Nanotechnology**. v.2012, p.1-7, 2011.

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

DOBEREINER, J. **A importância da fixação biológica de nitrogênio para a agricultura sustentável**. Seropédica. (EMBRAPA-CNPAB). Rio de Janeiro.p.2,1997.

DUARTE, E.R. **Microbiologia básica para ciências agrárias**. Montes Claros :Instituto de Ciências Agrárias da UFMG.p.130, 2011.

*EUROPEAN COMMISSION. **Comitition Recommendation on the definition of nanomaterial***. (2011/696/EU). 18 out. 2011.

Disponível em:
<http://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/faq/definition_en.htm>
Acesso em: 04 jun. 2016.

FEI, R. et.al. Relações entre lixiviação de nitrato e produção de biomassa do milho com dejetos suínos provenientes de diferentes tratamentos. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**. v.5, n.:2, p.212- 218, 2010.

FERNANDES, F.M. **Síntese de nanotubos de carbono orientados e aplicação na produção de pontas AFM**. 2008 f. 83. Dissertação (Mestrado em Ciências) Instituto de Física. Universidade de São Paulo. São Paulo. 2008.

GAGE, D. J. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, v. 68, n. 2, p. 280–300, 2004. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=419923&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 10 mai. 2016.

GAULKE, L. S.; HENRY, C. L.; BROWN, S. L. Nitrogen Fixation and Growth Response of *Alnus rubra* Amended with Low and High Metal content Biosoil. **Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.)**, n.4, v.63. p. 351–360, 2006.

GAWORZEWSKA E.T.; CARLILE, M.J. Positive Chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* and other Bacteria towards Root Exudates from Legumes and other Plants. **Journal of General Microbiology**. v.128, p.1179-1 188.1982.

GHORMADE, V.; DESHPANDE, M. V; PAKNIKAR, K. M. Perspectives for nano-biotechnology enabled protection and nutrition of plants. **Biotechnology advances**, v. 29, n. 6, p. 792–803, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975011000838>>. Acesso em :07 jan. 2016.

GOTZ, R. et al. Motility and Chemotaxis in Two Strains of *Rhizobium* with Complex Flagella. **Journal of General Microbiology**.v.128, p.789-798, 1981.

GRAHAM, P. H.; FERREY, L.; HAMMER, E.; AARONS, R. Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR1899I. *Can.J.Microbiol.*v.40, p.198-207, 1991.

IJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. **Nature**, v. 354, n. 6348, p. 56–58, 1991.

JACKSON, P. et. Al. Bioaccumulation and ecotoxicity of carbon Nanotubes. **Chemistry Central Journal**. Copenhagen. v.7, p. 1-21, 2013.

JONER, E.; HARTNIK, T.; AMUNDSEN, C. **Environmental fate and ecotoxicity of engineered nanoparticles**. 2007.

KAHRU A., Dubourguier H.C. From ecotoxicology to nanoecotoxicology. **Toxicology**. v. 269, p. 105-119, 2010.

KANG, S. et al. Physicochemical Determinants of Multiwalled Carbon Nanotube Bacterial Cytotoxicity. **Environ. Sci. Technol.** v.42, p.7528–7534, 2008.

KURDISH, I.K., ANTONYUK, T.S, CHUIKO, N. V. Influence of Environmental Factors on the Chemotaxis of *Bradyrhizobium japonicum*. **Microbiology**.v.70, n. 1, p. 91-95, 2001.

KERFAHI D. et al. Effects of Functionalized and Raw Multi-Walled Carbon Nanotubes on Soil Bacterial Community Composition. **Plos One**.v.10, n.3. 2015.

KHODAKOVSKAYA M.V. et al. Carbon Nanotubes Induce Growth Enhancement of Tobacco Cells. **American Chemical Society Nano**.v.6, n..3, p.2128 - 2135, 2012.

LABOISSIÈRE, P. CONAB:Safra de grãos 2016/2017 deve chegar a 227,9 milhões de toneladas. Agência Brasil. Brasília. 11 abr 2017. Economia. Disponível em: <<http://agenciabrasil.ebc.com.br/economia/noticia/2017-04/conab-safra-de-graos-20162017-deve-chegar-2279-milhoes-de-toneladas> > Acesso em: 22/10/2017.

LAHIANI, M. et al. Impact of Carbon Nanotube Exposure to Seeds of Valuable Crops. **ACS Appl. Mater. Interfaces**. v.5, n.16. 2013.

LEMOS, G. B. et.al. Atividade das Enzimas de Assimilação do Nitrogênio em Plantas Jovens de Seringueira Cultivadas com Diferentes Relações de Nitrato e Amônio. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. v. 11, n. 2, p. 113–118, 1999.

MADINGAN, M. et al. Estrutura e função celular em Bactéria e Archea. IN: **Microbiologia de Brock**. Porto Alegre. 12ª ed. Artmed. 2009. Cap 4. p. 68-106.

MARTINS, L.M.V. NEVES, M.C.P., RUMJANEK, N.G. Growth characteristics and symbiotic efficiency of rhizobia isolated from cowpea nodules of northeast of Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.29, n. 5-6, p.1005-1010.1997.

MERCANTE, F; FRANCO, A.A. Expressão dos Genes nod de *Rhizobium tropici*, *R. etli* E *R. leguminosa rum* bv. *phaseoli* e estabelecimento da nodulação do feijoeiro na presença de exudatos de sementes *Mimosa flocculosa* e *Leucaena leucocephala*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**.v.24, p.301-310, 2000.

NATIONAL INSTITUTE FOR PUBLIC HEALTH AND ENVIRONMENTAL IN THE NETHERLANDS. **Nanoreg Results repository**. 2017.

Disponível em: < <https://www.rivm.nl/en/about-rivm/mission-and-strategy/international-affairs/international-projects/nanoreg> > Acesso em: 01-04-2019

NELSON, M. S.; SADOWSKY, M. J. Secretion systems and signal exchange between nitrogen-fixing rhizobia and legumes. **Frontiers in plant science**, v. 6, p. 491, 2015. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2015.00491/abstract>>. Acesso em :4 fev. 2016.

OLIVEIRA et al. Nanotubos de carbono aplicados às neurociências: perspectivas e desafios Carbon nanotubes applied in neuroscience: prospects and challenges. **Rev Psiq Clín**. v. 38, n.5, p. 201-206, 2011.

OLIVEIRA.S.F. et al. Enzymatic extract containing lignin peroxidase immobilized on carbon nanotubes: Potential biocatalyst in dye decolourization. **Saudi Journal of Biologic Sciences**. p.9. 2016.

PASCHOALINO, M.P.; MARCONE, G.P.S; JARDIM, W.F. Os nanomateriais e a questão ambiental. **Química Nova**. v.33.n. 2. p. 421-430. 2010

PRASEK J. et al. Methods for carbon nanotubes synthesis – review. **J. Mater. Chem.**, v. 21, p. 15872–15884 .2011.

PRASEK J. et al. CHEMICAL VAPOR DEPOSITIONS FOR CARBON NANOTUBES SYNTHESIS. **Nova Science Publishers**, Inc. IN: cap.:6 Carbon Nanotubes. 2013

PULSKAMP K. Carbon Nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants. **Toxicology Letters**. v. 168, p. 58-74, 2007.

RATNIKOVA T. Tomato Seed Coat Permeability to Selected Carbon Nanomaterials and Enhancement of Germination and Seedling Growth. **The Scientific World Journal**. p.1-9, 2015.

RICKELEFS, R. Coevolução e Mutualismo. **A Economia da Natureza**. 5ª ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 2001. Cap. 20. p. 353-367.

ROBLEDO, M. et al. Rhizobium cellulase CelC2 is essential for primary symbiotic infection of legume host roots. **PNAS**. vol. 105.no.19. p.7064-7069.2008.

RODRIGUES, J. G. **Caracterização por Espectroscopia de Fotoelétrons de Nanotubos Funcionalizados**. 2011.120f.Dissertação (Mestrado em Ciências - Física.) Instituto de Ciências Exatas. Universidade Federal de Minas Gerais. Minas Gerais .2011.

RUIZ, O. et al. Graphene oxide : Nanspecific Enhancer of Cellular Gowth. **ACS Nano**. v.5, n.10, p. 8100-8107 2011

SANTOS, L.A.; REIS, V.M. **A Formação do Nódulo em Leguminosas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia. (Embrapa- CNPAB. Documentos,251). Rio de Janeiro. p. 14. 2008.

SCIENTIFIC CONFERENCE: Science based support for regulation of Manufactured Nanomaterials. ProSafe Project, OECD, Paris, p. 1-84, 2016. Disponível em: <oe.cd.org> Acesso em : 24 abr 2019.

SCENIHR - Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks –. Public Health- Nanotechnology. European Commission . 2006 Disponível em: http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/opinions_layman/en/nanotechnologies/index.htm > Acesso em: 18 abril de 2019.

SEETHARAMAPPA, J.; YELLAPPA, S.; D'SOUZA, F. Carbon Nanotubes: next generation of electronic materials. **The Electrochemical Society Interface**, p. 23–26, 2006.

SERRATO, R.V. **Caracterização Química e Estrutural de Exopolissacarídeos e Lipopolissacarídeos Produzidos por Bactérias Diazotróficas Endofíticas**. Tese (Doutorado em Ciências -Bioquímica) Departamento de Bioquímica e Biologia Celular- Universidade Federal do Paraná. 2008.

SILVA, E, E. **Síntese e aplicação de nanotubos de carbono em Biotecnologia**. 2007. 198f. Tese (Doutorado em Física) Instituto de Ciências Exatas- Universidade federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.2007.

SINGH, R. et al. Binding and condensation of plasmid DNA onto functionalized carbon nanotubes: toward the construction of nanotube-based gene delivery vectors. **Journal American Chemical Society**. 127 (12), p.4388- 4396, 2005.

SINGH, A; RUPALI, G. RAKESH, PANDEI. Rice Seed Priming with Picomolar Rutin Enhances Rhizospheric *Bacillus subtilis* CIM Colonization and Plant Growth.**Journal Plos One**.p.1-17, 2016.

SCHIRMER, K.; AUFFAN, M. Nanotoxicology in the environment. **Environmental Science Nano Journal**.v.2, p.561-563, 2015.

SOUZA, V.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática :Guia Ilustrado para Identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil**, baseado em APG II. Instituto Plantarum: Nova Odessa.p.485.2008

TAKTIKOS, J.; STARK, H.; ZABURDAEV, V. How the Motility Pattern of Bacteria Affects Their Dispersal and Chemotaxis. **Plos One**. v. 8, n. 12. p. 1-8. 2013.

TEUNENBROEK, T. V., BAKER J., DIJKZEUL, A. Towards a more effective and efficient governance and regulation of nanomaterial. **Particle and Fibre Toxicology**. v. 14. n. 54. 2017.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**.10^a ed. Porto Alegre. Artmed.2012.

TOWNSEND, C.R.; BEGON, M., HARPER, J.L. Ecologia Evolutiva. **Fundamentos em Ecologia**. 3^a ed. Porto Alegre. Artmed. 2010. Cap. 8, p.286-302.

TRUHAUT, R. Ecotoxicology: Objectives, principles and perspectives. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v.1, p.151-173, 1977.

TSO W. e ADLER J. Negative Chemotaxis in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**. v. 118, n., 2 p. 560-576, 1974.

THUL, S. T. et al. Nanotechnology in Agroecosystem: Implications on Plant Productivity and its Soil Environment. **Expert Opinion on Environmental Biology**. 2013.

UDVARDI, M.; POOLE, P. S. Transport and Metabolism in Legume-Rhizobia Symbioses. **Annual Review of Plant Biology**. p.781-805, 2013.

VIANA, C.O., et.al. Physiological Changes of the Lichen *Parmotrema tinctorum* as result of Carbon Nanotubes Exposition. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v.120. p.110-116,2015.

VINCENT, J.M. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific Publications. (International Biological Programme Handbook, 15) 1970.

WADHAMS G. H.; ARMITAGE, J. P. Making sense of it all: Bacterial Chemotaxis. **Nature**. v. 5, p.1024 – 1036, 2004.

WEIL, Jhonn & Sons. **Fundamentos da Ciência e Engenharia de Materiais: uma abordagem integrada**. 2 ed. Rio de Janeiro. LTC, 2006, p.102.

YANG, Y. Relation between chemotaxis and consumption of amino acids in bacteria. **Molecular Microbiology**. v. 96, n. 6, p. 1272–1282, 2015.

YANG, F. et al. Effects of Multi- Walled carbono nanotubes with various diameters on bacterial cellular membranes: Cytotoxicity and adaptive mechanisms. **Chemosfere**. v. 185, p. 162 – 170, 2017.

YUAN, Z. et al. Novel impacts of functionalized multi-walled carbon nanotubes in plants: promotion of nodulation and nitrogenase activity in the rhizobium-legume system. **Nanoscale**. v.9. p. 9921–9937. 2017.

ZAHRAN, H. H. Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, v. 63, n. 4, p. 968–989, 1999.

APÊNDICE

A seguir são descritos os valores das taxas de crescimento, número de geração e tempos de geração calculados para os ensaios de contagem padrão em placas (UFC/mL). Foram diferenciados os dados obtidos para a exposição de MWCNT-NF e MWCNT-COOH.

Tabela 2 Taxa de crescimento de *Rhizobium tropici* expostos aos MWCNT – NF

Tempo (h)	Controle	5mg/L	7,5mg/L	12 mg/L	15mg/L	20mg/L
0-24	0,399046783	0,388366248	0,368263467	0,362699659	0,399516938	0,367711582
0-48	0,201233928	0,196784468	0,221184113	0,199549564	0,206602304	0,198400264

Tabela 3 Taxa de crescimento de *Rhizobium tropici* expostos aos MWCNT-COOH

Tempo (h)	Controle	5mg/L	7,5mg/L	12 mg/L	15mg/L	20mg/L
0-24	0,39904678 3	0,391970566	0,333598649	0,377852491	0,391643401	0,393955429
0-48	0,20123392 8	0,187479818	0,195581163	0,196356974	0,21090903	0,232522872

Tabela 4 Comparação entre o tempo de geração para tratamentos com MWCNT-COOH. C: Controle. Concentrações em mg/L

Tempo (h)	Concentração (mg/L)					
	Controle	5	7,5	12	15	20
0-24	1,7	1,8	2,1	1,8	1,77	1,76
0-48	3,4	3,7	3,5	3,5	3,29	2,98
0-68	5,1	4,7	4,7	4,7	4,71	4,71
0-75	5,3	5,1	5,3	5,3	5,05	5,4
0-96	8,6	8,3	8,3	8	8,27	7,84

Tabela 5 Comparação entre o tempo de geração para tratamentos com MWCNT-NF. C: Controle. Concentrações em mg/L

Tempo (h)	Concentração (mg/L)					
	Controle	5	7,5	12,5	15	20
0-24	1,74	1,78	1,88	1,91	1,73	1,89
0-48	3,44	3,52	3,13	3,47	3,35	3,49
0-68	5,06	5,15	4,99	4,77	5,02	4,96

Tabela 6 Comparação do número de gerações para tratamentos com MWCNT-NF

Tempo (h)	Concentração mg/L					
	Controle	5	7,5	12	15	20
24	13,816	13,447	12,751	12,558	13,833	12,731
48	13,935	13,627	15,316	13,818	14,307	13,739
68	13,445	13,210	13,619	14,262	13,537	13,710

Tabela 7 Comparação do número de gerações para tratamentos com MWCNT-COOH

Tempo (h)	Concentração (mg/L)					
	Controle	5	7,5	12,5	15	20
24	13,816	13,571	11,550	13,083	13,560	13,640
48	13,935	12,982	13,543	13,597	14,605	16,102
68	13,445	14,373	14,415	14,480	14,434	14,433
75	14,251	14,650	14,228	14,241	14,849	13,895
96	11,233	11,628	11,550	12,042	11,603	12,245

ANEXO

1. Protocolo: Meio de Cultura 79 (Vincent ,1970)

Procedimento

10 g de Açúcar Cristal ou Manitol

- 1 ml de solução de Fosfato de Potássio Dibásico a 10% P/V
- 4 ml de solução de Fosfato de Potássio Monobásico 10% P/V
- 2 ml de solução de Sulfato de Magnésio Heptahidratado 10% P/V
- 1 ml de solução de Cloreto de Sódio 10% P/V
- 0,4 g Extrato de Levedura ou 100 ml de Extrato Líquido de Levedura
- 5 ml de Solução de Azul de Bromotimol a 0,5 % em 0,2 N de KOH P/V

Ajustar o pH para 6,8-7,0 com solução de KOH a 10% e/ou H₂ SO₄ a 5%,

Para meio sólido adicionar 15 g de ágar por litro de solução.

- Substituir o azul de bromotimol por vermelho congo solução 0,25 % , usando 10 ml desta solução por litro de meio de cultura.