



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

JACKSON SEITI GUNDI

**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES LÍQUIDAS DE  
INOCULANTES CONTENDO *Rhizobium* spp. PARA A  
CULTURA DO FEIJOEIRO**

---

Londrina  
2016

JACKSON SEITI GUNDI

**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES LÍQUIDAS DE  
INOCULANTES CONTENDO *Rhizobium* spp. PARA A  
CULTURA DO FEIJOEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Mariangela Hungria

Londrina  
2016

JACKSON SEITI GUNDI

**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES LÍQUIDAS DE  
INOCULANTES CONTENDO *Rhizobium* spp. PARA A CULTURA DO  
FEIJOEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Dra. Mariangela Hungria  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária –  
EMBRAPA

---

Dr. Ricardo Silva Araujo  
Total Biotecnologia Indústria e Comércio S. A.

---

Dr. Douglas Fabiano Gomes  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 05 de abril de 2016.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por permitir que ao longo de 26 anos, durante inúmeros momentos positivos ou negativos pudesse aprender sobre a vida, sempre ter esperanças e viver feliz.

A todos os meus familiares, principalmente meus pais, Noriko e João Gundi por sempre acreditarem em mim e oferecerem todo o suporte.

À minha orientadora, Mariangela Hungria, por toda a confiança depositada, amizade e a quem tenho eterna gratidão. Muito obrigado por ter me apresentado e inserido na área de inoculantes, mesmo não possuindo experiência anterior: da oportunidade de bolsa DTI-C em 2013 à orientação no mestrado e indicação na iniciativa privada. Foi um privilégio poder atuar no laboratório de uma profissional tão renomada, exemplo de pessoa que inspira a todos por sua competência e história de vida, além de nos contagiar com seu otimismo e bom humor.

A todos os colegas e funcionários do Laboratório de Biotecnologia do Solo, em especial à Esp. Eduara Ferreira, por todo o conhecimento sobre a análise da qualidade de inoculantes que me foi passado e à Dona Rosa por toda a ajuda prestada.

Ao Dr. Renan Augusto Ribeiro e ao Dr. André Luiz Martinez de Oliveira, pela contribuição para a melhoria do presente trabalho, ao terem participado da banca de qualificação.

Aos membros da Banca de Defesa: Dr. Ricardo Silva Araujo e Dr. Douglas Fabiano Gomes pela disponibilidade e contribuição para a melhoria do presente trabalho.

À minha namorada Audrey Hanae, por toda a paciência, companheirismo e confiança que sempre me foram depositados.

Ao meu amigo Leonardo Yukio Sudo, pela amizade e todos os ensinamentos.

Ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, pela contribuição na formação profissional.

À Embrapa Soja, por disponibilizar a infraestrutura, materiais e permitir a realização da presente dissertação de mestrado.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de mestrado.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho deixo meu “Muito Obrigado”.

GUNDI, Jackson Seiti. **Desenvolvimento de formulações líquidas de inoculantes contendo *Rhizobium* spp. para a cultura do feijoeiro**. 2016. 84f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2016.

## RESUMO

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivado em vários países, representa a principal fonte de proteínas para grande parte da população brasileira. A produtividade média do feijoeiro pode ultrapassar 3500 kg ha<sup>-1</sup> e, devido ao alto conteúdo proteico presente nas sementes, seu cultivo exige grandes quantidades de nitrogênio. Práticas agrícolas convencionais, adotadas na cultura do feijoeiro, empregam fertilizantes químicos nitrogenados que podem levar à contaminação de rios e águas subterrâneas por nitratos. A simbiose entre bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas e plantas leguminosas, conduz à formação de nódulos radiculares, onde ocorre o processo de fixação biológica de nitrogênio atmosférico, resultando em contribuições relevantes para a agricultura e para a sustentabilidade do planeta. Na agricultura, as bactérias fixadoras de nitrogênio são empregadas na forma de inoculantes. A preferência dos agricultores se dá pelas formulações líquidas, pela facilidade de aplicação, no entanto, neste suporte observa-se uma acentuada redução do número de células viáveis de *Rhizobium* ao longo do período de armazenamento. O objetivo do presente trabalho foi desenvolver uma formulação líquida de inoculante com *Rhizobium* para a cultura do feijoeiro, com altas concentrações celulares e com a manutenção da viabilidade celular mínima exigida pelo MAPA (1,0E+09 UFC mL<sup>-1</sup>) após o armazenamento. Os estudos foram conduzidos com as estirpes *Rhizobium tropici* CIAT 899 (=SEMIA 4077) e *Rhizobium freirei* PRF 81 (=SEMIA 4080), autorizadas pelo MAPA para o uso em inoculantes comerciais para essa leguminosa. Inicialmente foram avaliadas diferentes fontes de carbono em substituição ao manitol presente no meio extrato de levedura-manitol (YM, *yeast extract mannitol*), considerado referência como fonte de carbono. Foi empregada a metodologia de superfície de resposta (MSR) na tentativa de otimizar as concentrações de sacarose, extrato de levedura e fosfato de potássio dibásico, partindo-se do meio YSac (extrato de levedura-sacarose) para a obtenção de altas concentrações celulares. Em sequência, experimentos para a comparação entre médias foram conduzidos para a otimização das concentrações dos mesmos componentes já analisados pela MSR e a formulação obtida foi avaliada em escala semipiloto em relação à concentração e viabilidade celular após o armazenamento. Fosfato de potássio monobásico, solução de micronutrientes, condicionador orgânico de solo, carboximetilcelulose (CMC) e polivinilpirrolidona (PVP) também foram avaliados em relação à concentração e viabilidade celular após o armazenamento. Foi utilizado o método de gotejamento para a estimativa da concentração de células viáveis. O teste de Hartley foi utilizado para a verificação da homogeneidade de variâncias com  $p \leq 0,05$ ; e o teste de Tukey para comparação entre os valores médios de concentrações celulares obtidos com as diferentes formulações com  $p \leq 0,05$ . Foi desenvolvida uma formulação básica de inoculante líquido contendo *Rhizobium tropici* CIAT 899, FORM, que permitiu a obtenção de altas concentrações celulares em escala semipiloto ( $1,28E+10 \pm 2,52E+09$  UFC mL<sup>-1</sup>), contudo, apresentou acentuada redução celular durante o armazenamento. PVP 0,5 % e CMC 1 % mostraram-se eficientes protetores celulares em meio FORM, permitindo aumentos na sobrevivência de 2,93 e 3,10 vezes, respectivamente, durante 28 dias de armazenamento e a utilização de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,45 g L<sup>-1</sup> em meio FORM contribuiu para um incremento de oito vezes na viabilidade celular. A formulação básica, bem como os demais dados obtidos, servirão como base para o aprimoramento e o desenvolvimento de uma nova formulação líquida inoculante para a cultura do feijoeiro.

**Palavras-chave:** Inoculante. Feijão comum. *Rhizobium*.

GUNDI, Jackson Seiti. **Development of liquid inoculants formulations containing *Rhizobium* spp. for the common bean crop.** 2016. 84p. Dissertation (Master's Degree in Biotechnology) – State University of Londrina, Londrina. 2016.

## ABSTRACT

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivated in many countries, represents the main source of protein for great part of the Brazilian population. The average common bean yield may exceed 3,500 kg ha<sup>-1</sup> and due to the high content of protein in the grains, the crop requires large amounts of nitrogen. Conventional farming practices adopted with the common bean crop employ chemical nitrogen fertilizers that can lead to contamination of rivers and groundwater by nitrates. The association between nitrogen-fixing nodulating bacteria and leguminous plants leads to the formation of root nodules, where the biological fixation of atmospheric nitrogen occurs, resulting in an outstanding contribution to agriculture and to the planet sustainability. In agriculture, the nitrogen-fixing bacteria are applied as inoculants. Farmers prefer liquid formulations due to the facility of application; however, in this support there is a marked reduction in the number of viable cells of *Rhizobium* throughout the storage period. The aim of this study was to develop inoculant liquid formulations containing *Rhizobium* for the common bean crop with high cell concentrations and maintenance of the MAPA requires cell numbers (1,0E+09 CFU mL<sup>-1</sup>) after storage. The studies were performed with strains *Rhizobium tropici* CIAT 899 (=SEMIA 4077) and *Rhizobium freirei* PRF 81 (=SEMIA 4080), authorized for use in commercial inoculants in Brazil. Initially, different carbon sources were evaluated aiming to replace the mannitol that composes the YM (yeast extract mannitol) medium, and which is considered reference as carbon source. The response surface methodology (RSM) was used in an attempt to optimize the concentrations of sucrose, yeast extract and dibasic potassium phosphate starting from the YSac medium (yeast extract sucrose) for obtaining high cell concentrations. Following, experiments for the comparison of means were performed to optimize the concentrations of the same components already analyzed by the RSM method and the formulation obtained was evaluated in semi-pilot scale in relation to the concentration and cell viability during storage. Effects of monobasic potassium phosphate, micronutrient solutions, organic soil conditioner, carboxymethylcellulose (CMC) and polyvinylpyrrolidone (PVP) on cell concentration and viability during storage were also evaluated. The drop method was employed for estimating the concentration of viable cells. The Hartley's test was applied to verify the homogeneity of variance with  $p \leq 0.05$ ; and Tukey's test to compare the averages of formulations with  $p \leq 0.05$ . A basic formulation of inoculant was developed for *Rhizobium tropici* CIAT 899, FORM, which allowed to reach high cell concentrations in semi-pilot scale ( $1,28E+10 \pm 2,52E+09$  CFU mL<sup>-1</sup>), but showed marked cell number reduction during storage. PVP 0.5% and CMC 1% were effective in cell protection in the FORM medium, allowing increases in survival of 2.93 and 3.10 times, respectively, during 28 days of storage and the use of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.45 g L<sup>-1</sup> in the FORM medium contributed to an 8-fold increase in cell viability. The basic formulation, as well as all other data obtained, will be useful as a basis for the improvement and development of a new liquid inoculant formulation for the common bean crop.

**Keywords:** Inoculant. Common bean. *Rhizobium*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1 -</b>	Curva de crescimento de <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 em meio YSac obtida durante 134 horas de incubação a 28 °C e 180 rpm. Onde: UFC mL <sup>-1</sup> - unidades formadoras de colônia por mililitro, D.O. 600nm - densidade óptica a 600nm.....	50
<b>Figura 2 -</b>	Curva de crescimento de <i>Rhizobium freirei</i> PRF 81 em meio YSac obtida durante 168 horas de incubação a 28 °C e 180 rpm. Onde: UFC mL <sup>-1</sup> - unidades formadoras de colônia por mililitro, D.O. 600nm - densidade óptica a 600nm .....	52
<b>Figura 3 -</b>	Superfície de resposta para o planejamento fatorial 2 <sup>3</sup> com três pontos centrais (experimento C).....	58
<b>Figura 4 -</b>	Curvas de níveis do terceiro planejamento fatorial 2 <sup>3</sup> com três pontos centrais (experimento C). .....	59
<b>Figura 5 -</b>	Gráfico dos valores experimentais contra valores previstos para o modelo no planejamento fatorial 2 <sup>3</sup> com três pontos centrais (experimento C).....	59

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 -</b>	Exemplo de planejamento composto central ( $2^3$ ) com a análise de três fatores com dois níveis cada. O planejamento conta com oito pontos fatoriais, cinco pontos centrais e seis pontos axiais.....	32
<b>Tabela 2 -</b>	Planejamento fatorial $2^3$ (experimento A) com três pontos centrais para o desenvolvimento de formulações líquidas inoculantes contendo <i>Rhizobium</i> spp. para a cultura do feijoeiro. C – fonte de carbono (sacarose), N – fonte de nitrogênio (extrato de levedura) e P – fonte de fósforo (fosfato de potássio dibásico).....	39
<b>Tabela 3 -</b>	Planejamento fatorial $2^3$ (experimento B) com três pontos centrais para o desenvolvimento de formulações líquidas inoculantes contendo <i>Rhizobium</i> spp. para a cultura do feijoeiro. C – fonte de carbono (sacarose), N – fonte de nitrogênio (extrato de levedura) e P – fonte de fósforo (fosfato de potássio dibásico).....	39
<b>Tabela 4 -</b>	Planejamento fatorial $2^3$ (experimento C) com três pontos centrais para o desenvolvimento de formulações líquidas inoculantes contendo <i>Rhizobium</i> spp. para a cultura do feijoeiro. C – fonte de carbono (sacarose), N – fonte de nitrogênio (extrato de levedura) e P – fonte de fósforo (fosfato de potássio dibásico).....	40
<b>Tabela 5 -</b>	Avaliação de diferentes concentrações de extrato de levedura em meio YSac. ....	41
<b>Tabela 6 -</b>	Avaliação de diferentes concentrações de fosfato de potássio dibásico ( $K_2HPO_4$ ) em meio YSac modificado com extrato de levedura 5x (Ext. lev. 5x) correspondente a concentração de $2,0 \text{ g L}^{-1}$ .....	41
<b>Tabela 7 -</b>	Avaliação de diferentes concentrações de sacarose em meio YSac modificado com extrato de levedura 5x (Ext. lev. 5x), $2,0 \text{ g L}^{-1}$ , e fosfato de potássio dibásico ( $K_2HPO_4$ 2x), $1 \text{ g L}^{-1}$ . ....	42
<b>Tabela 8 -</b>	Avaliação de diferentes concentrações de fosfato de potássio monobásico ( $KH_2PO_4$ ) em meio FORM. ....	44
<b>Tabela 9 -</b>	Composição da solução de micronutrientes. ....	45
<b>Tabela 10 -</b>	Avaliação de diferentes concentrações da solução de micronutrientes (Sol. Micro.) em meio FORM. ....	45

<b>Tabela 11 -</b>	Avaliação de diferentes concentrações do condicionador orgânico de solo em meio FORM. ....	45
<b>Tabela 12 -</b>	Avaliação de diferentes concentrações de carboximetilcelulose (CMC) em meio FORM. ....	46
<b>Tabela 13 -</b>	Avaliação de diferentes concentrações de polivinilpirrolidona (PVP) em meio FORM. ....	46
<b>Tabela 14 -</b>	Concentração celular de <i>Rhizobium tropici</i> CIAT899 e <i>Rhizobium freirei</i> PRF 81 em diferentes fontes de carbono expresso em UFC mL <sup>-1</sup> . Avaliação realizada após 96 horas de crescimento.....	49
<b>Tabela 15 -</b>	Concentração celular, em UFC mL <sup>-1</sup> , para o planejamento fatorial 2 <sup>3</sup> (experimento A) com três pontos centrais. C – fonte de carbono (sacarose), N – fonte de nitrogênio (extrato de levedura) e P – fonte de fósforo (fosfato de potássio dibásico). Avaliação realizada após 72 horas de crescimento.....	54
<b>Tabela 16 -</b>	Coeficiente de regressão e valores de <i>p</i> para planejamento fatorial com pontos centrais (experimento A).....	55
<b>Tabela 17 -</b>	Concentração celular, em UFC mL <sup>-1</sup> , para o planejamento fatorial 2 <sup>3</sup> (experimento B) com três pontos centrais. C – fonte de carbono (sacarose), N – fonte de nitrogênio (extrato de levedura) e P – fonte de fósforo (fosfato de potássio dibásico). Avaliação realizada após 72 horas de crescimento .....	55
<b>Tabela 18 -</b>	Coeficiente de regressão e valores de <i>p</i> para o planejamento fatorial com pontos centrais (experimento B).....	56
<b>Tabela 19 -</b>	Concentração celular, em UFC mL <sup>-1</sup> , para o planejamento fatorial 2 <sup>3</sup> (experimento C) com três pontos centrais. C – fonte de carbono (sacarose), N – fonte de nitrogênio (extrato de levedura) e P – fonte de fósforo (fosfato de potássio dibásico). Avaliação realizada após 72 horas de crescimento .....	57
<b>Tabela 20 -</b>	Coeficiente de regressão e valores de <i>p</i> para o planejamento fatorial com pontos centrais (experimento C).....	57
<b>Tabela 21 -</b>	Concentração celular de <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 em resposta a diferentes concentrações de extrato de levedura em meio YSac.....	61
<b>Tabela 22 -</b>	Concentração celular de <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 em resposta a diferentes concentrações de fosfato de potássio dibásico (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	

	em meio YSac modificado com extrato de levedura 5x (Ext. lev. 5x), correspondente à concentração de 2,0 g L <sup>-1</sup> .....	62
<b>Tabela 23 -</b>	Concentração celular de <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 em resposta a diferentes concentrações de sacarose (Sac.) em meio YSac modificado com extrato de levedura 5x (Ext. lev. 5x), 2,0 g L <sup>-1</sup> , e fosfato de potássio dibásico (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2x), 1 g L <sup>-1</sup> .....	62
<b>Tabela 24 -</b>	Concentração celular de <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899, após incubação de 72 horas, e da viabilidade celular, após 28 dias de armazenamento, no meio de cultura FORM em comparação com YSac .....	64
<b>Tabela 25 -</b>	Concentração celular de <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899, produzido em escala semipiloto no meio FORM, e da viabilidade celular, após 26 dias de armazenamento em comparação aos resultados obtidos em agitador orbital.....	64
<b>Tabela 26 -</b>	Concentração celular de <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899, após incubação de 72 horas, e da viabilidade celular, após 28 dias de armazenamento, no meio FORM com concentrações variadas de fosfato de potássio monobásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ).....	66
<b>Tabela 27 -</b>	Concentração celular de <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899, após incubação de 72 horas, e da viabilidade celular, após 35 dias de armazenamento, no meio FORM com concentrações variadas de solução de micronutrientes (Sol. Micro.) .....	67
<b>Tabela 28 -</b>	Concentração celular de <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899, após incubação de 72 horas, e da viabilidade celular, após 35 dias de armazenamento, no meio FORM com concentrações variadas do condicionador orgânico de solo (cond. solo).....	68
<b>Tabela 29 -</b>	Concentração celular de <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899, após incubação de 72 horas, e da viabilidade celular, após 28 dias de armazenamento, no meio FORM com concentrações variadas de carboximetilcelulose (CMC). .....	69
<b>Tabela 30 -</b>	Concentração celular de <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899, após incubação de 72 horas, e da viabilidade celular, após 28 dias de armazenamento, no meio YSac com concentrações variadas de carboximetilcelulose (CMC). .....	69

<b>Tabela 31 -</b>	Concentração celular de <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899, após incubação de 72 horas, e da viabilidade celular, após 28 dias de armazenamento, no meio FORM com concentrações variadas de polivinilpirrolidona (PVP).....	70
<b>Tabela 32 -</b>	Concentração celular de <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899, após incubação de 72 horas, e da viabilidade celular, após 28 dias de armazenamento, no meio YSac com concentrações variadas de polivinilpirrolidona (PVP).....	70
<b>Tabela 33 -</b>	Concentração celular de <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899, produzido em escala semipiloto no meio YSac contendo PVP (5 g L <sup>-1</sup> ), e da viabilidade celular, após 30 dias de armazenamento em comparação aos resultados obtidos em agitador orbital. ....	71

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	17
2.1	FEIJOEIRO COMUM ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) .....	17
2.2	NITROGÊNIO .....	18
2.2.1	A Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN) .....	19
2.3	GÊNERO <i>RHIZOBIUM</i> .....	21
2.4	INOCULANTE .....	23
2.4.1	Seleção do Microrganismo .....	25
2.4.2	Suportes de Veiculação .....	27
2.4.3	Suporte Líquido .....	28
2.4.4	Características Fisiológicas de <i>Rhizobium</i> no Aumento da Qualidade do Inoculante.....	30
2.5	METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA .....	31
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	33
3.1	OBJETIVO GERAL .....	33
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	33
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	34
4.1	MICROORGANISMOS .....	34
4.1.1	Armazenamento, Preparo do Pré-inóculo e Condições de Cultivo de <i>Rhizobium</i> spp. ....	34
4.1.2	Avaliação da Concentração de Rizóbios em Placa pelo Método de Gotejamento .....	35
4.2	AVALIAÇÃO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO NO CRESCIMENTO DE <i>Rhizobium</i> spp. ....	36
4.3	CURVA DE CRESCIMENTO .....	36
4.4	DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES LÍQUIDAS INOCULANTES .....	38
4.4.1	Metodologia de Superfície de Resposta .....	38
4.4.1.1	MSR - Experimento A .....	38

4.4.1.2	MSR - Experimento B .....	39
4.4.1.3	MSR - Experimento C .....	40
4.4.2	Experimentos para Comparação entre Médias .....	40
4.4.2.1	Extrato de Levedura .....	41
4.4.2.2	Fosfato de Potássio Dibásico (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) .....	41
4.4.2.3	Sacarose .....	42
4.4.2.4	Avaliação da Viabilidade Celular da Formulação Desenvolvida (FORM) .....	42
4.4.2.5	Análise da Concentração e Viabilidade Celular de <i>Rhizobium tropici</i> Estirpe CIAT 899 em Meio de Cultivo FORM Produzido em Escala Semipiloto .....	43
4.4.3	Avaliação da Influência de Diferentes Componentes no Crescimento e Viabilidade Celular de <i>Rhizobium tropici</i> Estirpe CIAT 899 em Meio de Cultivo FORM .....	43
4.4.3.1	Fosfato de Potássio Monobásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) .....	44
4.4.3.2	Solução de Micronutrientes .....	44
4.4.3.3	Condicionador Orgânico de Solo .....	45
4.4.3.4	Carboximetilcelulose (CMC) .....	46
4.4.3.5	Polivinilpirrolidona (PVP) .....	46
4.4.3.6	Aferição da Concentração e Viabilidade Celular de <i>Rhizobium tropici</i> Estirpe CIAT 899 em Meio de Cultivo YSac contendo PVP (5 g L <sup>-1</sup> ) Produzido em Escala Semipiloto .....	47
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	47
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>49</b>
5.1	AVALIAÇÃO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO NO CRESCIMENTO DE <i>Rhizobium</i> spp. ....	49
5.2	CURVA DE CRESCIMENTO .....	50
5.2.1	<i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 .....	50
5.2.2	<i>Rhizobium freirei</i> PRF 81 .....	52
5.3	DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES LÍQUIDAS INOCULANTES .....	54
5.3.1	Metodologia de Superfície de Resposta .....	54
5.3.1.1	MSR - Experimento A .....	54
5.3.1.2	MSR - Experimento B .....	55

5.3.1.3	MSR - Experimento C.....	57
5.3.2	Experimentos para Comparação entre Médias .....	60
5.3.2.1	Extrato de Levedura .....	60
5.3.2.2	Fosfato de Potássio Dibásico ( $K_2HPO_4$ ) .....	61
5.3.2.3	Sacarose .....	62
5.3.2.4	Avaliação da Viabilidade Celular da Formulação Desenvolvida (FORM) .....	63
5.3.2.5	Análise da Concentração e Viabilidade Celular de <i>Rhizobium tropici</i> Estirpe CIAT 899 em Meio de Cultivo FORM Produzido em Escala Semipiloto.....	64
5.3.3	Avaliação da Influência de Diferentes Componentes no Crescimento e Viabilidade Celular de <i>Rhizobium tropici</i> Estirpe CIAT 899 em Meio de Cultivo FORM .....	65
5.3.3.1	Fosfato de Potássio Monobásico ( $KH_2PO_4$ ) .....	65
5.3.3.2	Solução de Micronutrientes .....	66
5.3.3.3	Condicionador Orgânico de Solo.....	67
5.3.3.4	Carboximetilcelulose (CMC) .....	68
5.3.3.5	Polivinilpirrolidona (PVP) .....	69
5.3.3.6	Aferição da Concentração e Viabilidade Celular de <i>Rhizobium tropici</i> Estirpe CIAT 899 em Meio de Cultivo YSac contendo PVP ( $5\text{ g L}^{-1}$ ) Produzido em Escala Semipiloto .....	71
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>73</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>74</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil está entre os maiores produtores mundiais de feijão e a cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) apresenta grande importância econômica e social para o país, verificada, em especial, pela quantidade de pequenos produtores e por representar a principal fonte proteica da dieta da população (MERCANTE et al., 1992). Segundo dados estimados da safra brasileira de grãos 2015/16, a área total do cultivo de feijoeiro no país será de 3,02 milhões de hectares, com produção de 3,33 milhões de toneladas, valor 7,1% maior que na safra anterior (CONAB, 2016).

O nutriente exigido em maior quantidade pela cultura do feijoeiro é o nitrogênio (N). Praticamente metade do N absorvido pelas plantas é exportado para os grãos (FAGERIA; BALIGAR, 2005). Fertilizantes químicos nitrogenados, fontes de N normalmente empregadas na agricultura, acarretam riscos de contaminação em rios e águas subterrâneas por nitratos, visto que perdas consideráveis do total de fertilizantes nitrogenados aplicados ao solo podem ocorrer pelos eventos de desnitrificação e lixiviação. Nesse contexto, uma das alternativas sustentáveis para o desenvolvimento da cultura do feijoeiro é a fixação biológica do nitrogênio, FBN (MENDES; HUNGRIA, 2001).

Grande parte das leguminosas, entre as quais inclui-se o feijoeiro, é capaz de formar uma associação simbiótica com bactérias do gênero *Rhizobium*, além de outros gêneros (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006), sendo coletivamente denominadas como “rizóbios” e, dessa forma, utilizar o nitrogênio proveniente da atmosfera (N<sub>2</sub>). As bactérias formam estruturas especializadas nas raízes, conhecidas como nódulos, onde sintetizam a enzima nitrogenase que é capaz de romper a tripla ligação do N<sub>2</sub> e reduzi-lo a NH<sub>3</sub>, forma assimilável pela planta (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2001).

Na prática agrícola o uso desses microrganismos ocorre via adição de um insumo denominado inoculante, definido como “toda substância que contenha microrganismos com a atuação favorável ao desenvolvimento vegetal” (MA, 1981).

Atualmente as estirpes CIAT 899 (=SEMIA 4077) e H 12 (=SEMIA 4088) de *Rhizobium tropici* e PRF 81 (=SEMIA 4080) de *Rhizobium freirei*, são as melhores estirpes selecionadas pela pesquisa brasileira e autorizadas pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) para a produção de inoculantes destinados à cultura do feijoeiro em âmbito nacional (MAPA, 2011b).

Tradicionalmente, o melhor veículo para inoculantes é a turfa, utilizada como suporte sólido. Composto rico em matéria orgânica, a turfa é importante fonte de nutrientes, retém

umidade e protege as bactérias em temperaturas elevadas, de maneira a permitir a sobrevivência das células por longos períodos. No entanto, a turfa apresenta grande variabilidade em suas propriedades físicas e químicas, além de ser um recurso natural não renovável, portanto, seu uso é limitado, com utilização já proibida na Europa (LUPWAYI; RICE; CLAYTON, 2005; HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007; FERNANDES JÚNIOR et al., 2009).

Uma alternativa ao uso de turfa em inoculantes comerciais são os inoculantes com base em suportes líquidos. A preferência por formulações líquidas por parte do produtor se deve à praticidade no tratamento da semente e pelo menor desgaste das máquinas em comparação ao inoculante turfoso (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007). Porém, a viabilidade celular em formulações líquidas e em sementes inoculadas com inoculante líquido pode ser reduzida, devido à ausência de proteção contra estresses ambientais (TITTABUTR et al., 2007). Para garantir a manutenção da alta concentração de células viáveis, o uso de condicionadores que atuem como protetores celulares torna-se necessário nos inoculantes líquidos (TUMELERO; DENARDIN, 2008). Além disso, mecanismos fisiológicos próprios da célula, como produção de exopolissacarídeos (EPS) e polihidroxibutirato (PHB) favorecem a manutenção da viabilidade celular em condições de estresse e podem contribuir para a manutenção da qualidade do inoculante (VANDERLINDE et al., 2010; CASTELLANE; LEMOS; LEMOS et al., 2014).

Segundo a legislação brasileira, formulações inoculantes que contenham bactérias fixadoras de nitrogênio para simbiose com leguminosas devem apresentar concentração mínima de  $1,0E+09$  Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por grama ou mililitro de produto por, no mínimo, seis meses de armazenamento (MAPA, 2011b).

Estudos realizados com inoculantes turfosos, após 12 meses de armazenamento, mostraram que a sobrevivência de *Rhizobium*, bactéria de crescimento rápido, em meio contendo manitol como fonte de carbono, é cerca de 10 vezes inferior à de *Bradyrhizobium*, uma bactéria de crescimento lento (HERRIDGE; HARTLEY; GEMELL, 2014). A quantidade de células viáveis no inoculante diminui ao longo do tempo de armazenamento, sendo essa redução acentuada em inoculantes líquidos contendo bactérias de crescimento rápido (HERRIDGE; HARTLEY; GEMELL, 2014).

A produção de inoculantes inicia-se com a seleção de estirpes com eficientes taxas de nodulação e fixação de  $N_2$ , seguida pelo desenvolvimento de um meio de cultivo que permita a obtenção de altas concentrações celulares e, por fim, a seleção de estabilizantes e protetores

celulares que assegurem a preservação da viabilidade celular por longos períodos de armazenamento.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver novas formulações líquidas de inoculantes contendo *Rhizobium* spp. para a cultura do feijoeiro, visando obter um produto de fácil aplicação na lavoura, com alta concentração e viabilidade celular, atendendo às exigências do MAPA de, no mínimo, seis meses de prateleira.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 FEIJOEIRO COMUM (*Phaseolus vulgaris* L.)

*Phaseolus vulgaris* L., conhecido popularmente como feijoeiro comum, é a espécie mais importante entre todas as 50 espécies nativas de *Phaseolus* presentes nas Américas (LIMA et al., 2014). Principal grão na alimentação de mais de 300 milhões de pessoas, o feijão comum é consumido em países das Américas Latina e Central, África, Ásia e Índia, devido ao seu alto teor proteico, sendo também fonte de carboidratos e fibras (CGIAR, 2012; RIBEIRO et al., 2013).

Em 2010 a produção mundial de feijão aproximou-se de 23 milhões de toneladas, sendo a América Latina e Caribe responsáveis por quase 24 % e África por 17 % da produção mundial (FAO, 2014; DE LUQUE; CREAMER, 2014). No Brasil, a produção de feijão ocorre em todo o território nacional, com destaque para os estados do Paraná, Minas Gerais, Mato Grosso, Goiás, Santa Catarina e São Paulo. Segundo dados relativos à estimativa da safra 2015/16 no Brasil, a produção agrícola total de feijão (primeira, segunda e terceira safras) abrangerá cerca de 3,02 milhões de hectares, com produção de 3,33 milhões de toneladas e produtividade média nacional de 1.103 kg ha<sup>-1</sup>, valor 8,2% superior ao alcançado na safra 2014/15, de 1.020 kg ha<sup>-1</sup> (CONAB, 2016).

Sabendo-se que a produção média do feijoeiro pode ultrapassar 3500 kg ha<sup>-1</sup>, nota-se que a produtividade da cultura no Brasil ainda é baixa. Entre as possíveis causas pode-se citar a baixa implementação de novas tecnologias, aliada ao cultivo em solos ácidos, deficientes em nitrogênio e com baixo conteúdo de matéria orgânica. A utilização de rizóbios eficientes pode levar ao aumento da disponibilidade de N por meio da simbiose bactéria-leguminosa, permitindo o aumento da produção a baixos custos, implementando uma prática agrícola ecologicamente sustentável (GRAHAM, 1981; HARDARSON, 1993; MICHIELS et al., 1998; VARGAS; MENDES; HUNGRIA, 2000; GRANGE et al., 2007).

Uma característica marcante do feijoeiro é sua capacidade de estabelecer associação simbiótica com uma grande variedade de espécies de *Rhizobium*. A promiscuidade da associação simbiótica torna frequente a nodulação dessa leguminosa. No entanto, a seleção de estirpes de rizóbios altamente eficientes em relação à FBN faz-se necessária, visto que no solo há abundância de rizóbios nativos altamente competitivos (estimados em 1,0E+03 a 1,0E+06 células g<sup>-1</sup> de solo), porém, em sua grande maioria ineficientes quanto à fixação do nitrogênio, com alto grau de diversidade genética e que podem gerar respostas irregulares quanto às taxas

de nodulação (GRAHAM, 1981; HARDARSON, 1993; MARTÍNEZ-ROMERO, 1993; MICHELS et al., 1998; HUNGRIA et al., 2000; HUNGRIA; VARGAS, 2000; ANDRADE; MURPHY; GILLER, 2002; HUNGRIA; CAMPO; MENDES; 2003; ALBERTON; KASCHUK; HUNGRIA, 2006; DALL'AGNOL et al., 2013).

Características intrínsecas da planta e da bactéria, aliadas à suscetibilidade da simbiose a altas temperaturas e outros estresses ambientais como a baixa fertilidade e acidez do solo, também podem ser responsáveis pela falta de resposta à inoculação (GRAHAM, 1981; HUNGRIA; VARGAS; ARAUJO, 1997; HUNGRIA et al., 2000).

## 2.2 NITROGÊNIO

O nitrogênio (N) é o elemento mais abundante da atmosfera terrestre, presente principalmente como gás nitrogênio ( $N_2$ ), que representa cerca de 78% de todos os gases. O N compõe a estrutura de aminoácidos, bases nitrogenadas, ácidos nucleicos, hormônios, clorofila, entre outras moléculas, sendo o quarto elemento mais abundante em plantas, atrás apenas do carbono (C), do oxigênio (O) e do hidrogênio (H) (FIGUEIREDO et al., 2008). A deficiência desse nutriente na planta pode acarretar reduções na fotossíntese, na translocação de fotoassimilados, na formação de raízes, nas taxas de crescimento e, principalmente, na redução da produtividade das culturas (SHRIDHAR, 2012).

As formas iônicas  $NH_4^+$  ou  $NO_3^-$  devem estar disponíveis no solo para que o nutriente seja absorvido pelas plantas. No solo, o nitrogênio encontra-se em sua maior parte ligado à matéria orgânica, enquanto somente uma pequena porcentagem de N está nas formas disponíveis para as plantas. A adição de compostos ricos em N como esterco, adubo verde e fertilizantes químicos nitrogenados pode garantir uma boa produtividade das plantas (FIGUEIREDO et al., 2008; ANDREWS et al., 2009; RODRIGUES et al., 2013).

Na atmosfera, o  $N_2$  é uma molécula muito estável, devido à tripla ligação covalente entre os dois átomos de nitrogênio. Esse N pode ser fixado de forma biológica: resultado da associação entre plantas e bactérias ou pela atividade de bactérias de vida livre que fixam nitrogênio sem estarem associadas a plantas; não biológica: resultado de processos naturais como a reação entre descargas elétricas e  $N_2$ , a combustão e o vulcanismo (contribuição ao redor de 10 % das entradas de N na Terra); industrial: conferida pelo processo de Haber-Bosch que converte o  $N_2$  atmosférico em amônia ( $NH_3$ ). Contudo, o processo industrial apresenta grande dependência de combustíveis fósseis para alcançar as altas pressões e temperaturas necessárias para a redução do  $N_2$ . Além de apresentar um elevado custo de

produção, os fertilizantes gerados pela fixação industrial estão associados à poluição ambiental, pois o aproveitamento dos fertilizantes nitrogenados pelas plantas em geral não ultrapassa 50%, visto que grande parte é perdida por lixiviação, volatilização e desnitrificação, intensificando os processos de eutrofização e liberando o N<sub>2</sub>O para a atmosfera, principal gás causador do efeito estufa (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007; GRESSHOFF, 2014; GRESSHOFF et al., 2015).

### 2.2.1 A Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN)

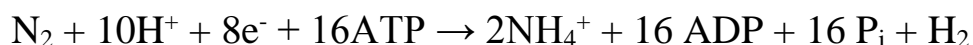
Estima-se que, em 2050, a população mundial deva alcançar 9 bilhões de pessoas. Garantir a alta produção de alimentos sem a necessidade de estender as áreas já cultivadas ou aumentar o emprego de fertilizantes nitrogenados é um dos desafios da agricultura moderna. Estratégias sustentáveis devem ser aplicadas para diminuir os impactos ambientais e climáticos causados pelo atual sistema de produção (THE ROYAL SOCIETY, 2009; CANFIELD; GLAZER; FALKOWSKI, 2010; GODFRAY et al., 2010; RASMUSSEN et al., 2012).

De modo geral, o principal nutriente limitante para o crescimento das plantas é o nitrogênio. As quantidades de N presentes na maioria dos solos são reduzidas e a frequente aplicação de grandes quantidades de fertilizantes nitrogenados faz-se necessária para fornecer os nutrientes necessários à cultura e possibilitar o alcance de elevadas produtividades. Contudo, seu uso indiscriminado prejudica o meio ambiente e apresenta custo elevado. Dessa forma, uma prática agrícola sustentável em substituição à utilização de fertilizantes nitrogenados é a fixação biológica do nitrogênio (FBN), capaz de fornecer um suprimento contínuo de N para o crescimento vegetal e maior rentabilidade econômica ao produtor (FRANCO; FARIA, 1997).

Em ambientes agrícolas, estima-se que aproximadamente 80% do nitrogênio fixado de forma biológica seja resultado da associação envolvendo plantas leguminosas e bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas em leguminosas (BFNNL) dos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Neorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, *Allorhizobium* e *Mesorhizobium*, referidas comumente como “rizóbios” (VANCE, 1998; GRAHAM; VANCE, 2000; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; MOUSAVI et al., 2014).

Do ponto de vista bioquímico, a redução do nitrogênio necessita de uma energia de ativação extremamente elevada, devido à ligação tripla do nitrogênio molecular (N≡N), o que torna esta molécula praticamente inerte em condições normais de temperatura e pressão. Para

contornar estas dificuldades, a FBN utiliza-se de um complexo enzimático altamente conservado denominado de complexo da nitrogenase, formado pelas enzimas dinitrogenase e dinitrogenase-redutase, capazes de reduzir o N<sub>2</sub> atmosférico a amônia (NH<sub>3</sub>). A equação global da reação catalisada pelo complexo da nitrogenase é descrita abaixo, onde: e<sup>-</sup> representa o elétron e P<sub>i</sub> representa o fosfato inorgânico (NELSON; COX, 2011).



A redução do nitrogênio molecular, pelo complexo da nitrogenase, leva à formação de amônia (NH<sub>3</sub>), que rapidamente converte-se em amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) no citoplasma de células diferenciadas, conhecidas como bacteroides (forma modificada dos rizóbios com capacidade de fixar N<sub>2</sub>). O NH<sub>4</sub><sup>+</sup> pode ser incorporado na forma dos aminoácidos glutamato e glutamina, pelas enzimas glutamato-sintase e glutamina-sintetase e, posteriormente, em outras moléculas nitrogenadas. Dessa associação entre leguminosas e bactérias, as plantas beneficiam-se do vasto suprimento de nitrogênio reduzido que é disponibilizado, enquanto as bactérias se favorecem da enorme oferta de carboidratos e intermediários do ciclo de Krebs disponíveis, fixando maiores quantidades de nitrogênio (NELSON; COX, 2011).

No caso de bactérias simbióticas, como *Rhizobium*, todo o processo da FBN ocorre no interior de estruturas características conhecidas como nódulos (hipertrofias corticais em plantas), formadas nas raízes de leguminosas. No interior dos nódulos, observam-se estruturas características conhecidas por simbiossomos, que abrigam as células diferenciadas denominadas de bacteroides, capazes de realizar a fixação biológica do nitrogênio (LONG, 1996; FIGUEIREDO et al., 2008; MADIGAN, MARTINKO, PARKER, 2010).

Diversas leguminosas são noduladas, com ênfase na subfamília Papilionoideae, da qual fazem parte plantas de grande importância econômica e social, como é o caso do feijoeiro. Caso uma leguminosa seja infectada por uma linhagem de bactérias compatível, ocorrerá a formação de nódulos fixadores de nitrogênio e com coloração interna avermelhada, devido à presença de leghemoglobina (proteína de coloração vermelha e de ligação ao O<sub>2</sub>); se, de maneira contrária, a linhagem bacteriana for incompatível, será observada a formação de nódulos pequenos, branco-esverdeados e não fixadores de nitrogênio (MADIGAN, MARTINKO, PARKER, 2010).

### 2.3 GÊNERO *RHIZOBIUM*

A primeira espécie entre as bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas em leguminosas (BFNNL) a ser descrita foi *Rhizobium leguminosarum* (FRANK, 1879, 1889). O gênero *Rhizobium* pertence ao filo  $\alpha$ -Proteobacteria, Ordem Rhizobiales, Família Rhizobiaceae. Bactérias desse gênero são Gram-negativas, aeróbicas obrigatórias e sem endósporos. Pode-se observar uma variação intragênero e intraespécies, porém, de forma geral, essas bactérias produzem polissacarídeos extracelulares (EPS, exopolissacarídeos) e utilizam vários carboidratos como fonte de energia. Com relação à flagelação em *Rhizobium*, nota-se um flagelo subpolar ou polar (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A diferenciação dos gêneros de rizóbio pode ser realizada por meio de características morfológicas em meio de cultivo YMA (*yeast extract mannitol agar*, ou extrato de levedura-manitol-ágar) (FRED; WAKSMAN, 1928; VINCENT, 1970). As colônias circulares de *Rhizobium*, quando isoladas, apresentam de 2 a 4 mm de diâmetro e aumentam de tamanho com o maior período de incubação até coalescerem, devido à acentuada produção de EPS. As colônias apresentam-se como convexas, semitranslúcidas e mucilaginosas. Geralmente produzem reação ácida no meio YMA, mas podem não produzir alteração visível de pH. Rizóbios apresentam crescimento rápido, verificando-se o aparecimento de colônias isoladas após 2 a 3 dias de incubação a 28 °C (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

No Brasil, embora diversos trabalhos sobre diversidade de rizóbios simbioses do feijoeiro tenham sido conduzidos, o conhecimento disponível ainda é escasso. Em condições de campo, *Rhizobium tropici* tem sido encontrado como a espécie fixadora de N<sub>2</sub> dominante, possivelmente por sua tolerância a condições edáficas prevalentes, as quais incluem altas temperaturas, acidez e toxicidade do alumínio (HUNGRIA; VARGAS, 2000; HUNGRIA; CAMPO; MENDES; 2003; HUNGRIA et al., 2000; HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2001, 2007).

*R. tropici* possui maior estabilidade genética em relação a outras espécies de *Rhizobium*, o que garante a manutenção de suas propriedades simbióticas sob condições estressantes, demonstrando ser a espécie mais recomendada para a realização de uma simbiose eficiente em condições tropicais e subtropicais (SOBERÓN-CHAVES, 1986; FLORES et al., 1988; MARTÍNEZ-ROMERO et al., 1991; SEGOVIA; YOUNG; MARTÍNEZ-ROMERO, 1993; HUNGRIA et al., 2000; GOMES; ORMEÑO-ORRILLO; HUNGRIA, 2015).

A espécie *Rhizobium tropici*, estirpe CIAT 899 (=SEMIA 4077), foi isolada de nódulos de feijoeiro comum na Colômbia, enquanto a estirpe PRF 81 (=SEMIA 4080) de *Rhizobium freirei*, referida anteriormente como *R. tropici*, foi isolada de nódulos de feijoeiro comum coletados em solo do Paraná. Ambas as espécies foram identificadas por suas altas taxas de FBN com os genótipos Andino (sementes médias e grandes) e Mesoamericano (sementes pequenas) de feijão comum. Apresentam alta competitividade contra rizóbios nativos, estabilidade genética e adaptação às condições tropicais que incluem acidez do solo e temperaturas elevadas. Possuem maior resistência a compostos antimicrobianos em comparação com outros rizóbios simbiossantes do feijoeiro, como *R. etli* e *R. leguminosarum* sv. phaseoli, e maior tolerância a pesticidas utilizados na agricultura, que podem diminuir a sobrevivência dos rizóbios em formulações inoculantes, quando aplicadas em sementes (MARTÍNEZ-ROMERO et al., 1991; GRAHAM et al., 1994; HUNGRIA et al., 2000; BERNAL et al., 2004; PINTO; HUNGRIA; MERCANTE, 2007; ORMEÑO-ORRILLO et al., 2008, 2012; RIBEIRO et al., 2012).

As estirpes CIAT 899 e PRF 81 compreendem rizóbios promíscuos que podem se associar a diversas espécies de leguminosas; sendo assim, esses rizóbios provavelmente obtiveram acesso aos nódulos do feijoeiro comum no momento em que essa leguminosa foi introduzida em regiões tropicais (MARTÍNEZ-ROMERO, 1993; HUNGRIA et al., 2000; ACOSTA-DURÁN; MARTÍNEZ-ROMERO, 2002; GRANGE et al., 2007; ORMEÑO-ORRILLO et al., 2012).

Bactérias do gênero *Rhizobium*, de crescimento rápido, apresentam menor viabilidade celular a longo prazo em comparação com bactérias de crescimento lento, como *Bradyrhizobium* (em cerca de 10 vezes) e de crescimento intermediário como *Mesorhizobium*, quando armazenadas durante 12 meses a 4 °C em inoculante turfoso (HERRIDGE; HARTLEY; GEMELL, 2014).

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), as estirpes CIAT 899 (=SEMIA 4077) e H 12 (=SEMIA 4088) de *Rhizobium tropici* e PRF 81 (=SEMIA 4080) de *Rhizobium freirei*, esta última anteriormente classificada como *R. tropici* (DALL'AGNOL et al., 2013), estão autorizadas para a produção de formulações inoculantes para a cultura do feijoeiro no Brasil (MAPA, 2011b; DALL'AGNOL et al., 2013).

## 2.4 INOCULANTE

Inoculante é definido como “toda substância que contenha microrganismos com atuação favorável ao desenvolvimento vegetal”, sendo a principal forma na qual os microrganismos fixadores de nitrogênio são empregados na prática agrícola (MA, 1981).

Estima-se que aproximadamente 24 milhões de doses de inoculantes para leguminosas e 2 milhões de doses inoculantes para gramíneas foram comercializados em todo o território nacional em 2012 (DE ARAUJO, 2012). No Brasil, a utilização de inoculantes se destina principalmente à cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merr.), capaz de obter todo o N necessário pela simbiose com as bactérias diazotróficas (fixadoras de nitrogênio), de maneira a dispensar o uso de fertilizantes nitrogenados e resultando em uma economia estimada em cerca de 15 bilhões de reais anualmente ao país (MAPA, 2012; HUNGRIA; MENDES; MERCANTE, 2013).

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) é o órgão responsável por fiscalizar a qualidade dos inoculantes, que devem atender às seguintes especificações no caso de bactérias nodulíferas (MAPA, 2011b):

- ❖ Apresentar concentração mínima de 1,0E+09 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por mililitro ou grama de produto, no caso de formulações contendo bactérias diazotróficas para simbiose com leguminosas;
- ❖ Ser produzido em suporte esterilizado;
- ❖ Estar livre de microrganismos não especificados em fator de diluição de 1,0E+05;
- ❖ Ser elaborado em suporte que proporcione todas as condições de sobrevivência ao microrganismo;
- ❖ Apresentar prazo de validade de, no mínimo, seis meses a partir da data de fabricação;
- ❖ Conter somente microrganismos relacionados na Instrução Normativa nº13, de 24 de março de 2011, conferida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Um inoculante, com alta eficiência agrônômica, resulta de uma ou mais estirpes de microrganismos selecionados, contidas em um suporte para veiculação, com substâncias protetoras e/ou adesivas para a garantia da manutenção da viabilidade celular durante o armazenamento (tempo de prateleira) e transporte. A qualidade do produto inoculante também depende da ausência de contaminantes e de um número mínimo de células, suficiente para garantir uma boa taxa de nodulação e fixação de N<sub>2</sub>. Finalmente, para se alcançar uma boa

aceitação por parte dos agricultores, o inoculante deve ser rentável, de fácil manuseio e aplicação (XAVIER et al., 2004; HERRMANN; LESUEUR, 2013; HERRIDGE; HARTLEY; GEMELL, 2014).

Os inoculantes produzidos, importados e comercializados em território nacional devem apresentar registro no órgão competente do MAPA. O processo de registro de produto novo deve apresentar relatório técnico-científico conclusivo, emitido por um órgão brasileiro de pesquisa oficial ou credenciado, para a avaliação de viabilidade e eficiência agrônoma de produtos inoculantes relacionados ao processo de fixação biológica do nitrogênio em leguminosas. No caso de produtos contendo bactérias diazotróficas simbióticas, a solicitação de registro deve atender às seguintes exigências (CAMPO; HUNGRIA, 2007; MAPA, 2011a; 2011b):

- ❖ Caracterização em laboratório quanto à identidade, pureza e concentração de microrganismos, conforme métodos oficiais estabelecidos pelo MAPA, do produto inoculante;
- ❖ Ensaios em casa de vegetação: em vasos de Leonard ou sistemas semelhantes que permitam o cultivo sob condições de substratos estéreis; e, em vasos com solo com, no mínimo, quatro repetições para cada tratamento (1- sem inoculação; 2- sem inoculação, com N na concentração recomendada para a cultura; 3- com inoculação de estirpes já recomendadas para a cultura e testadas separadamente, quando existentes; 4- com inoculação das estirpes a serem testadas separadamente). Devem ser avaliados a massa seca da parte aérea de plantas cortadas no ponto de inserção dos cotilédones, nitrogênio total na massa seca, eficiência nodular e teor de clorofila nas folhas (opcional);
- ❖ Ensaios no campo: a área para a instalação do experimento deve ser preparada e ter suas características físico-químicas determinadas; o solo não deve apresentar população estabelecida do rizóbio em estudo e, caso possua, a população deverá ser quantificada e incluída no relatório; o delineamento dos experimentos e os tratamentos devem seguir as especificações descritas pelo MAPA; deve-se avaliar a taxa de nodulação (número de nódulos por planta e massa seca de nódulos por planta), biomassa e nitrogênio total da parte aérea das plantas e o rendimento de grãos (teores de N e o N total nos grãos);

- ❖ Realização de análise estatística e interpretação dos resultados, onde os novos inoculantes avaliados devem apresentar resposta igual ou superior à inoculação padrão e superior ao controle sem inoculação nos quatro ensaios;
- ❖ Elaboração de relatório técnico-científico com revisão bibliográfica, descrição completa da metodologia, resultados obtidos e conclusão clara sobre a eficiência e recomendação do produto testado, assim como assinatura(s) do(s) pesquisador(res) responsável(is).

Segundo dados de Xavier et al. (2004), baseado em um levantamento bibliográfico, desde 1980 grande parte da pesquisa sobre rizóbios está voltada para a fisiologia e genética de microrganismos. Verifica-se que menos de 1% dos artigos de pesquisa sobre rizóbios direciona-se para os aspectos de formulações inoculantes. Existe, portanto, uma enorme necessidade pela busca de melhores formulações inoculantes com aditivos que sejam mais eficientes, estáveis ao longo do tempo, com melhor qualidade e que satisfaçam as necessidades do agricultor, de maneira a visar o aumento da comercialização deste produto (STEPHENS; RASK, 2000; HERRMANN; LESUEUR, 2013).

#### 2.4.1 Seleção do Microrganismo

A seleção de estirpes microbianas é um aspecto muito importante para a produção de inoculantes de plantas leguminosas. Os microrganismos devem possuir (BURTON, 1984):

- ❖ Habilidade de formar nódulos fixadores de N<sub>2</sub> em espécies de leguminosas para as quais o microrganismo é recomendado;
- ❖ Competitividade na formação nodular e elevada sobrevivência em solos onde ocorre a presença de rizóbios nativos;
- ❖ Nodulação rápida e eficiente fixação de N<sub>2</sub> em uma ampla variedade de solos;
- ❖ Boa capacidade de crescimento na formulação inoculante e no solo;
- ❖ Persistência no solo mesmo na ausência da planta hospedeira;
- ❖ Eficiência em uma ampla variedade de cultivares ou genótipos da planta;
- ❖ Tolerância a fatores de estresse encontrados no solo: acidez, alcalinidade, salinidade, alta concentração de alumínio e manganês, dentre outros.

Atualmente existe uma relação de rizóbios (e a cultura leguminosa a que se destina) autorizados pelo MAPA para a produção de inoculantes no Brasil. Para a obtenção de registro, os inoculantes contendo rizóbios e produzidos ou comercializados em território nacional devem apresentar, obrigatoriamente, as estirpes autorizadas pelo MAPA. A seleção de estirpes de rizóbios e de outros microrganismos para a produção de inoculantes baseia-se em dados científicos e, no Brasil, são em geral apresentados em um fórum específico, a Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão da Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola (RELARE), composta por pesquisadores e representantes de empresas produtoras e/ou importadoras de inoculante (HUNGRIA; ARAUJO; MERCANTE, 2014).

De forma resumida, a obtenção de novas estirpes, no caso de bactérias diazotróficas simbióticas, compreende as seguintes etapas (HUNGRIA; DA SILVA, 2011; MAPA, 2011a):

- ❖ Coleta de nódulos de diversas leguminosas hospedeiras utilizadas para o isolamento dos microrganismos;
- ❖ Caracterização morfofisiológica de colônias isoladas de rizóbios em meio de cultivo YMA em relação a: manifestação de crescimento; alteração do pH do meio; diâmetro, elevação, tipos de forma, borda e superfície das colônias; produção e consistência de muco; e, cromogênese na presença de vermelho Congo e azul de bromotimol, além da realização testes bioquímicos;
- ❖ Caracterização genotípica: ao nível de gênero pela sequência do gene 16S RNA ribossomal (RNAr); e, ao nível de espécie, pela metodologia de *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA);
- ❖ Ensaios em casa de vegetação, ensaios no campo e elaboração de relatório técnico-científico, semelhante às condições básicas estabelecidas para a recomendação de produtos inoculantes ao MAPA.

As bactérias autorizadas pelo MAPA são fornecidas às indústrias de inoculante sem custo tecnológico. A comercialização de inoculantes importados no Brasil pode ser realizada desde que cumpridas às exigências da legislação brasileira, e a produção ocorra a partir das estirpes recomendadas e autorizadas pelo MAPA (HUNGRIA; CAMPO; MENDES; 2007).

Para a cultura do feijoeiro as estirpes CIAT 899 (=SEMIA 4077) e H 12 (=SEMIA 4088) de *Rhizobium tropici* e PRF 81 (=SEMIA 4080) de *Rhizobium freirei* estão autorizadas para a produção de inoculantes em território nacional (MAPA, 2011b).

#### 2.4.2 Suportes de veiculação

Suporte representa o veículo de manutenção dos microrganismos, permitindo o seu transporte do local onde é produzido para o campo. Representa a principal porção (por volume ou peso) do inoculante, e tem importância fundamental para manter as células viáveis e em bom estado fisiológico. O suporte fornece um nicho temporário de proteção aos microrganismos, seja fisicamente, por apresentar espaços porosos criando um microambiente de proteção, ou nutricionalmente, por oferecer algum substrato específico (BASHAN, 1998; ARORA; KHARE; MAHESHWARI, 2011; HERRMANN; LESUEUR, 2013).

De maneira geral, um suporte ideal deve oferecer um microambiente adequado aos microrganismos, boa capacidade de retenção de água, pH ajustável, alta capacidade de tamponamento, ser quimicamente inerte, atóxico, de baixo custo, biodegradável, assegurar a sobrevivência dos microrganismos durante longos períodos, ter ótima aderência à superfície de sementes e permitir liberação rápida e controlada dos microrganismos no solo próximo às raízes da leguminosa (BASHAN, 1998; HERRIDGE; GEMELL; HARTLEY, 2002; MALUSA; SAS-PASZT; CIESIELSKA, 2012; HERRMANN; LESUEUR, 2013).

Os suportes para veiculação de formulações inoculantes podem ser classificados da seguinte forma (HERRMANN; LESUEUR, 2013; BASHAN et al., 2014):

- ❖ Sólido: turfa, carvão, argilas e outros materiais sólidos inorgânicos;
- ❖ Líquido: meio de cultura líquido contendo produtos aditivos como adesivos, estabilizantes e protetores celulares;
- ❖ Resíduo agroindustrial: celulose, farelo de soja e trigo, bagaço de cana, cascas de uva e espigas de milho;
- ❖ Material inerte: vermiculita, perlita, sulfato de cálcio e esferas de alginato;
- ❖ Cultura microbiana liofilizada;
- ❖ Biopolímeros: goma xantana, alginato, goma arábica, amido, carboximetilcelulose e polivinilpirrolidona.

No Brasil, a maior parte das empresas fabricantes que oferecem formulações inoculantes para a cultura do feijoeiro, contendo *Rhizobium* spp., utilizam a turfa (suporte sólido) para a veiculação dos microrganismos.

A sobrevivência de rizóbios na turfa é superior à verificada em suportes líquidos, pois esta representa uma boa fonte de nutrientes, retém umidade, protege contra altas

temperaturas e suas partículas encapsulam parcialmente as células, promovendo maior proteção. Para a utilização como suporte sólido, inicialmente a turfa é finamente moída, passa pela etapa de neutralização do pH e, posteriormente, é empacotada e esterilizada por raios gama ou feixe de elétrons para a injeção de culturas líquidas de microrganismos. O inoculante turfoso normalmente apresenta menor aderência às sementes, por isso, aplicam-se produtos adesivos às sementes, como solução de sacarose 10 %, para garantir melhor aderência do inoculante e, conseqüentemente, maior produtividade no campo. A qualidade e a composição da turfa são variáveis, por isso, nem todas as turfeiras oferecem fontes apropriadas de suporte para inoculantes. A turfa tem sido empregada no Brasil e no exterior há décadas, mas é um recurso natural não renovável, limitado e com proibição de uso na Europa (ROUGHLEY; VINCENT, 1967; DART; ROUGHLEY; CHANDLER, 1969; DEAKER; ROUGHLEY; KENNEDY, 2004; BULLARD; ROUGHLEY; PULSFORD, 2005; HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007; ALBAREDA et al., 2008; CASTERIANO; WILKES; DEAKER, 2013).

#### 2.4.3 Suporte Líquido

Formulações líquidas de inoculantes representam uma alternativa aos inoculantes turfosos, por simplificarem o processo de produção. Outras vantagens incluem maior facilidade no tratamento da semente e a ocorrência de menores desgastes das máquinas, contribuindo para o aumento da preferência do produtor por fórmulas líquidas. A aplicação do inoculante líquido ocorre principalmente no momento anterior à semeadura, ou com a aquisição de sementes pré-inoculadas. De ambas as formas, deve-se realizar a cobertura uniforme das sementes com o inoculante para a obtenção de uma boa nodulação. Embora apresente maiores facilidades, a taxa de sobrevivência da maioria dos microrganismos em suporte líquido é menor, pela ausência da proteção proporcionada pela turfa. Temperaturas elevadas, dessecação, tratamento das sementes com fungicidas, inseticidas e micronutrientes, entre outros, afetam a sobrevivência de bactérias diazotróficas (BROCKWELL; BOTTOMLEY, 1995; SINGLETON; KEYSER; SANDE, 2002; DEAKER; ROUGHLEY; KENNEDY, 2004; HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007; TITABUTR et al., 2007; ALBAREDA et al., 2008).

O meio de cultura representa a base do inoculante líquido. Para a obtenção de alta biomassa celular devem ser adicionados: macronutrientes, fontes de C, H, N, O, P, S, Mg e Fe; micronutrientes, sais contendo Mn, Co, Zn, Cu, Mo, Cr e Ni em concentrações otimizadas e específicas para cada microrganismo; fatores de crescimento, vitaminas e aminoácidos.

Parâmetros como agitação, aeração, pH, temperatura e tempo de cultivo devem ser cuidadosamente monitorados, pois interferem diretamente no crescimento dos microrganismos (LIMA et al., 2001).

O meio YM (FRED; WAKSMAN, 1928; VINCENT, 1970) apresenta poucos componentes em sua composição e, de acordo com a espécie de rizóbio, pode proporcionar crescimento em altas concentrações. Utilizado como formulação padrão para o cultivo de rizóbios, é composto basicamente por manitol como fonte de carbono e extrato de levedura (SOMASEGARAN; HALLIDAY 1982). A utilização de meio YM para o cultivo de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* ocorre amplamente em escala laboratorial e sua utilização como base de composição, o torna interessante para o desenvolvimento de novas formulações. Na indústria, a utilização de manitol, como fonte de carbono, torna extremamente cara a produção de inoculantes, sendo este geralmente substituído por glicerol ou sacarose (MENÉNDEZ et al., 2014).

A utilização de sacarose aumenta a sobrevivência de microrganismos em formulações líquidas (SINGLETON; KEYSER; SANDE, 2002; TAURIAN et al., 2010; HERRMANN; LESUEUR, 2013). A sacarose no meio de cultura, além de ser fonte de carbono para o metabolismo de *Rhizobium* spp., favorece a produção de exopolissacarídeos (EPS), que contribuem para proteção contra a dessecação, por formar uma camada com alto conteúdo de água ao redor da célula, e formação de biofilme (DONOT et al., 2012).

Aditivos e protetores como, por exemplo: glicerol, carboximetilcelulose (CMC), goma arábica, polivinilpirrolidona (PVP), entre outros compostos, podem contribuir para a adesão das células nas sementes tratadas e, também, como protetores celulares (MANIKANDAN et al., 2010; BASHAN et al., 2014).

O CMC, ou carboximetilcelulose, é um derivado de celulose que apresenta-se como um polímero altamente higroscópico e viscoso, atóxico para humanos e empregado nas indústrias alimentícia e farmacêutica, que o torna um composto de valor acessível. O emprego de CMC, como protetor celular, tem ocorrido na forma de misturas poliméricas com amido na presença de MgO ou ZnO, relatados como veículos eficientes na produção de inoculantes de *Bradyrhizobium japonicum* (SANZ et al., 2005; FERNANDES JÚNIOR et al., 2009).

A polivinilpirrolidona, ou PVP, é um polímero vinílico sintético que oferece proteção contra dessecação, por apresentar alta capacidade de ligação à água, e proteção contra exsudatos inibitórios originados a partir do revestimento de sementes, prejudiciais às bactérias fixadoras de nitrogênio inoculadas em sementes (SINGLETON; KEYSER; SANDE, 2002; BASHAN et al., 2014).

O suporte líquido permite, de maneira fácil, a adição de substâncias (nutrientes, protetores e adesivos) ao meio de cultivo, oferece maior controle sobre a composição do meio e, portanto, pode resultar na obtenção de altas concentrações celulares. No entanto, a maioria das formulações apresenta tempo de prateleira curto, maior sensibilidade a estresses ambientais, rápida queda de viabilidade celular durante o armazenamento e após o tratamento de sementes (HERRMANN; LESUEUR, 2013).

#### 2.4.4 Características Fisiológicas de *Rhizobium* no aumento da qualidade do inoculante

Certos procariotos possuem a capacidade de sobreviver em ambientes de estresse. Nestes ambientes podem-se observar respostas fisiológicas como a produção de exopolissacarídeos (EPS), indução da expressão de proteínas ao estresse para a proteção da membrana celular, reparo de danos no DNA e acúmulo intracelular de açúcares (BILLI; POTTS, 2002; CYTRYN et al., 2007; VANDERLINDE et al., 2010; CASTERIANO; WILKES; DEAKER, 2013).

Polissacarídeos extracelulares (EPS) são normalmente sintetizados e excretados por muitas espécies de bactérias. EPS bacterianos oferecem proteção contra vários estresses ambientais como dessecação, predação e efeitos de substâncias antimicrobianas (DONOT et al., 2012; CASTELLANE; LEMOS; LEMOS, 2014). No caso da dessecação acredita-se que o EPS é capaz de absorver grandes quantidades de água e circundar a célula com um ambiente hidratado (ROBERSON; FIRESTONE, 1992).

Rizóbios, em sua grande maioria, são naturalmente produtores de EPS, excretam grandes quantidades de polissacarídeos na rizosfera e causam aumento da viscosidade do meio de cultura, quando em cultura pura. Em *R. leguminosarum* foi comprovado que exopolissacarídeos têm papel fundamental na formação de biofilme. Acredita-se que o EPS esteja envolvido especialmente na adesão celular durante a formação de biofilme (FUJISHIGE et al., 2006; RUSSO et al., 2006; DANHORN; FUQUA, 2007; SANTAELLA et al., 2008; VANDERLINDE et al., 2010). Sabe-se que a formação de exopolissacarídeos e de biofilme por estirpes bacterianas pode contribuir efetivamente com a fertilidade do solo e melhorar o crescimento vegetal (NOEL, 2009; QURASHI; SABRI, 2012; CASTELLANE; LEMOS; LEMOS, 2014).

Bactérias simbióticas, como os rizóbios, podem utilizar a fonte de carbono proveniente da simbiose com as leguminosas e convertê-la em polímero de armazenamento como o poli-3-hidroxibutirato (PHB). O acúmulo de PHB frequentemente ultrapassa 50% do

peso seco da célula. Supõe-se que este polímero possa auxiliar na diferenciação de alguns rizóbios em bacteroides fixadores de  $N_2$ . Também pode atuar como fonte de energia e carbono em condições de estresse, aumentar a tolerância da bactéria a altas temperaturas, exposição a  $H_2O_2$ , irradiação-UV, dessecação e estresse osmótico (MINCHIN; PATE, 1973; TAL; OKON, 1985; BERGERSEN; TURNER, 1990; BERGERSEN; PEOPLES; TURNER, 1991; TAVERNIER et al., 1997; JAMES et al., 1999; KADOURI et al., 2002; KADOURI; JURKEVITCH; OKON, 2003; RUIZ; LÓPEZ; MÉNDEZ, 2004; LODWIG et al., 2005; RATCLIFF; KADAM; DENISON, 2008).

## 2.5 METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

A metodologia de superfície de resposta (BOX; HUNTER; HUNTER, 1978), ou MSR, consiste de um conjunto de técnicas matemáticas e estatísticas empregadas no planejamento e análise de experimentos utilizados na modelagem matemática de respostas. A MSR visa otimizar a resposta de interesse influenciada por diversas variáveis. Dessa forma, contribui para a melhoria da qualidade de produtos e processos, reduz o tempo de desenvolvimento e diminui gastos (GUEDES, 1996; BAS; BOYACI, 2007; HAO et al., 2011; SÜTOA et al., 2015).

Modelagem e deslocamento são as duas etapas distintas da metodologia de superfície de resposta que conduzem à região ótima da superfície investigada. A modelagem é realizada ajustando-se uma função linear das variáveis independentes (modelo de primeira ordem) a respostas obtidas com planejamentos fatoriais com pontos centrais. Realiza-se o cálculo do caminho da máxima inclinação (região onde ocorra otimização do produto ou processo). Então, são realizados deslocamentos ao longo do caminho de máxima de inclinação até a região do ótimo, onde, na presença de curvatura, um modelo de segunda ordem pode ser empregado, por meio de um planejamento composto central (com pontos fatoriais, centrais e axiais), permitindo a localização do ponto ótimo (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

A metodologia de superfície de resposta pode ser composta por (Tabela 1) um planejamento formado por: pontos fatoriais, que contribuem para estimar os termos da interação; pontos centrais, que indicam a existência de curvatura no sistema e pontos axiais, que auxiliam na estimação dos termos quadráticos. A porção da análise fatorial não necessita ser realizada em triplicata, pois as repetições estão presentes nas combinações e as repetições

no ponto central indicam se houve boa repetibilidade do processo (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

Tabela 1 – Exemplo de planejamento composto central ( $2^3$ ) com a análise de três fatores com dois níveis cada. O planejamento conta com oito pontos fatoriais, cinco pontos centrais e seis pontos axiais.

Formulação	Variáveis Codificadas			Variável Resposta
	x1	x2	x3	Y
1	-1	-1	-1	
2	1	-1	-1	
3	-1	1	-1	
4	1	1	-1	
5	-1	-1	1	
6	1	-1	1	
7	-1	1	1	
8	1	1	1	
9	0	0	0	
10	0	0	0	
11	0	0	0	
12	0	0	0	
13	0	0	0	
14	-1,68	0	0	
15	+1,68	0	0	
16	0	-1,68	0	
17	0	+1,68	0	
18	0	0	-1,68	
19	0	0	+1,68	

Fonte: o próprio autor

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver formulações líquidas de inoculantes contendo *Rhizobium tropici* estirpe CIAT 899 (=SEMIA 4077) e *Rhizobium freirei* estirpe PRF 81 (=SEMIA 4080), com altas concentrações celulares e preservação da viabilidade celular mínima exigida pelo MAPA ( $1,0E+09$  células mL<sup>-1</sup>) até o final do período de armazenamento.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Desenvolver meios de cultura para *Rhizobium tropici*, estirpe CIAT 899, e *Rhizobium freirei*, estirpe PRF 81, que possibilitem a obtenção de altas concentrações celulares;
- ❖ Selecionar protetores celulares que preservem a viabilidade celular de *Rhizobium* spp. até o final do período de armazenamento;
- ❖ Analisar a viabilidade celular dos inoculantes líquidos desenvolvidos durante o armazenamento;
- ❖ Realizar a produção das formulações líquidas em escala semipiloto e avaliar a viabilidade celular durante o período de armazenamento.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MICRORGANISMOS

As bactérias utilizadas para o desenvolvimento de formulações líquidas de inoculantes foram *Rhizobium tropici* estirpe CIAT 899 (=SEMIA 4077, =CNPSO 103), fornecida pela Dra. Esperanza Martínez-Romero (Centro de Ciências Genômicas – CCG, Cuernavaca, México), e *Rhizobium freirei* estirpe PRF 81 (=SEMIA 4080, =CNPSO 2217), isolada e fornecida pela Dra. Diva S. Andrade (Instituto Agrônomo do Paraná – IAPAR, Londrina, Paraná).

As estirpes CIAT 899 de *Rhizobium tropici* e PRF 81 de *Rhizobium freirei* estão autorizadas para uso em inoculantes na cultura do feijoeiro, em todo o território nacional, segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2011b). Ambas as estirpes são as únicas utilizadas entre as reduzidas opções de formulações líquidas inoculantes atualmente comercializadas no Brasil para a cultura do feijoeiro.

#### 4.1.1 Armazenamento, Preparo do Pré-inóculo e Condições de Cultivo de *Rhizobium* spp.

Para o cultivo de *Rhizobium* spp. foi utilizado o meio YM modificado, composto por:

- ❖ Manitol 5,0 g L<sup>-1</sup> (Synth<sup>®</sup>);
- ❖ Extrato de levedura 0,4 g L<sup>-1</sup> (Acumedia<sup>®</sup>);
- ❖ Fosfato de potássio dibásico - K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 0,5 g L<sup>-1</sup> (Anidrol);
- ❖ Sulfato de magnésio hepta-hidratado - MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O - 0,2 g L<sup>-1</sup> (Vetec);
- ❖ Cloreto de sódio - NaCl - 0,1 g L<sup>-1</sup> (Vetec).

O meio YM (FRED; WAKSMAN, 1928; VINCENT, 1970) é modificado do original quanto ao teor de manitol, sendo reduzido de 10,0 g L<sup>-1</sup> para 5,0 g L<sup>-1</sup>. Neste trabalho, embora descrito como meio YM, todos os experimentos referem-se, exclusivamente, à utilização do meio YM modificado.

As bactérias foram crescidas em meio YM sólido, contendo 1,2 % de ágar (Acumedia<sup>®</sup>), e armazenadas em meio YM líquido, com 30% de glicerol, sob criopreservação a -80 °C, no laboratório de Biotecnologia do Solo, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Soja, na cidade de Londrina, Paraná.

Culturas estoque de *Rhizobium tropici* estirpe CIAT 899 e *Rhizobium freirei* estirpe PRF 81, criopreservadas em meio YM foram utilizadas para o preparo do pré-inóculo. O cultivo foi realizado em meio YM com agitação de 180 rpm a 28 °C durante 24 horas. Para o preparo do pré-inóculo os microrganismos foram crescidos até a concentração de  $1,0E+06$  UFC mL<sup>-1</sup>, pois para a realização dos experimentos foi determinada a concentração inicial de  $1,0E+04$  UFC mL<sup>-1</sup>, correspondendo à adição de 1 mL do pré-inóculo em 100 mL de formulação teste presente nos frascos. A esterilização do meio de cultivo e dos frascos, para a preparação do pré-inóculo ocorreu em autoclave sob temperatura de 121 °C a 1 atm durante 20 minutos.

#### 4.1.2 Avaliação da Concentração de Rizóbios em Placa pelo Método de Gotejamento

A estimativa da concentração de células viáveis de *R. tropici* estirpe CIAT 899 e *R. freirei* estirpe PRF 81, nos meios de cultura avaliados, foi expressa em Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC mL<sup>-1</sup>), segundo método adaptado de Miles e Misra (1938) e presente em Ferreira e Hungria (2013). Em um frasco previamente esterilizado contendo 9 mL de solução fisiológica (NaCl 0,85 %) foi adicionado 1 mL da formulação em análise, sob condições assépticas, de forma a realizar diluição seriada de 1:10 (v/v) e obter a diluição  $1,0E+01$ , após homogeneização em vórtex. Foram realizadas diluições seriadas sucessivas, a partir da diluição anterior, até a formação da série de diluições que permitisse a contagem, na qual a média da triplicata do gotejamento estivesse entre 10 e 30 colônias por gota e, assim, a concentração celular da formulação analisada fosse calculada. Alíquotas de 30 µL foram coletadas em triplicata, a partir de cada diluição analisada e gotejadas em placas de Petri contendo meio de cultura YMA com corante vermelho Congo 25 µg mL<sup>-1</sup> (Dinâmica®). Após a realização do procedimento, aguardou-se a absorção da amostra gotejada e, então, as placas foram incubadas em posição invertida, a 28 °C durante, aproximadamente, 41 horas. O número de colônias foi contado e realizou-se o seguinte cálculo para a estimativa da concentração de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por mililitro:

$$\text{UFC mL}^{-1} = m f d$$

Onde:

m = média do número de colônias por gota, da triplicata, na mesma diluição;

f = fator de correção para mL (1 mL/ volume aplicado, em mL, por gota);

d = diluição na qual foi realizada a contagem das colônias.

Caso a média da contagem das colônias em determinada diluição não tenha apresentado entre 10 e 30 colônias por gota, foi utilizada a diluição mais próxima da faixa de contagem. Os testes de cada formulação foram realizados em triplicata (repetições A, B e C). O valor final da concentração, em UFC mL<sup>-1</sup>, foi obtido por meio da média entre os valores das três repetições de um mesmo teste. Quando uma das repetições apresentou média com variação acima de 40% da média das outras duas, não foi considerada no cálculo.

#### 4.2 AVALIAÇÃO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO NO CRESCIMENTO DE *Rhizobium* spp.

Sacarose (Anidrol), glicerol (Invitrogen<sup>®</sup>) e glicose (Biotec<sup>®</sup>) foram avaliadas como alternativas em substituição ao manitol presente na composição do meio YM, pois também são fontes de carbono utilizadas por *Rhizobium* spp. A sacarose e o glicerol foram escolhidos devido a seus baixos valores. A glicose foi avaliada por ser um dos dois monossacarídeos constituintes da sacarose, fonte de carbono prontamente disponível para *Rhizobium*, que não necessita de hidrólise para ser consumida pelo microrganismo, ao contrário da sacarose. Os meios foram utilizados para o cultivo de ambas as estirpes.

A concentração das fontes de carbono foi igual à do manitol no meio YM modificado, 5 g L<sup>-1</sup>. Os testes foram realizados em triplicata com volume de 100 mL de meio teste em frascos Schott Duran<sup>®</sup> com capacidade para 250 mL. O pH dos meios foi ajustado entre 6,8-7,0. A incubação ocorreu em agitador orbital a 180 rpm e 28 °C por 96 horas. Todo o material utilizado foi previamente esterilizado em autoclave a 121 °C e 1 atm durante 20 minutos. Com exceção da glicose, para se evitar o processo de caramelização e a reação de Maillard, uma solução concentrada de 50 g L<sup>-1</sup> foi filtrada em membrana de nitrocelulose (Merck Millipore) com porosidade de 0,22 µm e adicionada, sob condições assépticas, nos frascos teste com meio cuja a fonte de carbono seria a glicose. As condições de preparo do pré-inóculo seguiram de acordo com o item 4.1.1 e a metodologia para a determinação da concentração de células está descrita no item 4.1.2.

#### 4.3 CURVA DE CRESCIMENTO

A partir do preparo do pré-inóculo descrito no item 4.1.1, *R. tropici* estirpe CIAT 899 e *R. freirei* estirpe PRF 81 foram cultivados em 100 mL de meio YSac (sacarose 5,0 g L<sup>-1</sup>; extrato de levedura 0,4 g L<sup>-1</sup>; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5 g L<sup>-1</sup>; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,2 g L<sup>-1</sup>; NaCl 0,1 g L<sup>-1</sup>), meio no qual a sacarose substitui o manitol presente no meio YM, mantendo-se a

concentração de 5 g L<sup>-1</sup>. Foram utilizados frascos Schott Duran® com capacidade para 250 mL para o cultivo e todo o material utilizado foi previamente esterilizado em autoclave a 121 °C e 1 atm durante 20 minutos. A incubação ocorreu em agitador orbital a 180 rpm e 28 °C. Foram coletadas amostras em diversos tempos de incubação para a construção da curva de crescimento. Para a construção desta curva foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônias por mililitro, de acordo com o método de gotejamento, item 4.1.2.; e a turbidez foi aferida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 600 nm. O tempo de geração (g), parâmetro de crescimento microbiano, que indica o tempo necessário para uma população dobrar o número de células, foi calculado a partir da equação  $N = N_0 2^n$  expressa em termos de  $n$  como (MADIGAN, MARTINKO, PARKER, 2010):

$$n = 3,3 (\log N - \log N_0)$$

Onde:

$N$  = número final de células;

$N_0$  = número inicial de células;

$n$  = número de gerações.

$$g = t n^{-1}$$

Onde:

$g$  = tempo de geração;

$t$  = duração do crescimento exponencial;

$n$  = número de gerações.

Calculou-se, também, a taxa de divisão ( $v$ ), medida do número de gerações formadas, por unidade de tempo, de uma cultura em crescimento exponencial (MADIGAN, MARTINKO, PARKER, 2010):

$$v = 1 / g$$

Onde:

$v$  = taxa de divisão (h<sup>-1</sup>);

$g$  = tempo de geração.

#### 4.4 DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES LÍQUIDAS INOCULANTES

Foram realizados experimentos seguindo-se a metodologia de superfície de resposta e, em sequência, experimentos para comparação entre médias.

##### 4.4.1 Metodologia de Superfície de Resposta

Os experimentos baseados na metodologia de superfície de resposta contaram com planejamento fatorial  $2^3$  e três pontos centrais. A variável resposta avaliada foi a concentração celular em UFC  $\text{mL}^{-1}$ .

O modelo linear foi avaliado com os dados dos 11 pontos experimentais. Foram testados três fatores (variáveis independentes), com dois níveis cada, por análise. Dessa forma, foram analisadas as fontes de carbono, nitrogênio e fósforo, simultaneamente.

As formulações testadas foram preparadas de acordo com o meio YSac e sofreram variações nas concentrações de sacarose, extrato de levedura e fosfato de potássio dibásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), de acordo com a formulação testada. O pH foi ajustado entre 6,8-7,0. O pré-inóculo, preparado de acordo com o item 4.1.1, foi adicionado em frascos Schott Duran® com capacidade para 250 mL e 100 mL de cada formulação, previamente esterilizados em autoclave a 121 °C e 1 atm por 20 minutos. A incubação ocorreu a 180 rpm e 28 °C durante 72 horas. A avaliação da concentração de rizóbios foi realizada em placa, pelo método de gotejamento, como descrito no item 4.1.2.

Foram realizados três experimentos (A, B e C) em sequência, com diferentes concentrações das variáveis analisadas. Após a falta de resposta do experimento A, optou-se pela realização do experimento B e a ausência de resposta do experimento B levou à realização do experimento C.

##### 4.4.1.1 MSR - Experimento A

Valores das variáveis codificadas e originais:

- a) Sacarose: -1 (5  $\text{g L}^{-1}$ ), 0 (15  $\text{g L}^{-1}$ ) e 1 (25  $\text{g L}^{-1}$ );
- b) Extrato de levedura: -1 (0,4  $\text{g L}^{-1}$ ), 0 (1,2  $\text{g L}^{-1}$ ) e 1 (2  $\text{g L}^{-1}$ );
- c)  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ : -1 (0,5  $\text{g L}^{-1}$ ), 0 (1,5  $\text{g L}^{-1}$ ) e 1 (2,5  $\text{g L}^{-1}$ ).

Tabela 2 – Planejamento fatorial  $2^3$  (experimento A) com três pontos centrais para o desenvolvimento de formulações líquidas inoculantes contendo *Rhizobium* spp. para a cultura do feijoeiro. C – fonte de carbono (sacarose), N – fonte de nitrogênio (extrato de levedura) e P – fonte de fósforo (fosfato de potássio dibásico).

Formulação	Variáveis Codificadas			Variáveis Originais (g L <sup>-1</sup> )		
	x <sub>1</sub>	x <sub>2</sub>	x <sub>3</sub>	C	N	P
1a	-1	-1	-1	5	0,4	0,5
2a	1	-1	-1	25	0,4	0,5
3a	-1	1	-1	5	2	0,5
4a	1	1	-1	25	2	0,5
5a	-1	-1	1	5	0,4	2,5
6a	1	-1	1	25	0,4	2,5
7a	-1	1	1	5	2	2,5
8a	1	1	1	25	2	2,5
9a	0	0	0	15	1,2	1,5
10a	0	0	0	15	1,2	1,5
11a	0	0	0	15	1,2	1,5

Fonte: o próprio autor

#### 4.4.1.2 MSR - Experimento B

Valores das variáveis codificadas e originais:

- a) Sacarose: -1 (5 g L<sup>-1</sup>), 0 (25 g L<sup>-1</sup>) e 1 (50 g L<sup>-1</sup>);
- b) Extrato de levedura: -1 (0,4 g L<sup>-1</sup>), 0 (2 g L<sup>-1</sup>) e 1 (4 g L<sup>-1</sup>);
- c) K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: -1 (0,5 g L<sup>-1</sup>), 0 (2,5 g L<sup>-1</sup>) e 1 (5 g L<sup>-1</sup>).

Tabela 3 – Planejamento fatorial  $2^3$  (experimento B) com três pontos centrais para o desenvolvimento de formulações líquidas inoculantes contendo *Rhizobium* spp. para a cultura do feijoeiro. C – fonte de carbono (sacarose), N – fonte de nitrogênio (extrato de levedura) e P – fonte de fósforo (fosfato de potássio dibásico).

Formulação	Variáveis Codificadas			Variáveis Originais (g L <sup>-1</sup> )		
	x <sub>1</sub>	x <sub>2</sub>	x <sub>3</sub>	C	N	P
1b	-1	-1	-1	5	0,4	0,5
2b	1	-1	-1	50	0,4	0,5
3b	-1	1	-1	5	4	0,5
4b	1	1	-1	50	4	0,5
5b	-1	-1	1	5	0,4	5
6b	1	-1	1	50	0,4	5
7b	-1	1	1	5	4	5
8b	1	1	1	50	4	5
9b	0	0	0	25	2	2,5
10b	0	0	0	25	2	2,5
11b	0	0	0	25	2	2,5

Fonte: o próprio autor

## 4.4.1.3 MSR - Experimento C

Valores das variáveis codificadas e originais:

- a) Sacarose: -1 (25 g L<sup>-1</sup>), 0 (35 g L<sup>-1</sup>) e 1 (45 g L<sup>-1</sup>);  
 b) Extrato de levedura: -1 (2 g L<sup>-1</sup>), 0 (3,2 g L<sup>-1</sup>) e 1 (4,4 g L<sup>-1</sup>);  
 c) K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: -1 (2 g L<sup>-1</sup>), 0 (3,5 g L<sup>-1</sup>) e 1 (5 g L<sup>-1</sup>).

Tabela 4 – Planejamento fatorial 2<sup>3</sup> (experimento C) com três pontos centrais para o desenvolvimento de formulações líquidas inoculantes contendo *Rhizobium* spp. para a cultura do feijoeiro. C – fonte de carbono (sacarose), N – fonte de nitrogênio (extrato de levedura) e P – fonte de fósforo (fosfato de potássio dibásico).

Formulação	Variáveis Codificadas			Variáveis Originais (g L <sup>-1</sup> )		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	C	N	P
1c	-1	-1	-1	25	2	2
2c	1	-1	-1	45	2	2
3c	-1	1	-1	25	4,4	2
4c	1	1	-1	45	4,4	2
5c	-1	-1	1	25	2	5
6c	1	-1	1	45	2	5
7c	-1	1	1	25	4,4	5
8c	1	1	1	45	4,4	5
9c	0	0	0	35	3,2	3,5
10c	0	0	0	35	3,2	3,5
11c	0	0	0	35	3,2	3,5

Fonte: o próprio autor

## 4.4.2 Experimentos para Comparação entre Médias

Foram realizados experimentos para a comparação entre as médias de crescimentos, em UFC mL<sup>-1</sup>, obtidas por diferentes formulações. As formulações desenvolvidas partiram do meio YSac.

A preparação do pré-inóculo seguiu o item 4.1.1. As formulações avaliadas apresentaram volume de 100 mL em frascos Schott Duran<sup>®</sup> com capacidade para 250 mL. A incubação ocorreu em agitador orbital a 180 rpm e 28 °C por 72 horas. O pH dos meios foi ajustado entre 6,8-7,0 e os experimentos foram realizados em triplicata. Todo o material utilizado foi previamente esterilizado em autoclave a 121 °C e 1 atm durante 20 minutos. A concentração celular foi estimada, em UFC mL<sup>-1</sup>, como descrito no item 4.1.2.

Foram avaliadas, sequencialmente, as concentrações de extrato de levedura, fosfato de potássio dibásico e sacarose.

#### 4.4.2.1 Extrato de Levedura

A realização do experimento seguiu-se de acordo com o item 4.4.2, descrito acima, onde foram avaliadas diferentes concentrações de extrato de levedura (Acumedia<sup>®</sup>) em meio YSac (Tabela 5).

Tabela 5 – Avaliação de diferentes concentrações de extrato de levedura em meio YSac.

<b>Formulação</b>	<b>Concentração de extrato de levedura (g L<sup>-1</sup>)</b>
Controle (YSac)	0,4
Extrato de levedura 3x	1,2
Extrato de levedura 4x	1,6
Extrato de levedura 5x	2,0
Extrato de levedura 6x	2,4
Extrato de levedura 7x	2,8
Extrato de levedura 8x	3,2

**Fonte:** o próprio autor

#### 4.4.2.2 Fosfato de Potássio Dibásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)

O fosfato de potássio dibásico (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) foi avaliado em diferentes concentrações utilizando como base o meio YSac com extrato de levedura 5x (2,0 g L<sup>-1</sup>).

Tabela 6 – Avaliação de diferentes concentrações de fosfato de potássio dibásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) em meio YSac modificado com extrato de levedura 5x (Ext. lev. 5x) correspondente a concentração de 2,0 g L<sup>-1</sup>.

<b>Formulação</b>	<b>Concentração de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (g L<sup>-1</sup>)</b>
Controle (YSac)	0,50
Ext. lev. 5x	0,50
Ext. lev. 5x + K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2,0x	1,00
Ext. lev. 5x + K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2,5x	1,25
Ext. lev. 5x + K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 3,0x	1,50
Ext. lev. 5x + K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 4,0x	2,00

**Fonte:** o próprio autor

#### 4.4.2.3 Sacarose

A sacarose (Anidrol) foi avaliada utilizando-se concentrações superiores e inferiores a  $5 \text{ g L}^{-1}$ , presente no meio YSac. Extrato de levedura 5x ( $2 \text{ g L}^{-1}$ ) e fosfato de potássio dibásico 2x ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) foram as alterações adicionadas ao meio YSac e analisadas em conjunto com a formulação em desenvolvimento.

Tabela 7 – Avaliação de diferentes concentrações de sacarose em meio YSac modificado com extrato de levedura 5x (Ext. lev. 5x),  $2,0 \text{ g L}^{-1}$ , e fosfato de potássio dibásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2x),  $1 \text{ g L}^{-1}$ .

Formulação	Concentração de sacarose ( $\text{g L}^{-1}$ )
Controle (YSac)	5,0
Ext. lev. 5x + $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 2x + sacarose 0,5x	2,5
Ext. lev. 5x + $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 2x + sacarose 0,8x	4,0
Ext. lev. 5x + $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 2x + sacarose 1,0x	5,0
Ext. lev. 5x + $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 2x + sacarose 1,5x	7,5
Ext. lev. 5x + $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 2x + sacarose 2,0x	10,0
Ext. lev. 5x + $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 2x + sacarose 2,5x	12,5
Ext. lev. 5x + $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 2x + sacarose 3,0x	15,0

**Fonte:** o próprio autor

#### 4.4.2.4 Avaliação da Viabilidade Celular da Formulação Desenvolvida (FORM)

Os meios de cultura YSac (controle) e FORM (sacarose  $5,0 \text{ g L}^{-1}$ ; extrato de levedura  $2,0 \text{ g L}^{-1}$ ;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$   $1,0 \text{ g L}^{-1}$ ;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   $0,2 \text{ g L}^{-1}$ ;  $\text{NaCl}$   $0,1 \text{ g L}^{-1}$ ) foram avaliados em 100 mL de meio em frascos Schott Duran® com capacidade para 250 mL. Foram realizadas análises em triplicata e os meios de cultura tiveram o pH ajustado entre 6,8-7,0. O crescimento dos microrganismos ocorreu em agitador orbital a 180 rpm e  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  por 72 horas, com preparação do pré-inóculo realizada de acordo com o item 4.1.1. A esterilização do material utilizado ocorreu em autoclave a  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  e 1 atm durante 20 minutos.

Após 72 horas de incubação a concentração celular de *Rhizobium* spp. foi estimada como descrito no item 4.1.2. Tubos de centrífuga de 15 mL foram previamente esterilizados, em autoclave a  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  e 1 atm durante 20 minutos e utilizados, sob condições assépticas, para o armazenamento de 8 mL dos meios avaliados.

Os meios YSac e FORM foram mantidos a temperatura de  $26 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  e protegidos da luminosidade solar. A viabilidade celular foi verificada como descrito no item 4.1.2, após 28 dias de armazenamento.

#### 4.4.2.5 Análise da Concentração e Viabilidade Celular de *Rhizobium tropici* Estirpe CIAT 899 em Meio de Cultivo FORM Produzido em Escala Semipiloto

A formulação FORM foi avaliada em escala semipiloto em fermentador Winpact Bench-Top Fermenter FS-01A (Major Science) com volume de trabalho de 6,6 L. Foram adicionados 6 L de formulação FORM no vaso do fermentador, esterilizado em autoclave sob temperatura de 121 °C a 1 atm durante 60 minutos. O pH foi controlado automaticamente com HCl 0,5 M (Synth<sup>®</sup>) e NaOH 1 M (FMaia), mantido a  $6,9 \pm 0,03$ . Utilizou-se antiespumante (DOWFAX<sup>®</sup>) na concentração de 25  $\mu\text{L L}^{-1}$ . Após a introdução do inóculo a incubação ocorreu a 28 °C e 180 rpm durante 48 horas. A aeração empregada foi de 1 vvm utilizando como base os resultados obtidos por Franco et al. (2009).

Culturas estoque de *Rhizobium tropici* estirpe CIAT 899 criopreservadas em meio YM, com 30% de glicerol a -80 °C, foram utilizadas para o crescimento do microrganismo em YM sólido sob incubação de 28 °C durante 72 horas. O cultivo do inóculo ocorreu em meio FORM com agitação de 180 rpm a 28 °C durante 24 horas a partir do microrganismo presente em meio YM sólido. Foram utilizados frascos Schott Duran<sup>®</sup> de 1 L com 600 mL de meio. A esterilização do material foi realizada em autoclave sob temperatura de 121 °C a 1 atm durante 20 minutos. Após o cultivo a concentração do inóculo foi verificada em  $1,11\text{E}+09$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ , de acordo com o procedimento apresentado no item 4.1.2. Todo o volume do inóculo foi adicionado a 6 L de meio FORM no fermentador que, então, apresentou concentração inicial aproximada de  $1,01\text{E}+08$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ .

A concentração celular de *Rhizobium tropici* CIAT 899 foi estimada, após 48 horas de incubação, como descrito no item 4.1.2. Foram utilizados tubos de centrífuga de 15 mL, previamente esterilizados em autoclave a 121 °C e 1 atm durante 20 minutos, para o armazenamento de 8 mL da formulação FORM. Os tubos foram mantidos a temperatura de  $26 \pm 2$  °C e -4 °C protegidos da luminosidade solar. A viabilidade celular foi verificada como descrito no item 4.1.2, após 26 dias de armazenamento.

#### 4.4.3 Avaliação da Influência de Diferentes Componentes no Crescimento e Viabilidade Celular de *Rhizobium tropici* Estirpe CIAT 899 em Meio de Cultivo FORM

Verificou-se a influência de fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), solução de micronutrientes, condicionador orgânico de solo, carboximetilcelulose (CMC) e polivinilpirrolidona (PVP) no crescimento e manutenção da viabilidade celular de *Rhizobium*

*tropici* estirpe CIAT 899 em meio de cultivo FORM. As concentrações de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , solução de micronutrientes e condicionador orgânico de solo, no presente estudo, foram determinadas a partir de testes anteriores. Para CMC e PVP, optou-se por avaliar os aditivos partindo-se de baixas concentrações, de forma a evitar aumentos elevados no custo da produção em uma eventual escala industrial.

As análises ocorreram em 100 mL de meio FORM, cultivados em frascos Schott Duran® com capacidade para 250 mL. O cultivo de *R. tropici* foi realizado a 28 °C e 180 rpm durante 72 horas. O pH dos meios foi ajustado entre 6,8-7,0 e os testes realizados em triplicata. A preparação do pré-inóculo foi realizada segundo o item 4.1.1. Todo o material utilizado foi esterilizado em autoclave a 121 °C e 1 atm durante 20 minutos.

A concentração celular foi avaliada como descrito no item 4.1.2, após a incubação e o armazenamento, mantidos a temperatura de  $26 \pm 2$  °C e protegidos da luminosidade solar. Foram utilizados tubos de centrífuga de 15 mL, previamente esterilizados, em autoclave a 121 °C e 1 atm durante 20 minutos para o armazenamento de 8 mL dos meios.

#### 4.4.3.1 Fosfato de Potássio Monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )

Fosfato de potássio monobásico (Sigma-Aldrich®) foi avaliado em diferentes concentrações na formulação FORM (Tabela 8) quanto à influência no crescimento de *Rhizobium tropici* estirpe CIAT 899 e viabilidade celular após 28 dias de armazenamento.

Tabela 8 – Avaliação de diferentes concentrações de fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) em meio FORM.

<b>Formulações</b>	<b>Concentração (g L<sup>-1</sup>)</b>
FORM	-
FORM + $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0,25	0,25
FORM + $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0,45	0,45
FORM + $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0,65	0,65

**Fonte:** o próprio autor

#### 4.4.3.2 Solução de Micronutrientes

A solução de micronutrientes (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995) foi avaliada em testes anteriores e apresentou melhores resultados em solução diluída na proporção de 1:100 (v/v).

Tabela 9 – Composição da solução de micronutrientes.

<b>Componente</b>	<b>Concentração (g L<sup>-1</sup>)</b>
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O (Vetec)	1,00
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O (Synth <sup>®</sup> )	1,175
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (Dinâmica <sup>®</sup> )	1,40
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O (FMaia)	0,04
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (Synth <sup>®</sup> )	1,20

**Fonte:** o próprio autor

A estimativa da viabilidade celular foi realizada após 35 dias de armazenamento e as concentrações utilizadas seguem na Tabela 10.

Tabela 10 – Avaliação de diferentes concentrações da solução de micronutrientes (Sol. Micro.) em meio FORM.

<b>Formulações</b>	<b>Volume da solução diluída (μL L<sup>-1</sup>)</b>
FORM	-
FORM + Sol. Micro. 1:100 (v/v) 75	75
FORM + Sol. Micro. 1:100 (v/v) 100	100
FORM + Sol. Micro. 1:100 (v/v) 125	125
FORM + Sol. Micro. 1:100 (v/v) 150	150

**Fonte:** o próprio autor

#### 4.4.3.3 Condicionador Orgânico de Solo

O condicionador orgânico de solo avaliado tratou-se do produto Agrolmin<sup>®</sup> (Agrolatino Indústria e Comércio de Adubos e Fertilizantes LTDA) composto por hidróxido de potássio, ureia, turfa e água, segundo o fabricante.

A viabilidade celular foi analisada após 35 dias de armazenamento e as concentrações com melhores resultados foram avaliadas em meio YSac, como descrito no item 4.4.3, após 28 dias de armazenamento.

Tabela 11 – Avaliação de diferentes concentrações do condicionador orgânico de solo em meio FORM.

<b>Formulações</b>	<b>Concentração (mL L<sup>-1</sup>)</b>
FORM	-
FORM + condicionador orgânico de solo 0,05%	0,5
FORM + condicionador orgânico de solo 0,10%	1,0
FORM + condicionador orgânico de solo 0,20%	2,0
FORM + condicionador orgânico de solo 0,40%	4,0
FORM + condicionador orgânico de solo 0,60%	6,0
FORM + condicionador orgânico de solo 0,80%	8,0

**Fonte:** o próprio autor

#### 4.4.3.4 Carboximetilcelulose (CMC)

Carboximetilcelulose sódica de média viscosidade (referência do produto C4888, Sigma-Aldrich®), massa molecular de 250 kDa, foi adicionada em diferentes concentrações na formulação FORM, analisada a sua influência no crescimento de *Rhizobium tropici* estirpe CIAT 899 e viabilidade celular após 28 dias de armazenamento.

Tabela 12 – Avaliação de diferentes concentrações de carboximetilcelulose (CMC) em meio FORM.

<b>Formulações</b>	<b>Concentração (g L<sup>-1</sup>)</b>
FORM	-
FORM + CMC 0,25%	2,5
FORM + CMC 0,50%	5,0
FORM + CMC 1,00%	10,0

**Fonte:** o próprio autor

As concentrações de CMC com melhores resultados na formulação FORM foram, também, avaliadas em meio YSac, após 28 dias de armazenamento, de acordo com o item 4.4.3.

#### 4.4.3.5 Polivinilpirrolidona (PVP)

A polivinilpirrolidona (referência do produto 77627, Sigma-Aldrich®), com partículas de tamanho aproximado de 110 µm, foi avaliada em diferentes concentrações, em relação à influência no crescimento e viabilidade de *R. tropici*, após 28 dias de armazenamento em meio FORM.

Tabela 13 – Avaliação de diferentes concentrações de polivinilpirrolidona (PVP) em meio FORM.

<b>Formulações</b>	<b>Concentração (g L<sup>-1</sup>)</b>
FORM	-
FORM + PVP 0,50%	5,0
FORM + PVP 1,00%	10,0

**Fonte:** o próprio autor

Análise idêntica à realizada em meio FORM foi realizada em meio YSac com a polivinilpirrolidona.

#### 4.4.3.6 Aferição da Concentração e Viabilidade Celular de *Rhizobium tropici* Estirpe CIAT 899 em Meio de Cultivo YSac contendo PVP (5 g L<sup>-1</sup>) Produzido em Escala Semipiloto

O fermentador Winpact Bench-Top Fermenter FS-01A (Major Science) foi utilizado para estudar o crescimento de *Rhizobium tropici* estirpe CIAT 899 em meio de cultura YSac contendo PVP, 5 g L<sup>-1</sup>, com volume de trabalho de 6,6 L. Foram adicionados 6 L de meio de cultura YSac contendo PVP 5 g L<sup>-1</sup> no vaso do fermentador, que foi esterilizado em autoclave sob temperatura de 121 °C a 1 atm durante 60 minutos. O pH foi controlado automaticamente com HCl 0,5 M (Synth<sup>®</sup>) e NaOH 1 M (FMaia), mantido a  $6,9 \pm 0,03$ . Utilizou-se antiespumante (DOWFAX<sup>®</sup>) na concentração de 25 µL L<sup>-1</sup>. Após a introdução do inóculo a incubação ocorreu a 28 °C e 180 rpm durante 48 horas. A aeração empregada foi de 1 vvm baseado em experimentos realizados por Franco et al. (2009).

O pré-inóculo foi obtido a partir de culturas estoque de *Rhizobium tropici* estirpe CIAT 899 criopreservadas em meio YM, com 30% de glicerol a -80 °C que foram crescidas em meio YM sólido sob incubação de 28 °C durante 72 horas. O cultivo do inóculo ocorreu em meio de cultura YSac com PVP 5 g L<sup>-1</sup> em agitação de 180 rpm a 28 °C durante 24 horas a partir do microrganismo presente em meio YM sólido. Foram utilizados frascos Schott Duran<sup>®</sup> de 1 L com 600 mL de meio. A esterilização do material foi realizada em autoclave sob temperatura de 121 °C a 1 atm durante 20 minutos. Após o cultivo a concentração do inóculo foi estimada em 1,00E+09 UFC mL<sup>-1</sup>, de acordo com o procedimento apresentado no item 4.1.2. Todo o volume do inóculo foi adicionado a 6 L de YSac contendo PVP 5 g L<sup>-1</sup> no fermentador que, então, apresentou concentração inicial aproximada de 9,09E+07 UFC mL<sup>-1</sup>.

Após 48 horas de incubação a concentração celular de *Rhizobium tropici* CIAT 899 foi estimada, de acordo com o item 4.1.2. Foram utilizados tubos de centrifuga de 15 mL, previamente esterilizados em autoclave a 121 °C e 1 atm durante 20 minutos, para o armazenamento de 8 mL da formulação. Os tubos foram mantidos a temperatura de  $26 \pm 2$  °C e protegidos da luminosidade solar. A viabilidade celular foi verificada após 30 dias de armazenamento.

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O programa Statistica 7.0 (Statsoft<sup>®</sup>) foi utilizado para a análise dos resultados obtidos pela metodologia de superfície de resposta. O teste da falta de ajuste do modelo foi avaliado por meio da Análise de Variâncias (ANOVA) com  $p \leq 0,05$ .

Para a comparação entre as médias dos fatores foi utilizado o mesmo programa estatístico ao nível de 5% de significância. Foi realizado o teste de Hartley, para a verificação da homogeneidade de variâncias com  $p \leq 0,05$ ; e, em sequência, empregou-se o teste de Tukey para comparação entre as médias das formulações com  $p \leq 0,05$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 AVALIAÇÃO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO NO CRESCIMENTO DE *Rhizobium* spp.

Verificou-se que o crescimento de *Rhizobium tropici* foi significativamente maior na presença de sacarose e manitol, quando comparado com a glicose e o glicerol, que não diferiram significativamente entre si, ao nível de 5 % de significância (Tabela 14).

O crescimento de *R. tropici* em sacarose ( $1,50\text{E}+09$  UFC mL<sup>-1</sup>) apresentou valor numericamente superior, porém, sem diferença estatística em relação ao manitol ( $1,33\text{E}+09$  UFC mL<sup>-1</sup>) utilizado no meio YM. A sacarose permitiu um crescimento maior, de cerca de 2,09 vezes e 1,84 vezes, quando comparada ao glicerol e à glicose, respectivamente.

Tabela 14 – Concentração celular de *Rhizobium tropici* CIAT899 e *Rhizobium freirei* PRF 81 em diferentes fontes de carbono expresso em UFC mL<sup>-1</sup>. Avaliação realizada após 96 horas de crescimento.

Fonte de Carbono	<i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899	<i>Rhizobium freirei</i> PRF 81
	UFC mL <sup>-1</sup>	UFC mL <sup>-1</sup>
Sacarose	$1,50\text{E}+09 \pm 2,01\text{E}+08\text{a}$	$7,78\text{E}+08 \pm 9,07\text{E}+07\text{a}$
Manitol	$1,33\text{E}+09 \pm 7,93\text{E}+07\text{a}$	$7,33\text{E}+08 \pm 1,67\text{E}+08\text{a}$
Glicose	$8,15\text{E}+08 \pm 1,39\text{E}+08\text{b}$	$1,16\text{E}+09 \pm 1,91\text{E}+08\text{a}$
Glicerol	$7,17\text{E}+08 \pm 6,11\text{E}+07\text{b}$	$7,78\text{E}+08 \pm 1,05\text{E}+08\text{a}$
C.V (%)	15,20	20,38

**Fonte:** o próprio autor.

As médias, em triplicata, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), quando seguidas da mesma letra minúscula na coluna.

Para *Rhizobium freirei* PRF 81 as fontes de carbono testadas não apresentaram diferença significativa entre si, ao nível de 5 % de significância (Tabela 14). Portanto, a utilização de glicose, sacarose, glicerol ou manitol no cultivo de *R. freirei* não proporcionou incremento nas concentrações celulares ao final do cultivo na concentração de 5 g L<sup>-1</sup> para esses reagentes.

Estudos realizados por Ormeño e Zúñiga (1998), com o intuito de avaliar alternativas de modificação na composição do meio YM, para a diminuição de custos e viabilizar a produção em escala comercial, não observaram diferença significativa no crescimento de *Rhizobium* sp. PLC213 avaliado na presença de sacarose ou manitol como única fonte de carbono. A concentração obtida em glicerol, no entanto, mostrou-se significativamente inferior em comparação à sacarose e manitol.

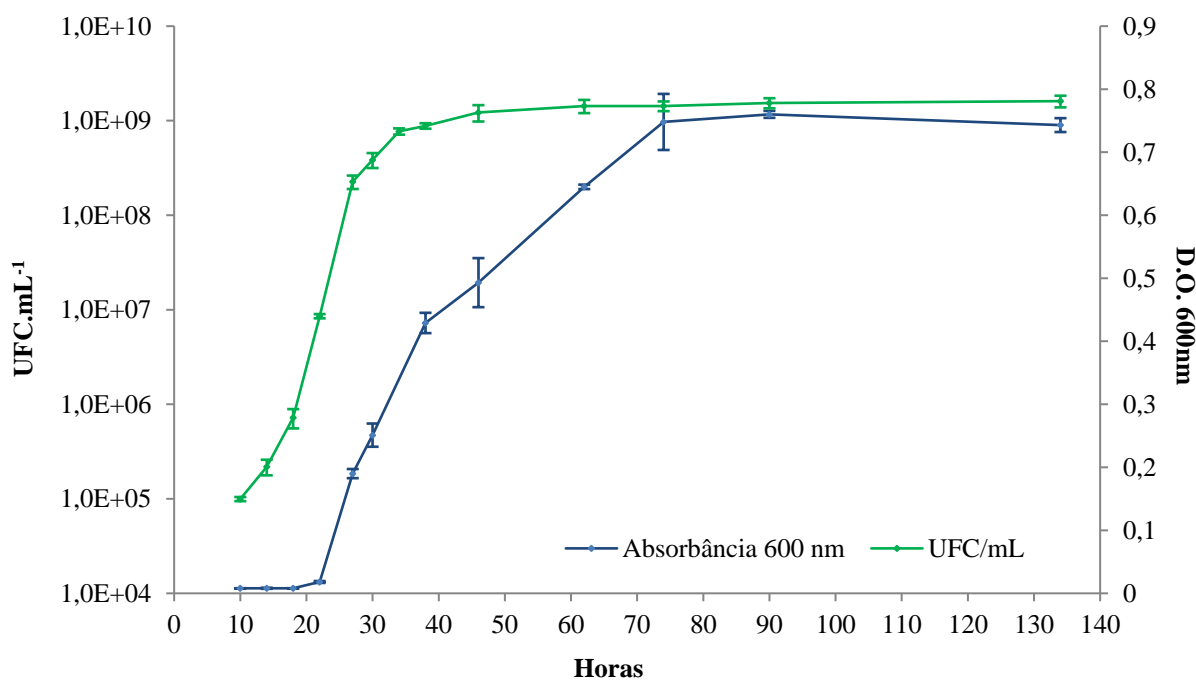
No presente estudo, obtivemos resultados semelhantes com *Rhizobium tropici* estirpe CIAT 899. Em meio YM modificado (YSac), onde manitol foi substituído por sacarose, alcançou-se a concentração de  $1,50\text{E}+09$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  sem a presença de diferença significativa em comparação ao meio YM com  $1,33\text{E}+09$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ . Em relação ao glicerol, observou-se crescimento significativamente inferior quando em comparação com manitol ou sacarose. Em contraste, o crescimento de *Rhizobium freirei* estirpe PRF81 não foi significativamente afetado pelas fontes de carbono avaliadas.

## 5.2 CURVA DE CRESCIMENTO

### 5.2.1 *Rhizobium tropici* CIAT 899

A partir da construção da curva de crescimento, em meio YSac, foi possível determinar as fases de crescimento exponencial e estacionária de *Rhizobium tropici* CIAT 899, expressas em UFC  $\text{mL}^{-1}$ , durante 134 horas de incubação a  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  e 180 rpm (Figura 1).

Figura 1 – Curva de crescimento de *Rhizobium tropici* CIAT 899 em meio YSac obtida durante 134 horas de incubação a  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  e 180 rpm. Onde: UFC  $\text{mL}^{-1}$  - unidades formadoras de colônia por mililitro, D.O.  $_{600\text{nm}}$  - densidade óptica a 600nm.



Fonte: o próprio autor.

O pré-inóculo utilizado para a construção da curva de crescimento do microrganismo apresentou concentração celular de  $4,19E+04$  UFC mL<sup>-1</sup>. O primeiro ponto da curva de crescimento foi obtido após 10 horas de cultivo na concentração de  $9,94E+04 \pm 5,00E+03$  UFC mL<sup>-1</sup>, impossibilitando a observação da fase lag do crescimento bacteriano. Em períodos anteriores às 10 horas de cultivo, a absorbância da formulação foi medida, contudo, a manutenção de valores próximos a 0,008 foram interpretados, de maneira errônea, como ausência de crescimento, sem a necessidade da avaliação da concentração celular. O mesmo erro foi observado na construção da curva de crescimento de *R. freirei* PRF 81.

A concentração celular de *R. tropici* alcançou  $1,22E+09 \pm 2,40E+08$  UFC mL<sup>-1</sup> após 46 horas de cultivo, quando verificou-se o início da fase estacionária. A concentração celular máxima observada foi de, aproximadamente,  $1,61E+09 \pm 2,28E+08$  UFC mL<sup>-1</sup>, após 134 horas de cultivo. Em relação aos parâmetros cinéticos, o tempo de geração (g) de *Rhizobium tropici* CIAT 899, em crescimento exponencial, foi de 1,87 horas e a taxa de divisão (v) foi de  $0,53$  h<sup>-1</sup>.

Em comparação a *R. freirei* PRF 81, *R. tropici* CIAT 899 alcançou a fase estacionária em menor tempo. Mesmo na ausência da fase lag na curva de crescimento de ambas as estirpes de *Rhizobium* spp., as curvas obtidas foram utilizadas para a determinação do início da fase estacionária e foram empregadas como base de referência para a determinação do tempo de cultivo dos microrganismos em experimentos posteriores, realizados durante 72 horas de incubação a 28 °C e 180 rpm.

Em *R. tropici* CIAT 899 o aumento da absorbância não ocorreu de forma acentuada. Baseado na contagem de UFC mL<sup>-1</sup>, observou-se que o final do crescimento exponencial ocorreu ao redor de 46 horas de cultivo, com densidade óptica de 0,493 e concentração de  $1,22E+09 \pm 2,40E+08$  UFC mL<sup>-1</sup>. Após 74 horas de incubação a D.O.<sub>600nm</sub> alcançou 0,748 com concentração de  $1,43E+09 \pm 1,68E+08$  UFC mL<sup>-1</sup>. Neste estudo, embora não se tenha avaliado a produção de EPS, os aumentos nos valores de D.O. logo após o final da fase exponencial, sem incrementos correspondentes no número de células, sugerem a ocorrência da produção de exopolissacarídeos (EPS) no meio de cultura ou de outros compostos que podem contribuir para o aumento dos valores de absorbância no comprimento de onda de 600 nm.

Embora os dados não sejam mostrados na Figura 1, a incubação de *R. tropici* em agitador orbital prolongou-se até 59 dias, quando foi verificada a concentração de  $6,05E+08 \pm 5,56E+06$  UFC mL<sup>-1</sup>. Verificou-se a concentração de  $1,03E+09 \pm 7,78E+07$  UFC mL<sup>-1</sup> aos 29

dias de cultivo, sugerindo taxa de morte celular pequena durante o longo período de incubação.

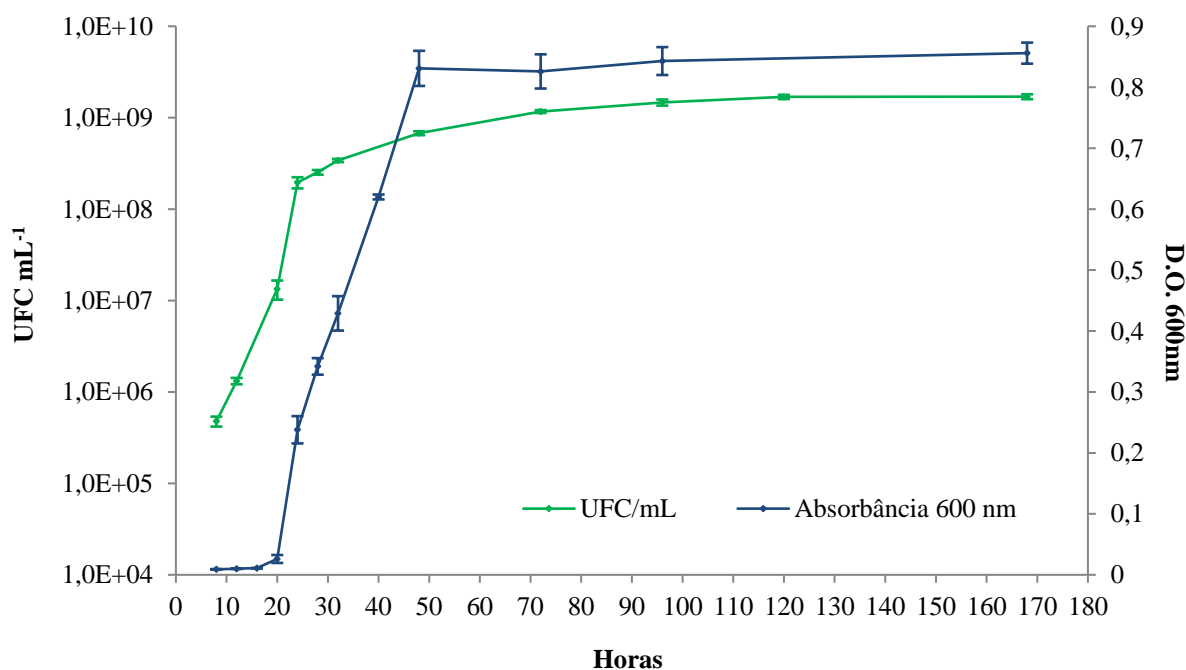
### 5.2.2 *Rhizobium freirei* PRF 81

A curva de crescimento de *Rhizobium freirei* PRF 81 foi obtida em meio YSac, ao longo de 168 horas de incubação a 28 °C e 180 rpm (Figura 2).

O primeiro ponto da curva de crescimento, obtido após 8 horas do início do cultivo, apresentou concentração celular de  $4,78E+05 \pm 5,95E+04$  UFC mL<sup>-1</sup>, partindo-se de um pré-inóculo de concentração  $1,16E+04$  UFC mL<sup>-1</sup>. Não foi possível observar a fase lag.

Se avaliado pelo número de UFC mL<sup>-1</sup>, notou-se um período de crescimento lento entre 24 e 72 horas, possivelmente, transição entre o final da fase exponencial e início da fase estacionária, onde as concentrações celulares correspondentes foram de  $1,96E+08 \pm 2,74E+07$  UFC mL<sup>-1</sup> e  $1,17E+09 \pm 4,29E+07$  UFC mL<sup>-1</sup>, respectivamente. A maior concentração celular de *Rhizobium freirei* observada foi de  $1,69E+09 \pm 9,09E+07$  UFC mL<sup>-1</sup>, após 120 horas de cultivo.

Figura 2 – Curva de crescimento de *Rhizobium freirei* PRF 81 em meio YSac obtida durante 168 horas de incubação a 28 °C e 180 rpm. Onde: UFC mL<sup>-1</sup> - unidades formadoras de colônia por mililitro, D.O. 600nm - densidade óptica a 600nm.



Fonte: o próprio autor.

Em relação aos parâmetros de crescimento microbiano, obteve-se tempo de geração (g) de 1,86 horas e taxa de divisão (v) de  $0,54 \text{ h}^{-1}$  para *R. freirei* PRF 81, nas condições avaliadas, em crescimento exponencial.

O tempo de geração (g) descrito na literatura para *Rhizobium*, bactéria de crescimento considerado rápido, ocorre em torno de 3 horas, sob condições ótimas de temperatura, próximas a  $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$  (BURTON, 1984). Experimentos realizados em meio YM a  $23 \text{ }^{\circ}\text{C}$  e 150 rpm evidenciaram tempo de geração de 3,19 horas para *R. tropici* CIAT 899 (MOUKOUMI et al., 2013). No presente estudo, o tempo de geração observado para *R. tropici* CIAT 899 (1,87 horas) e *R. freirei* PRF81 (1,86 horas), em meio YSac a  $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$  e 180 rpm, encontrou-se abaixo destes valores. A ausência de pontos na curva de crescimento logo após o início da inoculação, que serviria de referência para a observação da fase lag e início da fase exponencial, pode ter contribuído para a obtenção de menores valores de tempo de geração. Contudo, a agitação em rotações mais elevadas e, principalmente, a temperatura mais elevada, visto que *R. tropici* e *R. freirei* são rizóbios tropicais, podem também ter influenciado no resultado.

Foi verificado que *R. freirei*, após crescido em meio YSac e armazenado, teve suas células decantadas no fundo do frasco formando uma espécie de biofilme que, mesmo após homogeneização em vórtex, não se desfez por completo. No entanto, não foi avaliado se haveria diferença significativa na contagem de células devido a esse fenômeno. O mesmo não foi observado em *R. tropici* CIAT 899.

Em *R. freirei* PRF 81 o aumento da absorvância ocorreu de forma acentuada até 48 horas de incubação, D.O.<sub>600nm</sub> de 0,831 ao alcançar concentração de  $6,78\text{E}+08 \pm 3,27\text{E}+07$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  e continuou elevada até o final do período analisado. Depois do período onde o crescimento exponencial ficou mais evidente, após 24 horas de incubação, a densidade óptica foi de 0,238 e concentração de  $1,96\text{E}+08 \pm 2,74\text{E}+07$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ . Novamente, embora não se tenha avaliado a produção de EPS, os aumentos nos valores de D.O. logo após o final da fase exponencial, sem incrementos correspondentes no número de células, sugerem a ocorrência da produção de exopolissacarídeos (EPS) no meio de cultura e outras substâncias que podem contribuir para o aumento da D.O.<sub>600nm</sub>.

*R. freirei* PRF 81 também apresentou baixa taxa de morte celular ao longo de 18 dias de incubação, quando verificou-se a concentração de  $1,46\text{E}+09 \pm 8,43\text{E}+07$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ . A avaliação da concentração celular de *R. freirei* não ultrapassou 18 dias de incubação, pois análises da influência de diferentes concentrações de sacarose, fosfato de potássio dibásico e extrato de levedura (dados não mostrados) sobre o crescimento de *R. freirei* PRF 81 não

mostraram incrementos superiores aos valores observados no crescimento de *R. tropici* nas mesmas condições. A partir dessas observações, optou-se por trabalhar, inicialmente, com o desenvolvimento de formulações líquidas inoculantes contendo *R. tropici* e a curva de crescimento *R. freirei* foi interrompida.

### 5.3 DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES LÍQUIDAS INOCULANTES

#### 5.3.1 Metodologia de Superfície de Resposta

##### 5.3.1.1 MSR - Experimento A

Tabela 15 – Concentração celular, em UFC mL<sup>-1</sup>, para o planejamento fatorial 2<sup>3</sup> (experimento A) com três pontos centrais. C – fonte de carbono (sacarose), N – fonte de nitrogênio (extrato de levedura) e P – fonte de fósforo (fosfato de potássio dibásico). Avaliação realizada após 72 horas de crescimento.

Formulação	Variáveis Codificadas			Variáveis Originais (g L <sup>-1</sup> )			Variável Resposta (UFC mL <sup>-1</sup> )
	x <sub>1</sub>	x <sub>2</sub>	x <sub>3</sub>	C	N	P	
1 <sup>a</sup>	-1	-1	-1	5	0,4	0,5	1,56E+09
2 <sup>a</sup>	1	-1	-1	25	0,4	0,5	1,78E+09
3 <sup>a</sup>	-1	1	-1	5	2	0,5	3,56E+09
4 <sup>a</sup>	1	1	-1	25	2	0,5	2,67E+09
5 <sup>a</sup>	-1	-1	1	5	0,4	2,5	1,81E+09
6 <sup>a</sup>	1	-1	1	25	0,4	2,5	3,11E+09
7 <sup>a</sup>	-1	1	1	5	2	2,5	2,78E+09
8 <sup>a</sup>	1	1	1	25	2	2,5	2,22E+09
9 <sup>a</sup>	0	0	0	15	1,2	1,5	3,11E+09
10 <sup>a</sup>	0	0	0	15	1,2	1,5	2,11E+09
11 <sup>a</sup>	0	0	0	15	1,2	1,5	2,00E+09

Fonte: o próprio autor

De acordo com as condições utilizadas no desenvolvimento de formulações líquidas de inoculantes contendo *Rhizobium tropici* CIAT 899, a concentração celular variou de 1,56E+09 a 3,56E+09 UFC mL<sup>-1</sup>. A variável resposta apresentou pequena variação nos pontos centrais, inferindo uma boa repetibilidade do processo.

A análise da superfície de resposta iniciou admitindo-se que a região investigada fosse uma função linear dos fatores e estimada pela equação:

$$y = \beta_0 + \beta_{x_1} + \beta_{x_2} + \beta_{x_3} + \beta_{x_1x_2} + \beta_{x_1x_3} + \beta_{x_2x_3}$$

Foi possível aferir os coeficientes do modelo e nenhum dos parâmetros (sacarose, extrato de levedura, fosfato de potássio dibásico ou suas interações) foi significativo (Tabela 16). O modelo de primeira ordem, ajustado para as variáveis codificadas, não pode ser descrito.

A análise de variância (ANOVA) sugeriu que nenhum dos fatores apresentou efeitos principais importantes, não houve interação ou evidências da falta de ajuste para a curvatura na resposta da região explorada. A porcentagem de variação explicada ( $R^2$ ) foi de 67 %.

Tabela 16 – Coeficiente de regressão e valores de  $p$  para planejamento fatorial com pontos centrais (experimento A).

Fator	Coeficiente de Regressão	p - valor
Média	2,43E+09	0,0001
Sacarose	8,75E+06	0,9590
Extrato de levedura	3,71E+08	0,0812
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4,38E+07	0,7982
Sacarose x Extrato de levedura	-3,71E+08	0,0812
Sacarose x K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,76E+08	0,3328
Extrato de levedura x K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-3,51E+08	0,0933

Fonte: o próprio autor

No experimento A utilizaram-se as concentrações de sacarose, extrato de levedura e fosfato de potássio dibásico presentes no meio YSac nos níveis baixos (-1), como base para a otimização da formulação que não foi verificada, uma vez que não foram observados efeitos significativos dos fatores pela análise de variância.

### 5.3.1.2 MSR - Experimento B

No segundo planejamento fatorial com a adição de pontos centrais foi verificado que a concentração celular de *Rhizobium tropici* CIAT 899 compreendeu valores entre 1,00E+09 a 3,11E+09 UFC mL<sup>-1</sup>. A repetibilidade do processo foi considerada boa devido à pequena variação apresentada pelos pontos centrais (Tabela 17).

Tabela 17 – Concentração celular, em UFC mL<sup>-1</sup>, para o planejamento fatorial 2<sup>3</sup> (experimento B) com três pontos centrais. C – fonte de carbono (sacarose), N – fonte de nitrogênio (extrato de levedura) e P – fonte de fósforo (fosfato de potássio dibásico). Avaliação realizada após 72 horas de crescimento.

Formulação	Variáveis Codificadas			Variáveis Originais (g L <sup>-1</sup> )			Variável Resposta (UFC mL <sup>-1</sup> )
	x <sub>1</sub>	x <sub>2</sub>	x <sub>3</sub>	C	N	P	
1b	-1	-1	-1	5	0,4	0,5	1,78E+09

2b	1	-1	-1	50	0,4	0,5	1,00E+09
3b	-1	1	-1	5	4	0,5	3,11E+09
4b	1	1	-1	50	4	0,5	2,11E+09
5b	-1	-1	1	5	0,4	5	1,89E+09
6b	1	-1	1	50	0,4	5	1,89E+09
7b	-1	1	1	5	4	5	1,89E+09
8b	1	1	1	50	4	5	2,00E+09
9b	0	0	0	25	2	2,5	2,67E+09
10b	0	0	0	25	2	2,5	2,22E+09
11b	0	0	0	25	2	2,5	1,89E+09

**Fonte:** o próprio autor

Os coeficientes de regressão do modelo foram determinados e nenhum dos parâmetros avaliados (sacarose, extrato de levedura, fosfato de potássio dibásico ou suas interações) foi significativo (Tabela 18). O modelo de primeira ordem, ajustado para as variáveis codificadas, não pode ser descrito.

Não foram observados efeitos principais importantes em nenhum dos fatores, interação ou evidência de falta de ajuste para a curvatura, segundo a análise de variância. A porcentagem de variação explicada ( $R^2$ ) foi próxima de 67 %.

Tabela 18 – Coeficiente de regressão e valores de  $p$  para o planejamento fatorial com pontos centrais (experimento B).

<b>Fator</b>	<b>Coeficiente de Regressão</b>	<b>p - valor</b>
Média	2,04E+09	0,0000
Sacarose	-2,09E+08	0,1763
Extrato de levedura	3,19E+08	0,0664
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-4,12E+07	0,7621
Sacarose x Extrato de levedura	-1,38E+07	0,9192
Sacarose x K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,36E+08	0,1370
Extrato de levedura x K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-2,91E+08	0,0840

**Fonte:** o próprio autor

No experimento B foram utilizadas as concentrações das fontes de carbono, nitrogênio e fósforo presentes no meio YSac como nível baixo (-1), concentrações cinco vezes maiores no ponto central (0) e concentrações 10 vezes maiores no nível alto. Mantiveram-se as proporções de CNP presentes no meio YSac, como base para otimização, porém, novamente não foram observados efeitos principais ou interações.

## 5.3.1.3 MSR - Experimento C

Foram observadas concentrações celulares entre 1,56E+09 e 4,56E+09 UFC mL<sup>-1</sup> nas formulações avaliadas para *Rhizobium tropici* CIAT 899. A pequena variação nos pontos centrais da variável resposta indicou uma boa repetibilidade do processo (Tabela 19).

Os coeficientes de regressão do modelo foram aferidos e verificou-se que os parâmetros K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e a interação entre K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e extrato de levedura foram significativos. O modelo de primeira ordem, ajustado para as variáveis codificadas, foi descrito da seguinte forma:

$$y^{\wedge} = 2,74E+09 + 5,96E+08x_3 - 5,14E+08x_2x_3$$

Tabela 19 – Concentração celular, em UFC mL<sup>-1</sup>, para o planejamento fatorial 2<sup>3</sup> (experimento C) com três pontos centrais. C – fonte de carbono (sacarose), N – fonte de nitrogênio (extrato de levedura) e P – fonte de fósforo (fosfato de potássio dibásico). Avaliação realizada após 72 horas de crescimento.

Formulação	Variáveis Codificadas			Variáveis Originais (g L <sup>-1</sup> )			Variável Resposta (UFC mL <sup>-1</sup> )
	x <sub>1</sub>	x <sub>2</sub>	x <sub>3</sub>	C	N	P	
1c	-1	-1	-1	25	2	2	1,56E+09
2c	1	-1	-1	45	2	2	1,56E+09
3c	-1	1	-1	25	4,4	2	2,89E+09
4c	1	1	-1	45	4,4	2	2,00E+09
5c	-1	-1	1	25	2	5	3,00E+09
6c	1	-1	1	45	2	5	4,56E+09
7c	-1	1	1	25	4,4	5	3,00E+09
8c	1	1	1	45	4,4	5	2,22E+09
9c	0	0	0	35	3,2	3,5	3,00E+09
10c	0	0	0	35	3,2	3,5	3,00E+09
11c	0	0	0	35	3,2	3,5	3,33E+09

Fonte: o próprio autor

Tabela 20 – Coeficiente de regressão e valores de *p* para o planejamento fatorial com pontos centrais (experimento C).

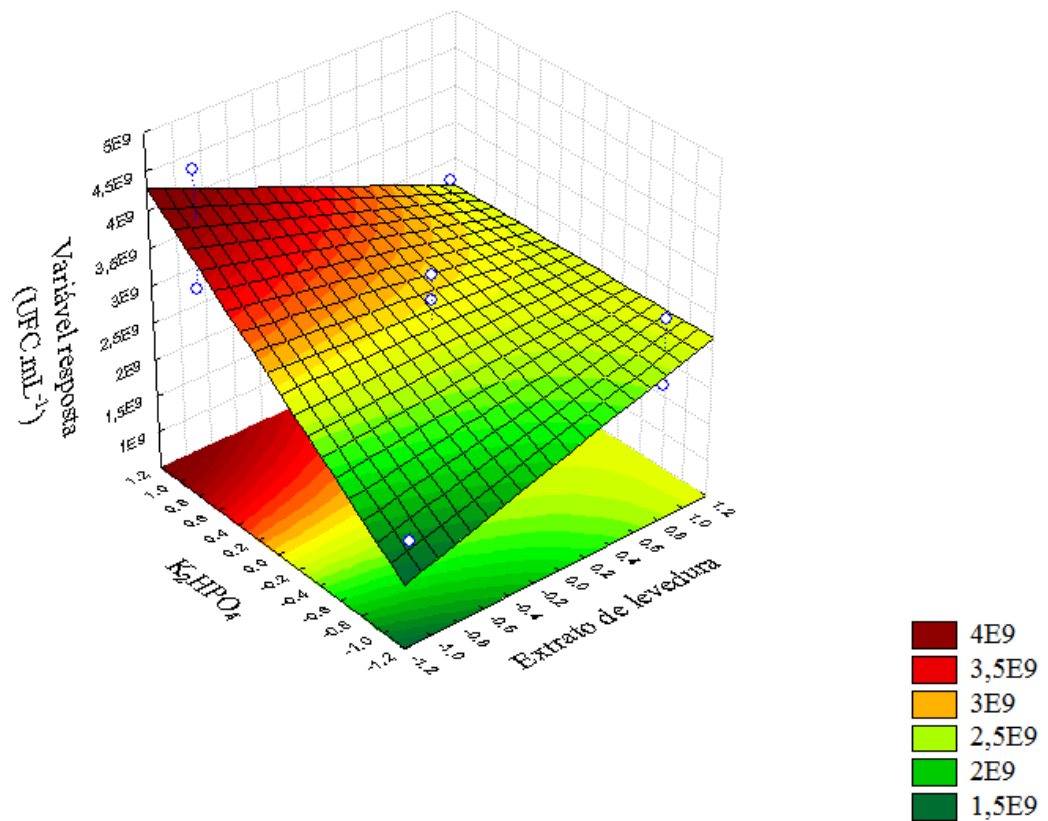
Fator	Coeficiente de Regressão	p - valor
Média	2,74E+09	0,0000
Sacarose	-1,38E+07	0,9388
Extrato de levedura	-7,12E+07	0,6937
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,96E+08	0,0239
Sacarose x Extrato de levedura	-4,04E+08	0,0744
Sacarose x K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,09E+08	0,2825
Extrato de levedura x K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-5,14E+08	0,0379

Fonte: o próprio autor

Resultados da análise de variância (ANOVA) indicaram que o fator  $K_2HPO_4$  ( $p = 0,0239$ ) apresentou efeito principal importante. Interação significativa entre  $K_2HPO_4$  e extrato de levedura ( $p = 0,0379$ ) foi verificada (Tabela 20). Não houve evidências da falta de ajuste para a curvatura na resposta da região explorada, em outras palavras, a superfície de resposta é descrita satisfatoriamente pelo modelo. A porcentagem de variação explicada ( $R^2$ ) foi próxima de 77 %. A superfície de resposta e as curvas de níveis foram obtidas (Figuras 3 e 4).

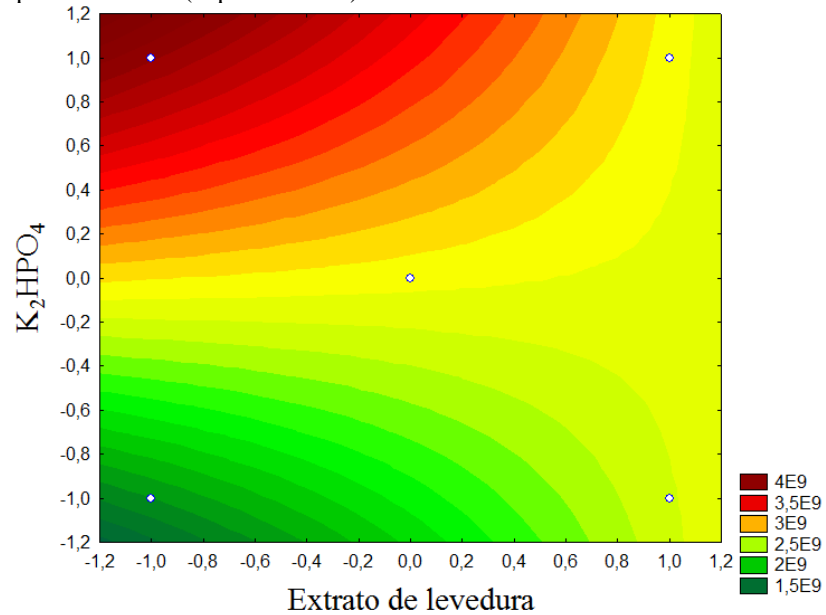
A superfície de resposta mostrou-se como um plano inclinado em relação aos eixos com sentido ascendente da direita para a esquerda. Observou-se que maiores valores de UFC  $mL^{-1}$  seriam obtidos deslocando-se a região experimental para menores valores de extrato de levedura e maiores valores de  $K_2HPO_4$  (efeito antagônico dos fatores).

Figura 3 – Superfície de resposta para o planejamento fatorial  $2^3$  com 3 pontos centrais (experimento C).



Fonte: o próprio autor.

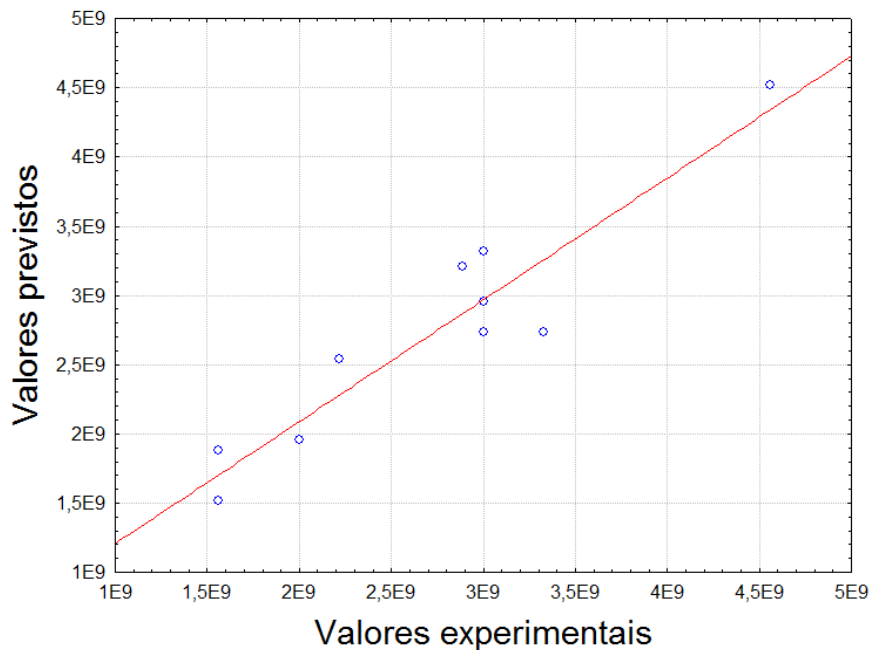
Figura 4 – Curvas de níveis do terceiro planejamento fatorial  $2^3$  com três pontos centrais (experimento C).



Fonte: o próprio autor.

Verificou-se, no gráfico de valores experimentais contra valores previstos (Figura 5), que os pontos foram distribuídos ao acaso próximos da linha, indicando boa concordância e que o modelo não demonstrou falta de ajuste significativo.

Figura 5 – Gráfico dos valores experimentais contra valores previstos para o modelo no planejamento fatorial  $2^3$  com 3 pontos centrais (experimento C).



Fonte: o próprio autor.

No experimento C foram utilizadas concentrações maiores nos três fatores avaliados no nível baixo, aumentando a quantidade das concentrações, na busca por algum efeito significativo.

Caso a MSR fosse continuada, o modelo  $y^{\wedge} = 2,74E+09 + 5,96E+08x_3 - 5,14E+08x_2x_3$  seria utilizado para o deslocamento. Como somente o fator 3 (variável  $K_2HPO_4$ ) apresentou efeito significativo, segundo a análise de variância (ANOVA), então as alterações nas concentrações de sacarose e extrato de levedura não ocorreriam e a concentração da qual partiria o deslocamento para a região do ótimo seria a evidenciada no ponto central: sacarose  $35 \text{ g L}^{-1}$ , extrato de levedura  $3,2 \text{ g L}^{-1}$  e fosfato de potássio dibásico  $3,5 \text{ g L}^{-1}$ .

Concentrações elevadas dos três fatores analisados resultaram em incrementos pequenos na concentração celular de *Rhizobium tropici* CIAT 899, de forma que a MSR não permitiu a otimização esperada no desenvolvimento de formulações líquidas inoculantes contendo este microrganismo. Optou-se, então, pela realização de experimentos de comparação entre médias, para a obtenção de maiores concentrações celulares de *R. tropici* CIAT com concentrações otimizadas de sacarose, extrato de levedura e fosfato de potássio dibásico, pois os resultados obtidos pela MSR foram abaixo do esperado.

### 5.3.2 Experimentos para Comparação entre Médias

#### 5.3.2.1 Extrato de Levedura

A adição, ao meio de cultura, de uma concentração de extrato de levedura cinco vezes superior àquela do meio YSac permitiu crescimento estatisticamente superior de *Rhizobium tropici* em relação às concentrações 8x, 4x, 3x e o meio YSac (controle). As concentrações 7x e 6x não apresentaram diferença estatística em relação à 5x. A concentração de  $2,0 \text{ g L}^{-1}$  (5x), apresentou a maior produção celular:  $4,44E+09 \pm 3,33E+08 \text{ UFC mL}^{-1}$ , e incrementou o crescimento de *Rhizobium tropici* em 190,56 %, quando comparada ao meio YSac (Tabela 21). A concentração 5x foi mantida nos testes posteriores por permitir a obtenção da maior concentração celular com menor utilização de extrato de levedura se comparado às concentrações 7x e 6x.

Tabela 21 – Concentração celular de *Rhizobium tropici* CIAT 899 em resposta a diferentes concentrações de extrato de levedura em meio YSac.

Formulação	Concentração de extrato de levedura (g L <sup>-1</sup> )	UFC mL <sup>-1</sup>
Extrato de levedura 5x	2,0	4,44E+09 ± 3,33E+08a
Extrato de levedura 7x	2,8	3,56E+09 ± 2,22E+08ab
Extrato de levedura 6x	2,4	3,26E+09 ± 2,92E+08abc
Extrato de levedura 8x	3,2	2,48E+09 ± 4,29E+08bc
Controle (YSac)	0,4	2,33E+09 ± 1,11E+08bc
Extrato de levedura 4x	1,6	2,30E+09 ± 3,19E+08c
Extrato de levedura 3x	1,2	2,26E+09 ± 2,28E+08c
	C.V (%)	13,45

**Fonte:** o próprio autor

As médias, em triplicata, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), quando seguidas da mesma letra minúscula na coluna.

Outras fontes de nitrogênio foram avaliadas no crescimento de *R. tropici* CIAT 899, contudo não foram superiores aos resultados obtidos empregando-se extrato de levedura (dados não mostrados). Decidiu-se, então, por otimizar a formulação utilizando-se somente extrato de levedura como fonte de nitrogênio, por se tratar de um componente rico em outras substâncias como vitaminas e minerais, avaliados como importantes na manutenção da viabilidade celular.

### 5.3.2.2 Fosfato de Potássio Dibásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)

Em relação ao fosfato de potássio dibásico, a única diferença estatística observada ocorreu entre a concentração de 1 g L<sup>-1</sup> (2x) e o meio controle YSac, com 0,5 g L<sup>-1</sup>. Todas as outras concentrações não apresentaram diferença significativa entre si, não otimizando o crescimento celular (Tabela 22).

A concentração de 1 g L<sup>-1</sup> proporcionou a obtenção da maior produção celular de *Rhizobium tropici* CIAT 899: 3,74E+09 ± 6,44E+08 UFC mL<sup>-1</sup>. Assim, nota-se que o crescimento celular aumentou 174 % com a otimização da concentração de extrato de levedura e 133 % com a otimização da concentração de fosfato de potássio dibásico em relação ao meio YSac. O incremento total observado foi de 232 %.

Tabela 22 – Concentração celular de *Rhizobium tropici* CIAT 899 em resposta a diferentes concentrações de fosfato de potássio dibásico ( $K_2HPO_4$ ) em meio YSac modificado com extrato de levedura 5x (Ext. lev. 5x), correspondente à concentração de 2,0 g L<sup>-1</sup>.

Formulação	Concentração de $K_2HPO_4$ (g L <sup>-1</sup> )	UFC mL <sup>-1</sup>
Ext. lev. 5x + $K_2HPO_4$ 2,0x	1,00	3,74E+09 ± 6,44E+08a
Ext. lev. 5x + $K_2HPO_4$ 3,0x	1,50	3,04E+09 ± 3,19E+08ab
Ext. lev. 5x	0,50	2,81E+09 ± 3,43E+08ab
Ext. lev. 5x + $K_2HPO_4$ 4,0x	2,00	2,74E+09 ± 2,78E+08ab
Ext. lev. 5x + $K_2HPO_4$ 2,5x	1,25	2,67E+09 ± 2,72E+08ab
Controle (YSac)	0,50	1,61E+09 ± 5,56E+07b
	C.V (%)	16,29

**Fonte:** o próprio autor

As médias, em triplicata, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), quando seguidas da mesma letra minúscula na coluna.

A concentração celular obtida com fosfato de potássio dibásico 2x não apresentou diferença estatística quando comparada ao meio YSac + extrato de levedura 5x. No entanto, esse incremento, numericamente expressivo, obtido com o aumento mínimo da concentração de  $K_2HPO_4$ , foi empregado nas avaliações posteriores.

### 5.3.2.3 Sacarose

A sacarose na concentração de 5,0 g L<sup>-1</sup> não apresentou diferença significativa em relação às concentrações de 2,5; 4,0; 7,5; 10,0; e 15,0 g L<sup>-1</sup> somente a concentração de 12,5 g L<sup>-1</sup> levou ao crescimento significativamente inferior das bactérias (Tabela 23). Resolveu-se, então, manter a concentração de 5 g L<sup>-1</sup>, pois mesmo não observando diferença significativa em comparação às outras concentrações, foi numericamente superior.

Tabela 23 – Concentração celular de *Rhizobium tropici* CIAT 899 em resposta a diferentes concentrações de sacarose (Sac.) em meio YSac modificado com extrato de levedura 5x (Ext. lev. 5x), 2,0 g L<sup>-1</sup>, e fosfato de potássio dibásico ( $K_2HPO_4$  2x), 1 g L<sup>-1</sup>.

Formulação	Concentração de sacarose (g L <sup>-1</sup> )	UFC mL <sup>-1</sup>
Ext. lev. 5x + $K_2HPO_4$ 2x + Sac. 1,0x	5,0	3,74E+09 ± 6,44E+08a
Ext. lev. 5x + $K_2HPO_4$ 2x + Sac. 2,0x	10,0	3,11E+09 ± 1,81E+08ab
Ext. lev. 5x + $K_2HPO_4$ 2x + Sac. 3,0x	15,0	2,93E+09 ± 1,05E+08abc
Ext. lev. 5x + $K_2HPO_4$ 2x + Sac. 0,8x	4,0	2,78E+09 ± 3,27E+08abc
Ext. lev. 5x + $K_2HPO_4$ 2x + Sac. 0,5x	2,5	2,67E+09 ± 5,56E+08abc
Ext. lev. 5x + $K_2HPO_4$ 2x + Sac. 1,5x	7,5	2,50E+09 ± 5,56E+07abc
Ext. lev. 5x + $K_2HPO_4$ 2x + Sac. 2,5x	12,5	1,89E+09 ± 1,11E+08bc
Controle (YSac)	5,0	1,61E+09 ± 5,56E+07c
	C.V (%)	15,92

**Fonte:** o próprio autor

As médias, em triplicata, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), quando seguidas da mesma letra minúscula na coluna.

Passou-se a denominar “FORM” o meio de cultura YSac, com as variáveis extrato de levedura, fosfato de potássio dibásico e sacarose, avaliadas e otimizadas. FORM apresentou a seguinte composição: sacarose  $5,0 \text{ g L}^{-1}$ ; extrato de levedura  $2,0 \text{ g L}^{-1}$ ;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$   $1,0 \text{ g L}^{-1}$ ;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   $0,2 \text{ g L}^{-1}$  e  $\text{NaCl}$   $0,1 \text{ g L}^{-1}$ .

#### 5.3.2.4 Avaliação da Viabilidade Celular da Formulação Desenvolvida (FORM)

A concentração celular de *Rhizobium tropici* CIAT 899 obtida por FORM foi superior à observada no meio YSac, porém, verificou-se que a viabilidade celular em FORM foi oito vezes inferior que no meio controle YSac, que, embora apresentasse menor concentração inicial ( $2,41\text{E}+09 \pm 2,28\text{E}+08 \text{ UFC mL}^{-1}$ ), após 28 dias de armazenamento superou o número de bactérias por mililitro presente em FORM (Tabela 24).

Os valores de pH, avaliados antes e após armazenamento de 17 dias foram de: 6,13-6,00 ( $\Delta\text{pH } 0,13$ ) para o meio Ysac, e pH 6,61-5,95 ( $\Delta\text{pH } 0,66$ ) para o meio FORM. Embora os valores finais de pH apresentem valores próximos, quando considerado o valor de  $\Delta\text{pH}$  percebe-se que FORM indicou variação de pH 5 vezes maior que a observada em YSac após 17 dias de armazenamento.

Os resultados sugerem que a maior variação na acidificação do meio FORM, já evidente após 17 dias de armazenamento, tenha contribuído para a drástica redução da viabilidade celular de *R. tropici* CIAT 899, quando comparada a YSac, após 28 dias de armazenamento. Nos experimentos iniciais, o pH das formulações em desenvolvimento de *R. tropici* foi medido e não observou-se influência sobre o crescimento do microrganismo (dados não mostrados). No entanto, de forma equivocada, o valor do pH não foi medido após o armazenamento nos demais experimentos, o que impossibilitou maiores interpretações dos resultados.

Outro fator que pode ter influenciado na redução da viabilidade celular foi a forma de armazenamento. Na tentativa de manter-se a temperatura média de  $26 \text{ }^\circ\text{C}$  com pequenas variações, as amostras foram colocadas em caixas térmicas de isopor, contudo, além de impedir as trocas térmicas, também impedem trocas gasosas que podem ter contribuído para a redução da disponibilidade de oxigênio aos microrganismos, acarretando na diminuição da viabilidade celular.

Tabela 24 – Concentração celular de *Rhizobium tropici* CIAT 899, após incubação de 72 horas, e da viabilidade celular, após 28 dias de armazenamento, no meio de cultura FORM em comparação com YSac.

Meio de cultivo	UFC mL <sup>-1</sup>		Redução da viabilidade celular (vezes)
	Após 72 horas de crescimento	Após 28 dias de armazenamento	
FORM	3,81E+09 ± 5,16E+08a	6,67E+07 ± 1,13E+05b	57,1
YSac	2,41E+09 ± 2,28E+08b	3,39E+08 ± 2,78E+07a	7,1
C.V (%)	15,71	13,79	

Fonte: o próprio autor

### 5.3.2.5 Análise da Concentração e Viabilidade Celular de *Rhizobium tropici* Estirpe CIAT 899 em Meio de Cultivo FORM Produzido em Escala Semipiloto

Em relação à formulação FORM produzida em escala semipiloto, destacou-se a alta concentração celular alcançada  $1,28E+10 \pm 2,52E+09$  UFC mL<sup>-1</sup>, concentração 336 % superior à verificada em agitador orbital. Porém, esta alta concentração celular, produzida em fermentador, apresentou, praticamente, a mesma redução de viabilidade celular daquela verificada nas culturas obtidas após crescimento em agitador orbital, não se mantendo o mínimo de células exigido pelo MAPA após 26 dias de armazenamento (Tabela 25).

Tabela 25 – Concentração celular de *Rhizobium tropici* CIAT 899, produzido em escala semipiloto no meio FORM, e da viabilidade celular, após 26 dias de armazenamento em comparação aos resultados obtidos em agitador orbital.

Produção de FORM	UFC mL <sup>-1</sup>		Redução da viabilidade celular (vezes)
	Após 48 horas de crescimento	Após 26 dias de armazenamento	
Fermentador	1,28E+10 ± 2,52E+09	2,07E+08 ± 3,19E+07	61,8
	Após 72 horas de crescimento	Após 28 dias de armazenamento	
Agitador orbital	3,81E+09 ± 5,16E+08	6,67E+07 ± 1,13E+05	57,1

Fonte: o próprio autor

Foram realizadas outras contagens de FORM após: sete dias ( $1,51E+10 \pm 1,81E+08$  UFC mL<sup>-1</sup>), 14 dias ( $1,38E+10 \pm 1,22E+09$  UFC mL<sup>-1</sup>) e 21 dias ( $9,50E+08 \pm 2,17E+08$  UFC mL<sup>-1</sup>) de armazenamento. Aliado à possível contribuição da maior variação de pH e da falta de aeração, na queda da viabilidade após o armazenamento, está a formação de biofilme. A produção de EPS por *R. tropici* CIAT 899 favorece a formação de biofilme, pois cerca de 50 a 90 % do EPS produzido por microrganismo pode contribuir na composição da matéria orgânica total presente em biofilmes (FLEMMING; WINGENDER, 2001; DONLAN, 2002;

VU et al., 2009). A adesão do biofilme na parede dos tubos, contendo células no interior de sua estrutura pode ter contribuído para subestimar a verdadeira concentração das células armazenadas.

Herridge, Hartley e Gemell (2014), analisando a sobrevivência de rizóbios em inoculantes turfosos armazenados a 4 °C, demonstraram que *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Mesorhizobium* apresentaram maior estabilidade, enquanto *Rhizobium* apresentou as menores taxas de sobrevivência. Também reforçaram que populações cultivadas de rizóbios, em formulações líquidas ou turfosas, sofrem diminuição da viabilidade que aumenta ao longo do tempo de armazenamento, em conjunto com alterações fisiológicas nas células e capacidade de nodulação e crescimento diminuídas.

Estudos de Thompson (1980) e Somasegaran (1985) indicaram que a viabilidade celular de amostras de inoculantes turfosos sofreu influência da temperatura durante o armazenamento em todas as espécies de *Rhizobium*, que mantidas por longos períodos a 28 °C tiveram acentuada redução na população microbiana. O armazenamento a 4 °C apresentou-se favorável às estirpes de *Rhizobium* de crescimento rápido, e a temperatura de 26 °C mostrou-se superior para a manutenção da viabilidade de rizóbios de crescimento lento. Em nosso estudo, *Rhizobium tropici* CIAT 899 crescido em meio FORM, em fermentador, e armazenado durante 28 dias a 4 °C apresentou concentração de  $8,22E+09 \pm 6,35E+08$  UFC mL<sup>-1</sup>. Estes dados estão de acordo com a literatura, onde foi verificada viabilidade celular maior, em cerca de 39,7 vezes, a 4 °C para *R. tropici* em comparação a 26 °C  $\pm$  2 °C.

FORM proporcionou uma boa concentração celular quando utilizada em escala semipiloto e foram avaliados outros componentes que pudessem contribuir para a manutenção da viabilidade das células de *Rhizobium tropici*. Fosfato de potássio monobásico, solução de micronutrientes, fertilizante turfoso, CMC e PVP, todos testados em meio FORM, foram avaliados separadamente para que, em um momento posterior, os melhores componentes fossem combinados e analisados quanto a efeitos aditivos.

### 5.3.3 Avaliação da Influência de Diferentes Componentes no Crescimento e Viabilidade Celular de *Rhizobium tropici* Estirpe CIAT 899 em Meio de Cultivo FORM

#### 5.3.3.1 Fosfato de Potássio Monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)

As diferentes concentrações testadas de fosfato de potássio monobásico não afetaram significativamente o crescimento do microrganismo, após 72 horas de incubação. KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> em

concentrações de 0,45 e 0,65 g L<sup>-1</sup> em meio FORM, apresentou diferença significativa quanto à viabilidade celular, após 28 dias de armazenamento, sendo superiores em cerca de oito vezes se comparada à FORM (Tabela 26).

Tabela 26 – Concentração celular de *Rhizobium tropici* CIAT 899, após incubação de 72 horas, e da viabilidade celular, após 28 dias de armazenamento, no meio FORM com concentrações variadas de fosfato de potássio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>).

Meio de cultivo	UFC mL <sup>-1</sup>		Redução da viabilidade celular (vezes)
	72 horas	28 dias	
FORM	3,81E+09 ± 5,16E+08a	6,67E+07 ± 1,05E+05b	57,1
FORM + KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,25 g L <sup>-1</sup>	3,26E+09 ± 6,04E+08a	6,11E+07 ± 5,56E+06b	53,3
FORM + KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,45 g L <sup>-1</sup>	2,78E+09 ± 2,40E+08a	3,94E+08 ± 6,11E+07a	7,1
FORM + KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,65 g L <sup>-1</sup>	2,89E+09 ± 2,40E+08a	4,17E+08 ± 5,56E+06a	6,93
C.V (%)	16,59	18,64	

**Fonte:** o próprio autor

As médias, em triplicata, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), quando seguidas da mesma letra minúscula na coluna.

O tamponamento do meio FORM com KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,45 g L<sup>-1</sup> mostrou-se mais interessante que a concentração de 0,65 g L<sup>-1</sup>, por apresentar estatisticamente a mesma resposta com uma concentração menor de reagente. O crescimento foi numericamente inferior em comparação à FORM, sem diferença estatística, no entanto, a viabilidade celular, após o armazenamento, mostrou a contribuição do KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> na manutenção da viabilidade das células. A concentração calculada de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> para o tamponamento de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g L<sup>-1</sup> foi de 0,76 g L<sup>-1</sup>, no entanto, concentrações menores foram avaliadas.

### 5.3.3.2 Solução de Micronutrientes

Não foi observada diferença estatística no crescimento celular em relação às diferentes concentrações de solução de micronutrientes avaliadas. Maiores concentrações desta solução, representadas por 150 µL L<sup>-1</sup> da solução de micronutrientes diluída 1:100 (v/v), mostraram-se mais eficientes na manutenção celular, conferindo maior viabilidade em cerca de até 2,5 vezes (Tabela 27).

Tabela 27 – Concentração celular de *Rhizobium tropici* CIAT 899, após incubação de 72 horas, e da viabilidade celular, após 35 dias de armazenamento, no meio FORM com concentrações variadas de solução de micronutrientes (Sol. Micro.).

Meio de cultivo	UFC mL <sup>-1</sup>		Redução da viabilidade celular (vezes)
	72 horas	35 dias	
FORM	3,85E+09 ± 3,19E+08a	4,00E+07 ± 7,78E+06ab	96,3
FORM + Sol. Micro. 1:100 (v/v) 75 µL L <sup>-1</sup>	3,44E+09 ± 5,67E+08a	6,11E+07 ± 7,78E+06ab	56,3
FORM + Sol. Micro. 1:100 (v/v) 100 µL L <sup>-1</sup>	2,44E+09 ± 4,44E+08a	3,06E+07 ± 3,89E+06b	79,7
FORM + Sol. Micro. 1:100 (v/v) 125 µL L <sup>-1</sup>	3,26E+09 ± 1,05E+08a	7,83E+07 ± 1,61E+07ab	41,6
FORM + Sol. Micro. 1:100 (v/v) 150 µL L <sup>-1</sup>	3,70E+09 ± 7,33E+08a	9,55E+07 ± 1,91E+07a	38,7
C.V (%)	17,79	27,65	

Fonte: o próprio autor

As médias, em triplicata, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), quando seguidas da mesma letra minúscula na coluna.

A solução de micronutrientes em meio FORM foi inicialmente avaliada sem diluição e não apresentou maiores incrementos nas taxas de crescimento e viabilidade de *R. tropici* (dados não mostrados). Contudo, a solução diluída na proporção de 1:100 (v/v) permitiu maiores contribuições na manutenção das células, verificada até a adição de 150 µL L<sup>-1</sup> da solução diluída. Notou-se que maiores concentrações da solução diluída podem incrementar ainda mais a taxa de sobrevivência e devem ser melhor investigadas.

### 5.3.3.3 Condicionador Orgânico de Solo

O condicionador orgânico de solo (Agrolmin<sup>®</sup>) não influenciou significativamente o crescimento de *Rhizobium tropici* estirpe CIAT 899. Em relação à viabilidade celular, após 35 dias de armazenamento as concentrações de 0,05 e 0,10 %, destacaram-se significativamente das demais por apresentarem viabilidade celular aumentada em cerca de quatro vezes, se comparadas à FORM. Concentrações menores devem ser avaliadas, pois foi evidenciado que o aumento da viabilidade celular ocorreu gradativamente com a redução do composto a partir da concentração de 0,20 %.

Tabela 28 – Concentração celular de *Rhizobium tropici* CIAT 899, após incubação de 72 horas, e da viabilidade celular, após 35 dias de armazenamento, no meio FORM com concentrações variadas do condicionador orgânico de solo (cond. solo).

Meio de cultivo	UFC mL <sup>-1</sup>		Redução da viabilidade celular (vezes)
	72 horas	35 dias	
FORM	3,85E+09 ± 3,19E+08a	4,00E+07 ± 7,78E+06de	96,25
FORM + cond. solo 0,05%	3,07E+09 ± 1,39E+08a	1,31E+08 ± 1,69E+07a	23,44
FORM + cond. solo 0,10%	2,96E+09 ± 3,43E+08a	1,23E+08 ± 4,71E+06ab	24,07
FORM + cond. solo 0,20%	2,78E+09 ± 4,54E+08a	9,18E+07 ± 9,09E+06bc	30,28
FORM + cond. solo 0,40%	2,81E+09 ± 2,92E+08a	2,33E+07 ± 2,22E+06e	120,60
FORM + cond. solo 0,60%	2,70E+09 ± 6,04E+08a	8,00E+07 ± 5,56E+06cd	33,75
FORM + cond. solo 0,80%	2,93E+09 ± 5,24E+07a	2,00E+07 ± 2,22E+06e	146,50
C.V (%)	14,51	14,52	

**Fonte:** o próprio autor

As médias, em triplicata, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), quando seguidas da mesma letra minúscula na coluna.

Embora os resultados obtidos tenham sido positivamente significativos deve-se optar, primeiramente, pelos outros componentes avaliados neste trabalho, visto que se trata de um produto comercial de composição complexa e, por ser fabricado a partir de turfa, pode variar de composição a cada lote, além de utilizar um componente natural de uso proibido em alguns países.

#### 5.3.3.4 Carboximetilcelulose (CMC)

Notou-se que a concentração de 1% de carboximetilcelulose, em meio FORM, levou a um aumento significativo da viabilidade celular da formulação analisada, em cerca de três vezes, após armazenamento de 28 dias. Nenhuma concentração influenciou estatisticamente o crescimento de *Rhizobium tropici* (Tabela 29).

Percebeu-se que o aumento gradativo na concentração de CMC apresentou melhores resultados em relação à proteção das células. Concentrações superiores a 1 % podem incrementar os ganhos de viabilidade, contudo, o preço elevado da CMC e sua dificuldade de solubilização em concentrações elevadas devem ser considerados.

Tabela 29 – Concentração celular de *Rhizobium tropici* CIAT 899, após incubação de 72 horas, e da viabilidade celular, após 28 dias de armazenamento, no meio FORM com concentrações variadas de carboximetilcelulose (CMC).

Meio de cultivo	UFC mL <sup>-1</sup>		Redução da viabilidade celular (vezes)
	72 horas	28 dias	
FORM	3,81E+09 ± 5,16E+08a	6,67E+07 ± 1,05E+05b	57,12
FORM + CMC 0,25%	3,18E+09 ± 2,77E+08a	7,78E+07 ± 2,21E+05b	40,87
FORM + CMC 0,50%	3,56E+09 ± 9,07E+07a	1,00E+08 ± 9,07E+06b	35,60
FORM + CMC 1,00%	3,61E+09 ± 5,56E+07a	2,00E+08 ± 4,44E+07a	18,05
C.V (%)	11,01	26,08	

**Fonte:** o próprio autor

As médias, em triplicata, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), quando seguidas da mesma letra minúscula na coluna.

Em meio YSac, a CMC não apresentou diferenças significativas na viabilidade celular e influência sobre o crescimento do microrganismo (Tabela 30).

Tabela 30 – Concentração celular de *Rhizobium tropici* CIAT 899, após incubação de 72 horas, e da viabilidade celular, após 28 dias de armazenamento, no meio YSac com concentrações variadas de carboximetilcelulose (CMC).

Meio de cultivo	UFC mL <sup>-1</sup>		Redução da viabilidade celular (vezes)
	72 horas	28 dias	
YSac	2,00E+09 ± 3,81E+08a	3,78E+08 ± 8,89E+07a	5,29
YSac + CMC 0,50%	2,30E+09 ± 1,89E+08a	5,50E+08 ± 5,00E+07a	4,18
YSac + CMC 1,00%	2,48E+09 ± 1,05E+08a	4,56E+08 ± 2,22E+07a	5,44
C.V (%)	8,18	8,18	

**Fonte:** o próprio autor

As médias, em triplicata, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), quando seguidas da mesma letra minúscula na coluna.

#### 5.3.3.5 Polivinilpirrolidona (PVP)

A menor concentração de PVP avaliada (0,50 %) aumentou a viabilidade celular de *R. tropici* em cerca de três vezes, se comparada ao meio FORM sem a adição do componente. Porém, não foi observada influência significativa da PVP no crescimento ou manutenção da viabilidade celular (Tabela 31).

Tabela 31 – Concentração celular de *Rhizobium tropici* CIAT 899, após incubação de 72 horas, e da viabilidade celular, após 28 dias de armazenamento, no meio FORM com concentrações variadas de polivinilpirrolidona (PVP).

Meio de cultivo	UFC mL <sup>-1</sup>		Redução da viabilidade celular (vezes)
	72 horas	28 dias	
FORM	3,81E+09 ± 5,16E+08a	6,67E+07 ± 1,05E+05a	57,12
FORM + PVP 0,50%	3,26E+09 ± 1,39E+08a	1,67E+08 ± 1,57E+07a	19,52
FORM + PVP 1,00%	4,18E+09 ± 1,89E+08a	1,89E+08 ± 5,56E+07a	22,12
C.V (%)	10,00	24,44	

**Fonte:** o próprio autor

As médias, em triplicata, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), quando seguidas da mesma letra minúscula na coluna.

O resultado mais promissor, com relação à utilização de protetores celulares, foi verificado com a utilização de PVP a 0,5 e 1 % em meio YSac (Tabela 32). Inclusive, foram os únicos testes analisados após 28 dias de armazenamento que apresentaram concentração de células de *Rhizobium tropici* superior, ou igual, a 1,0E+09 UFC mL<sup>-1</sup>. O aumento da viabilidade celular acima do dobro indicou a PVP como o mais promissor protetor celular para utilização no desenvolvimento de formulações líquidas inoculantes contendo *R. tropici* no presente estudo.

Tabela 32 – Concentração celular de *Rhizobium tropici* CIAT 899, após incubação de 72 horas, e da viabilidade celular, após 28 dias de armazenamento, no meio YSac com concentrações variadas de polivinilpirrolidona (PVP).

Meio de cultivo	UFC mL <sup>-1</sup>		Redução da viabilidade celular (vezes)
	72 horas	28 dias	
YSac	2,00E+09 ± 3,81E+08a	3,78E+08 ± 8,89E+07b	5,29
YSac + PVP 0,50%	2,56E+09 ± 2,40E+08a	1,23E+09 ± 1,63E+08a	2,08
YSac + PVP 1,00%	2,11E+09 ± 1,81E+08a	1,00E+09 ± 1,02E+08a	2,11
C.V (%)	11,40	17,08	

**Fonte:** o próprio autor

As médias, em triplicata, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), quando seguidas da mesma letra minúscula na coluna.

### 5.3.3.6 Aferição da Concentração e Viabilidade Celular de *Rhizobium tropici* Estirpe CIAT 899 em Meio de Cultivo YSac contendo PVP (5 g L<sup>-1</sup>) Produzido em Escala Semipiloto

Análises realizadas em escala semipiloto, com o meio YSac acrescido de PVP 0,5 %, indicaram que a viabilidade celular foi 35 vezes menor se comparada à produção em agitador orbital. A concentração inicial de  $3,55E+09 \pm 9,07E+07$  UFC mL<sup>-1</sup>, numericamente superior ao valor observado em agitador orbital, apresentou-se numericamente inferior em relação à viabilidade após 30 dias de armazenamento (Tabela 33).

Tabela 33 – Concentração celular de *Rhizobium tropici* CIAT 899, produzido em escala semipiloto no meio YSac contendo PVP (5 g L<sup>-1</sup>), e da viabilidade celular, após 30 dias de armazenamento em comparação aos resultados obtidos em agitador orbital.

Produção de YSac PVP 5 g L <sup>-1</sup>	UFC mL <sup>-1</sup>		Redução da viabilidade celular (vezes)
	Após 48 horas de crescimento	Após 30 dias de armazenamento	
Fermentador	$3,55E+09 \pm 9,07E+07$	$4,83E+07 \pm 1,28E+07$	73,5
	Após 72 horas de crescimento	Após 28 dias de armazenamento	
Agitador orbital	$2,56E+09 \pm 2,40E+08$	$1,23E+09 \pm 1,63E+08$	2,1

Fonte: o próprio autor

Curiosamente esperava-se por um resultado positivo do meio YSac acrescido de PVP 5 g L<sup>-1</sup> em escala semipiloto, porém, a viabilidade celular diminuiu drasticamente e não foi mantida a concentração de  $1,23E+09$  UFC mL<sup>-1</sup> observada na produção em agitador orbital. A maior variação na acidificação do meio pode ser apontada como principal fator da redução da viabilidade celular ao longo do armazenamento. A ausência da verificação dos valores de pH impediu que os resultados fossem melhor interpretados.

As taxas de morte celular de *Rhizobium tropici* CIAT 899 apresentaram-se elevadas nas avaliações realizadas em fermentador ou em agitador orbital para os aditivos: solução de micronutrientes, condicionador orgânico de solo, carboximetilcelulose e polivinilpirrolidona, devido ao fato dessas formulações testadas, na qual inclui-se o meio FORM, não estarem tamponadas com fosfato de potássio monobásico na concentração de  $0,45$  g L<sup>-1</sup>. Caso isso tivesse ocorrido, acredita-se que o inoculante FORM, produzido em escala piloto, apresentaria concentrações superiores a  $1,00E+09$  UFC mL<sup>-1</sup> durante um período superior a 14 dias, visto que o tamponamento aumentaria significativamente, provavelmente em cerca de oito vezes, a viabilidade celular de *R. tropici* durante o tempo de armazenamento a  $26 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$ . Mudanças

na metodologia de contagem podem aumentar a recuperação celular nas contagens, dando medições mais reais da taxa de sobrevivência. A aeração das formulações ao longo do armazenamento pode aumentar a taxa de sobrevivência de *R. tropici* CIAT 899 na formulação obtida.

Considerando a adição de fosfato de potássio monobásico ao meio FORM, reclassificou-se a formulação “FORM” como “FORM ct”, composto por:

- Sacarose 5,0 g L<sup>-1</sup>;
- Extrato de levedura 2,0 g L<sup>-1</sup>;
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,0 g L<sup>-1</sup>;
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,45 g L<sup>-1</sup>,
- MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,2 g L<sup>-1</sup>;
- NaCl 0,1 g L<sup>-1</sup>.

O presente trabalho visou contribuir com o desenvolvimento de formulações líquidas inoculantes contendo bactérias do gênero *Rhizobium* spp. para a cultura do feijoeiro, de forma a ampliar as opções de mercado que a tecnologia da FBN tem a oferecer com um produto acessível e de qualidade.

## 6 CONCLUSÃO

Foi desenvolvida uma formulação básica de inoculante líquido para *Rhizobium tropici* CIAT 899, FORM, que permitiu a obtenção de altas concentrações celulares em escala semipiloto:  $1,28E+10 \pm 2,52E+09$  UFC mL<sup>-1</sup>, quando incubada a 28 °C, 180 rpm, 1 vvm e pH mantido a  $6,9 \pm 0,03$  durante 48 horas. No entanto, observou-se que a concentração celular desta formulação após 14 dias de armazenamento ( $1,38E+10 \pm 1,22E+09$  UFC mL<sup>-1</sup>) sofreu uma acentuada redução para  $9,50E+08 \pm 2,17E+08$  UFC mL<sup>-1</sup> após 21 dias de armazenamento.

A PVP na concentração de 0,5 % e a CMC na concentração de 1 % provaram-se eficientes protetores celulares em FORM, permitindo sobrevivência prolongada de 2,93 e 3,10 vezes, respectivamente, em *R. tropici* CIAT 899 após 28 dias de armazenamento a  $26 \pm 2$  °C.

A utilização de  $0,45$  g L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> na formulação básica desenvolvida, FORM ct, aumentou a viabilidade celular em cerca de oito vezes, se comparado à FORM após 28 dias de armazenamento, de forma que a redução da viabilidade celular em FORM ct (agora de 7,1 vezes) se aproximou do valor observado em YSac (5,29 vezes).

O emprego de PVP 0,5 % em YSac garantiu a manutenção de  $1,23E+09 \pm 1,63E+08$  UFC mL<sup>-1</sup> até 28 dias de armazenamento. Estima-se que esta mesma concentração de PVP em meio FORM ct, produzido em escala semi piloto, permita a sobrevivência de *R. tropici* CIAT 899, com a garantia mínima exigida pelo MAPA ( $1,0E+09$  UFC mL<sup>-1</sup>), durante maiores tempos de armazenamento e necessita de maiores estudos.

## REFERÊNCIAS

- ACOSTA-DURÁN, C.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Diversity of rhizobia from nodules of the leguminous tree *Gliricidia sepium*, a natural host of *Rhizobium tropici*. **Archives of Microbiology**, v.178, p.161-164, 2002.
- ALBAREDA, M.; RODRIGUEZ-NAVARRO, D. N.; CAMACHO, M.; TEMPRANO, F. J. Alternatives to peat as a carrier for rhizobia inoculants: solid and liquid formulations. **Soil Biology and Biochemistry**, v.40, p.2771-2779, 2008.
- ALBERTON, O.; KASCHUK, G.; HUNGRIA, M. Sampling effects on the assessment of genetic diversity of rhizobia associated with soybean and common bean. **Soil Biology and Biochemistry**, v.38, p.1298-1307, 2006.
- ANDRADE, D. S.; MURPHY, P. J.; GILLER, K. E. The diversity of *Phaseolus* nodulating rhizobial populations is altered by liming of acid soils planted with *Phaseolus vulgaris* L. in Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.4025-4034, 2002.
- ANDREWS, M.; LEA, P.; RAVEN, J.; AZEVEDO, R. Nitrogen fixation: genes and costs. **Annals of Applied Biology**, v.155, p.1-13, 2009.
- ARORA, N. K.; KHARE, E.; MAHESHWARI, D. K. Plant growth promoting rhizobacteria: constraints in bioformulation, commercialization, and future strategies. In: MAHESHWARI, D. K. (ed). **Plant growth and health promoting bacteria**. Microbiology monographs, vol.18. Springer, Berlin, p.97-116, 2011.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas: EDUNICAMP, 2001.
- BAS, D.; BOYACI, I. H. Modeling and optimization I: usability of response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, v.78, 836-845, 2007.
- BASHAN, Y. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. **Biotechnology Advances**, v.16, p.729-770, 1998.
- BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E.; PRABHU, S. R.; HERNANDEZ, J. P. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). **Plant and Soil**, v.378, p.1-33, 2014.
- BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E.; PRABHU, S. R.; HERNANDEZ, J. P. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998-2013). **Plant and Soil**, v.378, p.1-33, 2014.
- BERGERSEN, F. J.; TURNER, G. L. Bacteroids from soybean root nodules: respiration and N<sub>2</sub> fixation in flow-chamber reactions with oxyleghaemoglobin. **Proceedings of the Royal Society of London B**, v.238, p.295-320, 1990.

- BERGERSEN, F. J.; PEOPLES, M. B.; TURNER, G. L. A role for poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in bacteroids of soybean nodules. **Proceedings of the Royal Society of London B**, v.245, p.59-64, 1991.
- BERNAL, G. R.; TLUSTY, B.; DE JENSEN, C. E.; VAN BERKUM, P.; GRAHAM, P. H. Characteristics of rhizobia nodulating beans in the central region of Minnesota. **Canadian Journal of Microbiology**, v.50, p.1023-1031, 2004.
- BILLI, D.; POTTS, M. Life and death of dried prokaryotes. **Research in Microbiology**, v.153, p.7-12, 2002.
- BOX, G. E. P.; HUNTER, H. G.; HUNTER, J. S. **Statistics for experiments**. New York: John Wiley Co., p.306-351, 501-539, 1978.
- BROCKWELL, J.; BOTTOMLEY, P. J. Recent advances in inoculant technology and prospects for the future. **Soil Biology and Biochemistry**, v.27, p.683-697, 1995.
- BULLARD, G. K.; ROUGHLEY, R. J.; PULSFORD, D. J. The legume inoculant industry and inoculant quality control in Australia. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v.45, p.127-140, 2005.
- BURTON, J. C. **Legume inoculant production manual**. Hawaii: University of Hawaii. 99p. 1984.
- CANFIELD, D. E.; GLAZER, A. N.; FALKOWSKI, P. G. The evolution and future of earth's nitrogen cycle. **Science**, v.330, p.192-196, 2010.
- CASTELLANE, T. C. L.; LEMOS, M. V. F.; LEMOS, E. G. M. Evaluation of the biotechnological potential of *Rhizobium tropici* strains for exopolysaccharide production. **Carbohydrate Polymers**, v.111, p.191-197, 2014.
- CASTERIANO, A.; WILKES, M. A.; DEAKER, R. Physiological changes in rhizobia after growth in peat extract may be related to improved desiccation tolerance. **Applied and Environmental Microbiology**, v.79, p.3998-4007, 2013.
- CGIAR. CONSULTATIVE GROUP ON INTERNATIONAL AGRICULTURAL RESEARCH. **Common Bean**. Disponível em: <<http://www.cgiar.org/our-research/crop-factsheets/beans/>>. Acesso em: 12 abr. 2012.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos para safra 2015/16 – Quarto Levantamento**. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16\\_01\\_12\\_14\\_17\\_16\\_boletim\\_graos\\_janeiro\\_2016.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_01_12_14_17_16_boletim_graos_janeiro_2016.pdf)>. Acesso em: 26 jan. 2016.
- CYTRYN, E. J.; SANGURDEKAR, D. P.; STREETER, J. G.; FRANCK, W. L.; CHANG, W. S.; STACEY, G.; EMERICH, D. W.; JOSHI, T.; XU, D.; SADOWSKY, M. J. Transcriptional and physiological responses of *Bradyrhizobium japonicum* to desiccation induced stress. **Journal of Bacteriology**, v.189, p.6751-6762, 2007.

DALL'AGNOL, R. F.; RIBEIRO, R. A.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; ROGEL, M. A.; DELAMUTA, J. R.; ANDRADE, D. S.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; HUNGRIA, M. *Rhizobium freirei* sp. nov., a symbiont of *Phaseolus vulgaris* that is very effective at fixing nitrogen. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.63, p.4167-4173, 2013.

DANHORN, T.; FUQUA, C. Biofilm formation by plant-associated bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v.61, p.401-422, 2007.

DART, P. J.; ROUGHLEY, R. J.; CHANDLER, M. R. Peat culture of *Rhizobium trifolii*: an examination by electron microscopy. **Journal of Applied Bacteriology**, v.32, p.352-357, 1969.

DEAKER, R.; ROUGHLEY, R. J.; KENNEDY, I. R. Legume seed inoculation technology: a review. **Soil Biology and Biochemistry**, v.36, p.1275-1288, 2004.

DE ARAUJO, S. C. *Roadmapping* da comercialização de inoculantes no Brasil: novas estratégias, articulações e demandas da ANPII. In: Reunião da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola, 16., 2012, Londrina. Anais da XVI RELARE. Londrina: Embrapa Soja, 2014. p.25-26.

DE LUQUE, J. J. R.; CREAMER, B.. Major constraints and trends for common bean production and commercialization; establishing priorities for future research. **Agronomía Colombiana**, v.32, p.423-431, 2014.

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

DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging Infectious Diseases Journal**. v.8, p.881-890, 2002.

DONOT, F.; FONTANA, A.; BACCOU, J. C.; SCHORR-GALINDO, S. Microbial exopolysaccharides: main examples of synthesis, excretion genetics and extraction. **Carbohydrate Polymers**, v.87, p.951-962, 2012.

FAGERIA, N. K.; BALIGAR, V. C. Enhancing nitrogen use efficiency in crop plants. **Advances in Agronomy**, v.88, p.97-185, 2005.

FAO – Food and Agriculture Organization. **Estadísticas de fríjol seco**. Disponível em: <[http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/\\*/E](http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/*/E)>. Acesso em: maio. 2014.

FERNANDES JÚNIOR, P. I.; ROHR, T. G.; OLIVERA, P. J.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G. Polymers as carriers for rhizobial inoculant formulations. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, p.1184-1190, 2009.

FERREIRA, E.; HUNGRIA, M. **Procedimento operacional padrão BS.ME.003: Concentração e pureza de inoculantes contendo rizóbios em placas pelo método gotejamento**. Londrina: Embrapa Soja, 21p. 2013.

FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; STAMFORD, N. P.; SANTOS, C. E. R. S. **Microorganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura**. Guaíba: Agrolivros, 568p. 2008.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) - Part I: structural and ecological aspects. **Water Science and Technology**, v.43, p.1-8, 2001.

FLORES, M.; GONZÁ LEZ, V. M.; PARDO, A.; LEIJA, A.; MARTÍNEZ, E.; ROMERO, D.; PINERO, D.; DÁ VILA, G.; PALACIOS, R. Genomic instability of *Rhizobium phaseoli*. **Journal of Bacteriology**, v.170, p.1191-1196, 1988.

FRANCO, A. A.; FARIA, S. M. The contribution of N<sub>2</sub>-fixing tree legumes to land reclamation and sustainability in the tropics. **Soil Biology and Biochemistry**, v.29, p.897-903, 1997.

FRANCO, Y.; GÓMEZ, G.; NÚÑEZ, R.; MARTÍNEZ, J. Optimización de las condiciones de fermentación para la producción de polihidroxibutirato por *Rhizobium tropici*. **Revista CENIC Ciencias Biológicas**, v.40, p.53-57, 2009.

FRANK, B. Ueber die parasiten in den wurzelan-schwillungen der papilionaceen. **Botanical Ztg**, v.37, p.376-399, 1879.

FRANK, B. Ueber die pilzsymbiose der leguminosen. **Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft**, v.7, p.332-346, 1889.

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

FUJISHIGE, N.; KAPADIA, N.; DE HOFF, P.; HIRSCH, A. Investigations of *Rhizobium* biofilm formation. **FEMS Microbiology Ecology**, v.56, p.195-206, 2006.

GODFRAY, H. C. J.; BEDDINGTON, J. R.; CRUTE, I. R.; HADDAD, L.; LAWRENCE, D.; MUIR, J. F.; PRETTY, J.; ROBINSON, S.; THOMAS, S. M.; TOULMIN, C. Food security: the challenge of feeding 9 billion people. **Science**, v.327, p.812-818, 2010.

GOMES, D.F.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; HUNGRIA, M. Biodiversity, symbiotic efficiency and genomics of *Rhizobium tropici* and related species. In: DE BRUIJN, F. (Ed.) **Biological nitrogen fixation**. v.2. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2015. vol.2. p.747-756.

GRAHAM, P. H. Some problems of nodulation and symbiotic nitrogen-fixation in *Phaseolus vulgaris* L. - a Review. **Field Crops Research**, v.4, p.93-112, 1981.

GRAHAM, P. H.; DRAEGER, K. J.; FERREY, M. L.; CONROY, M. J.; HAMMER, B. E.; MARTINEZ, E.; AARONS, S. R.; QUINTO, C. Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR1899. **Canadian Journal of Microbiology**, v.40, p.198-207, 1994.

GRAHAM, P. H.; VANCE, C. P. Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. **Field Crops Research**, v.65, p.93-106, 2000.

GRANGE, L.; HUNGRIA, M.; GRAHAM, P. H.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. New insights into the origins and evolution of rhizobia that nodulate common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, v.39, p.867-876, 2007.

GRESSHOFF, P. M. **The contrasting need for food and biofuel: can we afford biofuel.** Melbourne: Melbourne University Press, p.144-152, 2014.

GRESSHOFF, P. M.; HAYASHI, S.; BISWAS, B.; MIRZAEI, S.; INDRASUMUNAR, A.; REID, D. SAMUEL, S.; TOLLENAERE, A.; HAMEREN, B. V.; HASTWELL, A.; SCOTT, P.; FERGUSON, B. J. The value of biodiversity in legume symbiotic nitrogen fixation and nodulation for biofuel and food production. **Journal of Plant Physiology**, v.172, p.128-136, 2015.

GUEDES, T. A. **Procedimentos de otimização no planejamento e controle da qualidade de produtos e processos.** 1996. 215f. Tese (Doutorado), Universidade de Santa Catarina, 1996.

HAO, J.; FANG, X.; ZHOU, Y.; WANG, J.; GUO, F.; LI, F.; PENG, X. Development and optimization of solid lipid nanoparticle formulation for ophthalmic delivery of chloramphenicol using a Box-Behnken design. **International Journal of Nanomedicine**, v.6, p.683-692, 2011.

HARDARSON, G. Methods for enhancing symbiotic nitrogen-fixation. **Plant and Soil**, v.152, p.1-17, 1993.

HERRIDGE, D. F.; GEMELL, G.; HARTLEY, E. Legume inoculants and quality control. In: HERRIDGE, D. F. (ed) **Inoculants and nitrogen fixation of legumes in Vietnam.** ACIAR, Canberra, p.105-115. 2002.

HERRIDGE, D. F.; HARTLEY, E.; GEMELL, L. G. Rhizobial counts in peat inoculants vary amongst legume inoculant groups at manufacture and with storage: implications for quality standards. **Plant and Soil**, v.380, p.327-336, 2014.

HERRMANN, L.; LESUEUR, D. Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.97, p.8859-8873, 2013.

HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. S.; CHUEIRE, L. M. O.; PROBANZA, A.; GUITIERREZ-MANERO, F. J.; MEGÍAS, M. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, v.21, p.1515-1528, 2000.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **Fixação Biológica do nitrogênio na cultura da soja.** Londrina: Embrapa Soja, 48p. 2001.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. Benefits of inoculation of common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. **Biology and Fertility of Soils**, v.39, p.88-93, 2003.

CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M. Reunião da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão da Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola, 13, Londrina, 2006. **Anais**. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 212p. (Embrapa Soja. Documentos, 290).

HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S.; MERCANTE, F. M. Reunião da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão da Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola, 16, Londrina, 2014. **Anais**. Londrina: Embrapa Soja, 2014. 80p. (Embrapa Soja. Documentos, 350).

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja**: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Londrina: Embrapa Soja, 80p. 2007 (Embrapa Soja. Documentos, 283).

HUNGRIA, M.; DA SILVA, K. **Manual de curadores de germoplasma- Micro-organismos**: rizóbios e bactérias promotoras do crescimento vegetal. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 21p. 2011 (Documentos/ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 333; Documentos/ Embrapa Soja, 332).

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T.; ARAUJO, R. S. Fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro. In: VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. (Eds.). **Biologia dos Solos dos Cerrados**. EMBRAPA-CPAC, Planaltina, Brasil, p.189-295, 1997.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. Environmental factor affecting N<sub>2</sub> fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis in Brazil. **Field Crops Research**, v.65, p.151-164, 2000.

JAMES, B. W.; MAUCLINE, W. S.; DENNIS, P. J.; KEEVIL, C. W.; WAIT, R. Poly-3-hydroxybutyrate in *Legionella pneumophila*, an energy source for survival in low-nutrient environments. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.822-827, 1999.

KADOURI, D.; BURDMAN, S.; JURKEVITCH, E.; OKON, Y. Identification and isolation of genes involved in poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) biosynthesis in *Azospirillum brasilense* and characterization of a *phbC* mutant. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.2943-2949, 2002.

KADOURI, D.; JURKEVITCH, E.; OKON, Y. Involvement of the reserve material poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in *Azospirillum brasilense* stress endurance and root colonization. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.3244-3250, 2003.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. Produção de inoculantes agrícolas. In: PRADELLA, J. G. C.; OLIVEIRA, M. S.; URENHA, L. C. **Biotecnologia industrial**: processos fermentativos e enzimáticos. São Paulo: Edgard Blücher, 593p. 2001.

LIMA, P. F.; COLOMBO, C. A.; CHIORATO, A. F.; YAMAGUCHI, L. F.; KATO, M. J.; CARBONELL, S. A. M. Occurrence of isoflavonoids in Brazilian common bean germplasm (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.62, p.9699-9704, 2014.

- LONG, S. R. *Rhizobium* symbiosis: Nod factors in perspective. **The Plant Cell**, v.8, p.1885-1898, 1996.
- LODWIG, E. M.; LEONARD, M.; MARROQUI, S.; WHEELER, T. R.; FINDLAY, K.; DOWNIE, J. A.; POOLE, P. S. Role of polyhydroxybutyrate and glycogen as carbon storage compounds in pea and bean bacteroids. **Molecular Plant–Microbe Interactions Journal**, v.18, p.67-74, 2005.
- LUPWAYI, N. Z.; RICE, W. A.; CLAYTON, G. W. Rhizobial inoculants for legume crops. **Journal of Crop Improvement**, v.15, p.289-321, 2005.
- MA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Lei Nº 6934, de 13 de julho de 1981**. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=gravarAtoPDF&tipo=LEI&numeroAto=00006934&seqAto=000&valorAno=1981&orgao=NI&codTipo=&desItem=&desItemFim=>>>. Acesso em: 10 jul. 2014.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. São Paulo: Artmed, 1160p. 2010.
- MALUSA, E.; SAS-PASZT, L.; CIESIELSKA, J. Technologies for beneficial microorganisms inocula used as biofertilizers. **The Scientific World Journal**, doi:10.1100/2012/491206, 2012.
- MANIKANDAN, R.; SARAVANAKUMAR, D.; RAJENDRAN, L.; RAGUCHANDER, T.; SAMIYAPPAN, R. Standardization of liquid formulation of *Pseudomonas fluorescens* Pf1 for its efficacy against *Fusarium* wilt of tomato. **Biological Control**, v.54, p.83-89, 2010.
- MAPA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Notícias: XVI RELARE** apresenta estudos para melhorar produção. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/comunicacao/noticias/2012/08/xvi-relare-apresenta-estudos-para-melhorar-producao>>. Acesso em 02 dez. 2014.
- MAPA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, **Anexo à IN SDA 13, de 25/03/2011**. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis/>>. Acesso em 18 fev. 2016a.
- MAPA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, **Instrução Normativa Nº 13, de 24 de março de 2011**. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis/>>. Acesso em 10 jul. 2014b.
- MARTÍNEZ-ROMERO, E. Diversity of *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis: overview and perspectives. **Plant and Soil**, v.252, p.11-23, 2003.
- MARTÍNEZ-ROMERO, E.; SEGOVIA, E.; MERCANTE, F. M.; FRANCO, A. A.; GRAHAM, P. H.; PARDO, M. A. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.41, p.417-426, 1991.

MENDES, I. C.; HUNGRIA, M. **Resposta da soja à adubação nitrogenada na semeadura**. Disponível em: <[http://radiobras.gov.br/ct/artigos/2001/artigo\\_060701.htm](http://radiobras.gov.br/ct/artigos/2001/artigo_060701.htm)>. Acesso em 10 jul. 2014.

MENÉNDEZ, C.; TRUJILLO, L. E.; RAMÍREZ, R.; GONZÁLEZ-PEÑA, D.; ESPINOSA, D.; ENRIQUEZ, G. A.; HERNÁNDEZ, L. Production of a liquid *Bradyrhizobium japonicum* inoculant with high impact on the mechanized sowing of soybean in Cuba. **Biocología Aplicada**, v.31, p.116-120, 2014.

MERCANTE, F. M.; STRALIOTTO, R.; DUQUE, F. F.; FRANCO, A. A. **A inoculação do feijoeiro comum com rizóbio**. Seropédica: Embrapa-CNPBS, 8p. 1992. (Embrapa-CNPBS. Comunicado técnico, 10).

MICHIELS, J.; DOMBRECHT, B.; VERMEIREN, N.; XI, C.; LUYTEN, E.; VANDERLEYDEN, J. *Phaseolus vulgaris* is a non-selective host for nodulation. **FEMS Microbiology Ecology**, v.26, p.193-205, 1998.

MILES, A. A.; MISRA, S. S. The estimation of the bacterial power of the blood. **Journal of Hygiene**. Cambridge, v.38, p.732-749, 1938.

MINCHIN, F. R.; PATE, J. S. The carbon balance of a legume and the functional economy of its root nodules. **Journal of Experimental Botany**, v.24, p.259-271, 1973.

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

MOUKOUMI, J.; HYNES, R. K.; DUMONCEAUX, T. J.; TOWN, J.; BÉLANGER, N. Characterization and genus identification of rhizobial symbionts from *Caragana arborescens* in western Canada. **Canadian Journal of Microbiology**, v.59, p.399-406, 2013.

MOUSAVI, S. A.; OSTERMAN, J.; WAHLBERG, N.; NESME, X.; LAVIRE, C.; VIAL, L.; PAULIN, L.; DE LAJUDIE, P.; LINDSTROM, K. Phylogeny of the *Rhizobium*–*Allorhizobium*–*Agrobacterium* clade supports the delineation of *Neorhizobium* gen. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v.37, p.208-215, 2014.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 1274p. 2011.

NOEL, K. D. Encyclopedia of microbiology. In: SCHAECHTER, M. (Ed.). **Rhizobia**. San Diego, CA: Academic Press. p.261-277. 2009.

ORMEÑO, E.; ZÚÑIGA, D. Modification of YEM broth for medium scale production of legume inoculants. **Revista Peruana de Biología**, v.5, p.83-89, 1998.

ORMEÑO-ORRILLO, E.; ROSENBLUETH, M.; LUYTEN, E.; VANDERLEYDEN, J.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Mutations in lipopolysaccharide biosynthetic genes impair maize rhizosphere and root colonization of *Rhizobium tropici* CIAT899. **Environmental Microbiology**, v.10, p.1271-1284, 2008.

ORMEÑO-ORRILLO, E.; MENNA, P.; ALMEIDA, L. G. P.; OLLERO, F. J.; NICOLÁS, M. F.; RODRIGUES, E. P.; NAKATANI, A. S.; BATISTA, J. S. S.; CHUEIRE, L. M. O.; SOUZA, R. C.; VASCONCELOS, A. T. R.; MEGÍAS, M.; HUNGRIA, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Genomic basis of broad host range and environmental adaptability of *Rhizobium tropici* CIAT 899 and *Rhizobium* sp. PRF 81 which are used in inoculants for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **BMC Genomics**, v.13, p.735-761, 2012.

PINTO, F. G. S.; HUNGRIA, M.; MERCANTE, F. M. Polyphasic characterization of Brazilian *Rhizobium tropici* strains effective in fixing N<sub>2</sub> with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Soil Biology and Biochemistry**, v.39, p.1851-1864, 2007.

QURASHI, A. W.; SABRI, A. S. Bacterial exopolysaccharide and biofilm formation stimulate chickpea growth and soil aggregation under salt stress. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.43, p.1183-1191, 2012.

RASMUSSEN, J.; SØEGAARD, K.; PIRHOFER-WALZL, K.; ERIKSEN, J. N<sub>2</sub>-fixation and residual N effect of four legume species and four companion grass species. **European Journal of Agronomy**, v.36, p.66-74, 2012.

RATCLIFF, W. C.; KADAM, S. V.; DENISON, R. F. Poly-3-hydroxybutyrate (PHB) supports survival and reproduction in starving rhizobia. **FEMS Microbiology Ecology**, v.65, p.391-399, 2008.

RIBEIRO, R. A.; ROGEL, M. A.; LÓPEZ-LÓPEZ, A.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; GOMES BARCELLOS, F.; MARTÍNEZ, J.; LOPES THOMPSON, F.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; HUNGRIA, M. Reclassification of *Rhizobium tropici* type A strains as *Rhizobium leucaenae* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.62, p.1180-1185, 2012.

RIBEIRO, R. A.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; DALL'AGNOL, R. F.; GRAHAM, P. H.; MARTINEZ-ROMERO, E.; HUNGRIA, M. Novel *Rhizobium* lineages isolated from root nodules of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in andean and mesoamerican areas. **Research in Microbiology**, v.164, p.740-748, 2013.

ROBERSON, E. B.; FIRESTONE, M. K. Relationship between desiccation and exopolysaccharide production in a soil *Pseudomonas* sp. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p.1284-1291, 1992.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e Otimização otimização de processos**: uma estratégia sequencial de planejamentos, Campinas, SP, Casa do Pão Editora, 2005.

RODRIGUES, A. C.; SILVEIRA, J. A. G.; BONIFACIO, A.; FIGUEIREDO, M. V. B. Metabolism of nitrogen and carbon: optimization of biological nitrogen fixation and cowpea development. **Soil Biology and Biochemistry**, v.67, p.226-234, 2013.

ROUGHLEY, R. J.; VINCENT, J. M. Growth and survival of *Rhizobium* spp. in peat culture. **Journal of Applied Microbiology**, v.30, p.362-376, 1967.

RUIZ, J. A.; LÓPEZ, N. I.; MÉNDEZ, B. S. *rpoS* gene expression in carbon-starved cultures of the polyhydroxyalkanoate accumulating species *Pseudomonas oleovorans*. **Current Microbiology**, v.48, p.396-400, 2004.

RUSSO, D. M.; WILLIAMS, A.; EDWARDS, A.; POSADAS, D. M.; FINNIE, C.; DANKERT, M.; DOWNIE, J. A.; ZORREGUIETA, A. Proteins exported via the PrsD–PrsE type I secretion system and the acidic exopolysaccharide are involved in biofilm formation by *Rhizobium leguminosarum*. **Journal of Bacteriology**, v.188, p.4474-4486, 2006.

SANTAELLA, C.; SCHUE, M.; BERGE, O.; HEULIN, T.; ACHOUAK, W. The exopolysaccharide of *Rhizobium* sp. YAS34 is not necessary for biofilm formation on *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* roots, but contributes to root colonization. **Environmental Microbiology**, v.10, p.2150-2163, 2008.

SANZ, T.; FERNÁNDEZ, M. A.; SALVADOR, A.; MUÑOZ, J.; FISZMAN, S. M. Thermogelation properties of methylcellulose (MC) and their effect on a batter formula. **Food Hydrocolloids**, v.19, p.141-147, 2005.

SEGOVIA, L.; YOUNG, J. P. W.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.43, p.374-377, 1993.

SHRIDHAR, B. S. Review: nitrogen fixing microorganisms. **International Journal of Microbiology Research**, v.3, p.46-52, 2012.

SINGLETON, P.; KEYSER, H.; SANDE, E. Development and evaluation of liquid inoculants. In: HERRIDGE, D. (Ed.). **Inoculants and nitrogen fixation of legumes in Vietnam**. ACIAR Proceedings, p.52-66, 2002.

SOBERÓN-CHAVES, G.; NÁ JERA, R.; OLIVERA, H.; SEGOVIA, L. Genetic rearrangements of a *Rhizobium phaseoli* symbiotic plasmid. **Journal of Bacteriology**, v.167, p.487-491, 1986.

SOMASEGARAN, P.; HALLIDAY. Dilution of liquid *Rhizobium* cultures to increase production capacity of inoculant plants. **Journal of Applied and Environmental Microbiology**, v.44, p.330, 1982.

SOMASEGARAN, P. Inoculant production with diluted liquid cultures of *Rhizobium* spp. and autoclaved peat: evaluation of diluents, *Rhizobium* spp., peats, sterility requirements, storage, and plant effectiveness. **Applied and Environmental Microbiology**, p.398-405, 1985.

STEPHENS, J. H. G.; RASK, H. M. Inoculant production and formulation. **Field Crops Research**, v.65, p.249-258, 2000.

SÜTOA, B.; WEBERB, S.; ZIMMERB, A.; FARKASA, G.; KELEMENA, A.; BUDAI-SZUCSA, M.; BERKÓA, S.; SZABÓ-RÉVÉSZ, P.; CSÁNYIA, E. Optimization and design of an ibuprofen-loaded nanostructured lipid carrier with a 2<sup>3</sup> full factorial design. **Chemical Engineering Research and Design**, v.104, p.488-496, 2015.

TAL, S.; OKON, Y. Production of the reserve material poly- $\beta$ -hydroxybutyrate and its function in *Azospirillum brasilense* Cd. **Canadian Journal of Microbiology**, v.31, p.608-613, 1985.

TAURIAN, T.; ANZUAY, M. S.; ANGELINI, J. G.; TONELLI, M. L.; LUDUEÑA, L.; PENA, D. IBÁÑEZ, F.; FABRA, A. Phosphate-solubilizing peanut associated bacteria: screening for plant growth-promoting activities. **Plant and Soil**, v.329, p421-431, 2010.

TAVERNIER, P.; PORTAIS, J.; SAUCEDO, J. E. N.; COURTOIS, J.; COURTOIS, B.; BARBOTIN, J. N. Exopolysaccharide and poly- $\beta$ -hydroxybutyrate coproduction in two *Rhizobium meliloti* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.21-26, 1997.

THE ROYAL SOCIETY. **Science and sustainable intensification of global agriculture**. RS Policy Document 11/09. The Royal Society, London, 2009.

THOMPSON, J. A. Production and quality control of legume inoculants, In: BERGERSEN, F. J. (Ed.) **Methods for evaluating biological nitrogen fixation**. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1980. p.489-533.

TITTABUTR, P.; PAYAKAPONG, W.; TEAUMROONG, N.; SINGLETON, P. W.; BOONKERD, N. Growth, survival and field performance of bradyrhizobial liquid inoculant formulations with polymeric additives. **Science Asia**, v.33, p.69-77, 2007.

TUMELERO, A. I.; DENARDIN, N. D` A. Uso de polímeros em formulações para preservação de *Pectobacterium atrosepticum* e *Ralstonia solanacearum*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.34, p.58-61, 2008.

VANCE, C. P. Legume symbiotic nitrogen fixation: agronomic aspects. In: SPAINK, H.P., ET AL. (Eds.). **The Rhizobiaceae**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p.509-530. 1998.

VANDERLINDE, E. M.; HARRISON, J. J.; MUSZYŃSKI, A.; CARLSON, R. W.; TURNER, R. J.; YOST, C. K. Identification of a novel ABC transporter required for desiccation tolerance, and biofilm formation in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841. **FEMS Microbiology Ecology**, v.71, p.327-340, 2010.

VARGAS, M. A. T.; MENDES, I. C.; HUNGRIA, M. Response of field-grown bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to *Rhizobium* inoculation and nitrogen fertilization in two cerrados soils. **Biology and Fertility of Soils**, v.32, p.228-233, 2000.

VINCENT, J. M. **A manual for practical study of the root-nodule bacteria**. Oxford: Scientific Publications, 164p. 1970.

VU, B.; CHEN, M.; CRAWFORD, R. J.; IVANOVA, E. P. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. **Molecules**, v.14, p.2535-2554, 2009.