



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

KARINA MARIA LIMA MILANI

**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO PARA
PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE *AZOSPIRILLUM*
BRASILENSE COM ALTA QUALIDADE FISIOLÓGICA**

Londrina
2014

KARINA MARIA LIMA MILANI

**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO PARA
PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE *AZOSPIRILLUM*
BRASILENSE COM ALTA QUALIDADE FISIOLÓGICA**

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

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Martinez de Oliveira.

Londrina
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

M637d Milani, Karina Maria Lima.

Desenvolvimento de formulação para produção de biomassa de *Azospirillum
brasilense* com alta qualidade fisiológica / Karina Maria Lima Milani. –
Londrina, 2014.

121 f. : il.

Orientador: André Luiz Martinez de Oliveira.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina,
Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2014.
Inclui bibliografia.

I. Biotecnologia vegetal – Teses. 2. Microorganismos fixadores de nitrogênio
– Teses. 3. *Azospirillum brasilense* – Teses. 4. Conversão de biomassa – Teses.
5. Inoculação – Teses. 6. Cultivos agrícolas – Teses. I. Oliveira, André Luiz Martinez
de. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

CDU 663.1

KARINA MARIA LIMA MILANI

**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO PARA
PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE *AZOSPIRILLUM*
BRASILENSE COM ALTA QUALIDADE FISIOLÓGICA**

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

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Martinez de
Oliveira.
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Marco Antonio Nogueira
Embrapa soja - PR

Dra. Diva de Souza Andrade
Instituto Agrônômico do Paraná - IAPAR

Londrina, 13 de junho de 2014.

Dedico este trabalho a meus pais
Rosemary Lima Milani e Osvaldo
Milani pelo apoio incondicional para
que eu realizasse mais essa conquista.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. André Luiz Martinez de Oliveira pela orientação, ensinamentos, aprendizado, paciência, e disponibilidade sempre que precisei.

Ao programa de pós-graduação em biotecnologia e ao departamento de bioquímica e biotecnologia.

Aos professores do programa de pós-graduação em biotecnologia pelos ensinamentos, e ao técnico de laboratório Nelson Janeiro Rodriguez que foi sempre prestativo auxiliando nos experimentos em laboratório.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fixação Biológica de Nitrogênio (INCT-FBN) pelo financiamento do projeto.

Aos meus pais Rosemary Lima Milani e Osvaldo Milani e minha irmã Karoline, que são meu porto seguro e sempre estiveram ao meu lado me apoiando e incentivando quando eu mais precisei. Muito obrigada, pois graças à ajuda de vocês eu conquistei mais uma etapa da minha vida. Amo Vocês!

Ao meu namorado Marcos Rafael, pela paciência, apoio, companheirismo e incentivo durante todos esses anos. Amo você!

Aos colegas de curso e do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, especialmente à Erika Mitsuo, Nicole Pan, Amanda Aleixo e Juliana Barion, com quem compartilhei alegrias, tristezas e preocupações no decorrer desse tempo que passamos juntas. Obrigada pela amizade conquistada! Vocês são especiais.

Aos colegas de laboratório Karita Costa, Danielle Ferreira, Odair Pais dos Santos, Glauber Mantovani pelas conversas compartilhadas, aprendizado e ajuda durante o desenvolvimento do trabalho. Em especial a Mayara Barbosa pelos momentos de alegrias, pelas conversas, desabafos e ajuda nas análises do trabalho, obrigada por

sua amizade, quero você sempre por perto!

Aos estagiários Diana Leziér, Beatriz Barreira e Rodolfo pela h de descontração, conversas e contribuição para a execução deste trabalho. Muito obrigada!!!

Aos amigos distantes que sempre torceram por mim, em especial a Mirian Moraes que mesmo longe sempre me deu força para ir em busca dos meu objetivos, sei o quanto torce por mim e o mesmo é recíproco.

E por fim quero agradecer a todos que fazem parte da minha vida e que contribuíram direta ou indiretamente para que eu chegasse até aqui. Muito Obrigada!

“O saber a gente aprende com os mestres e os livros. A sabedoria, se aprende é com a vida e com os humildes”

Cora coralina

MILANI, Karina Maria Lima. **Desenvolvimento de Formulação para Produção de Biomassa de *Azospirillum brasilense* com alta qualidade fisiológica**. 2014. 121 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um meio de cultura para a produção de biomassa celular de *Azospirillum brasilense* que proporcione uma elevada densidade de células e alta concentração de biopolímeros (exopolissacarídeo e polihidroxibutirato), buscando favorecer a sobrevivência do microrganismo no produto e após sua utilização como inoculante. O trabalho foi realizado em duas etapas, sendo que inicialmente foram desenvolvidas quatro formulações de meios de cultura líquidos (MCA1; MCA2; MCA3; MCA4) buscando identificar aqueles com maior potencial para produção de biomassa celular de *A. brasilense* Ab-V5 e exopolissacarídeos (EPS). Em adição aos novos meios desenvolvidos, o meio de cultura FORM15 foi utilizado como referência em todos os ensaios realizados. A etapa seguinte teve como objetivo avaliar a qualidade fisiológica das células durante o cultivo nas formulações pré-selecionadas anteriormente (MCA2 e MCA4), através da cinética de crescimento, agregação celular, produção de polihidroxibutirato (PHB), e formação dos grânulos de PHB. Também foi avaliada a sobrevivência da bactéria ao armazenamento das formulações MCA2 e MCA4 durante 20 dias, e o escalonamento da produção de inoculante em escala semi-piloto utilizando apenas a formulação controle (FORM15). O meio de cultura MCA4 foi o que apresentou maior potencial de utilização para o desenvolvimento de uma formulação inoculante, pois obteve a maior contagem de *Azospirillum* ($1,7 \times 10^9$ UFC.mL⁻¹), quando comparado com as demais formulações. Em adição, o cultivo da bactéria nesta formulação (MCA4) propiciou a manutenção de células viáveis até 204 h de cultivo, retardando a fase de declínio das bactérias, o que possibilitou uma alta produção de PHB (1,73 g.L⁻¹). Com relação ao armazenamento das formulações (MCA2 e MCA4), após 20 dias não foi detectada a contagem de células viáveis em nenhuma delas. No entanto, foram realizadas avaliações de microscopia no qual revelaram que as formulações armazenadas tardiamente (72 e 144 h de cultivo) apresentaram um maior número de células vivas. Sabendo que a maior produção de EPS e PHB foi encontrada nas células cultivadas por mais tempo, foi possível observar que a presença desses biopolímeros influenciou positivamente na sobrevivência da bactéria durante o armazenamento das formulações. O experimento realizado em escala semi-piloto demonstrou maior sobrevivência de *A. brasilense* Ab-V5 na FORM15, apresentando uma fase estacionária de maior duração comparada com o cultivo em agitador.

Palavras-chave: bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCVs); inoculante; polihidroxibutirato (PHB); exopolissacarídeo (EPS).

MILANI, Karina Maria Lima. **Formulation developing for high physiological quality biomass production of *Azospirillum brasilense***. 2014. 121 p. Dissertation (Masters Degree in Biotechnology) – State University of Londrina, Londrina, 2014.

ABSTRACT

The aim of this study was to develop a culture medium for the production of cell biomass of *Azospirillum brasilense* that provides a high cell density and high concentration of biopolymers (exopolysaccharide and polyhydroxybutyrate), aiming to favor the survival of the microorganism in the product and its use as inoculums. The study was conducted in two stages, with initially four formulations of liquid culture media (MCA1; MCA2; MCA3; MCA4) were developed aiming to identify those with the greatest potential for production of cell biomass of *A. brasilense* Ab-V5 and exopolysaccharides (EPS). In addition, the newly developed culture medium, FORM15 was used as reference in all the tests. The next step was to evaluate the physiological quality of the cells during cultivation in previously pre-selected formulations (MCA2 and MCA4) by growth kinetics, cell aggregation, production of polyhydroxybutyrate (PHB), and formation of PHB granules. It was also evaluated the survival of the bacteria to the storage of the formulations MCA2 and MCA4 for 20 days, and the production stagger inoculant semi-pilot scale using only the control formulation (FORM15). It was observed that the culture medium MCA4 showed the greatest potential for the development of inoculant formulation, since it allowed the highest count of *Azospirillum* (1.7×10^9 CFU.mL⁻¹) compared with other formulations. In addition, the cultivation of the bacteria in this formulation (MCA4) favored the maintenance of viable cells up to 204 hours of cultivation, slowing the decline phase of bacteria, enabling a high PHB production (1.73 g.L⁻¹). Regarding the storage of the formulations (MCA2 and MCA4), after 20 days the viable cell count was not detected in any of them. However, microscopy evaluations was realized which revealed that the formulations stored later (72 and 144 hours of culture) presented a higher number of living cells. Knowing that the highest production of EPS and PHB was found in cells cultured for longer, it was possible to observe that the presence of these biopolymers positively influenced the survival of bacteria during storage of the formulations. The experiment performed in a semi-pilot scale demonstrated the maintenance of cells of Ab-V5 in *A. brasilense* FORM15, showing a stationary phase of longer duration compared with cultivation in shaker.

Key-words: plant growth promoting bacteria (PGPB). inoculant. polyhydroxybutyrate (PHB). exopolysaccharide (EPS).

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Fluxograma de procedimentos para o desenvolvimento de inoculantes	26
Figura 2	Principais fatores que afetam a qualidade dos inoculantes desde a produção até sua utilização a campo	30
Figura 3	Produção de Exopolissacarídeos por <i>A. brasilense</i> Ab-V5 cultivado em diferentes formulações de meio de cultura.....	52
Figura 4	Regressão entre produção de exopolissacarídeo e o tempo de cultivo	54
Figura 5	Cinética de crescimento de <i>A. brasilense</i> Ab-V5, em diferentes meios de cultura selecionados para o desenvolvimento de formulações inoculantes.....	58
Figura 6	Avaliação da agregação celular de <i>A. brasilense</i> Ab-V5 por microscopia de fluorescência durante o cultivo na formulação MCA2. (A) células cultivadas por 24 h (B) células cultivadas por 168 h (C) células cultivadas por 216 h	63
Figura 7	Avaliação da agregação celular de <i>A. brasilense</i> Ab-V5 por microscopia de fluorescência durante o cultivo na formulação MCA4. (A) células cultivadas por 24 h (B) células cultivadas por 72 h (C) células cultivadas por 240 h	64
Figura 8	Avaliação da agregação celular de <i>A. brasilense</i> Ab-V5 por microscopia de fluorescência durante o cultivo na FORM15. (A) células cultivadas por 24 h (B) células cultivadas por 72 h (C) células cultivadas por 216 h	65
Figura 9	Acúmulo intracelular de PHB (%) durante o crescimento de <i>A. brasilense</i> Ab-V5 em MCA2 (A), e MCA4 (B).....	69
Figura 10	Acúmulo intracelular de PHB (%) durante o crescimento de <i>A. brasilense</i> Ab-V5 em FORM15.....	70
Figura 11	Formação de grânulos intracelulares de PHB avaliada por microscopia de fluorescência durante o cultivo de <i>A. brasilense</i> Ab-V5 na formulação MCA2. As células foram coradas com Nile red.(A) células cultivadas por 12 h (B) células cultivadas por 60 h (C) células cultivadas por 132 h (D) células cultivadas por 180 h	74

- Figura 12** Formação de grânulos intracelulares de PHB avaliada por microscopia de fluorescência durante o cultivo de *A. brasilense* Ab-V5 na formulação MCA4. As células foram coradas com Nile red. (A) células cultivadas por 12 h (B) células cultivadas por 60 h (C) células cultivadas por 132 h (D) células cultivadas por 18 h75
- Figura 13** Formação de grânulos intracelulares de PHB avaliada por microscopia de fluorescência durante o cultivo de *A. brasilense* Ab-V5 na FORM15. As células foram coradas com Nile red. (A) células cultivadas por 12 h (B) células cultivadas por 60 h (C) células cultivadas por 132 h (D) células cultivadas por 180 h76
- Figura 14** Sobrevivência de *A. brasilense* Ab-V5 no momento da coleta dos cultivos e após 20 dias de armazenamento da formulação MCA2. As células foram coradas com o kit LIVE/DEAD BacLight L-13152, e avaliadas em microscópio de fluorescência. (A) 36 h de cultivo; (B) 72 h de cultivo; (C) 144 h de cultivo; (D) 20 dias de armazenamento (cultivo de 36 h); (E) 20 dias de armazenamento (cultivo de 72 h); (F) 20 dias de armazenamento (cultivo de 144 h)79
- Figura 15** Porcentagem de células vivas de *A. brasilense* Ab-V5 no momento da coleta dos cultivos (36, 72 e 144 h) e após 20 dias de armazenamento da formulação MCA280
- Figura 16** Sobrevivência de *A. brasilense* Ab-V5 no momento da coleta dos cultivos e após 20 dias de armazenamento da formulação MCA4. As células foram coradas com o kit LIVE/DEAD BacLight L-13152, e avaliadas em microscópio de fluorescência. (A) 36 h de cultivo; (B) 72 h de cultivo; (C) 144 h de cultivo; (D) 20 dias de armazenamento (cultivo de 36 h); (E) 20 dias de armazenamento (cultivo de 72 h); (F) 20 dias de armazenamento (cultivo de 144 h)80
- Figura 17** Porcentagem de células vivas de *A. brasilense* Ab-V5 no momento da coleta dos cultivos (36, 72 e 144 h) e após 20 dias de armazenamento da formulação MCA481

Figura 18	Sobrevivência de <i>A. brasilense</i> Ab-V5 no momento da coleta dos cultivos e após 20 dias de armazenamento da FORM15. As células foram coradas com o kit LIVE/DEAD BacLight L-13152, e avaliadas em microscópio de fluorescência. (A) 36 h de cultivo; (B) 72 h de cultivo; (C) 144 h de cultivo; (D) 20 dias de armazenamento (cultivo de 36 h); (E) 20 dias de armazenamento (cultivo de 72 h); (F) 20 dias de armazenamento (cultivo de 144 h).....	82
Figura 19	Porcentagem de células vivas de <i>A. brasilense</i> Ab-V5 no momento da coleta dos cultivos (36, 72 e 144 h) e após 20 dias de armazenamento da FORM15.....	83
Figura 20	Cultivo de <i>A. brasilense</i> Ab-V5 na FORM15 em fermentador (A) e agitador orbital (B).....	84
Figura 21	Avaliação microscópica da viabilidade celular de Ab-V5 durante o crescimento na FORM15 sob condições controladas (fermentador). As células foram coradas com o kit LIVE/DEAD BacLight L-13152, e avaliadas em microscópio de fluorescência. (A) 18 h de cultivo; (B) 24 h de cultivo; (C) 42 h de cultivo; (D) 48 h de cultivo; (E) 66 h de cultivo; (F) 72 h de cultivo; (G) 90 h de cultivo; (H) 96 h de cultivo.....	86
Figura 22	Porcentagem de células vivas de <i>A. brasilense</i> Ab-V5 durante o crescimento no meio FORM15 em fermentador.....	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição química das formulações dos meios de cultura utilizados neste estudo (FORM15; MCA1; MCA2; MCA3; MCA4)	38
Tabela 2	Conteúdo médio de Carbono, Nitrogênio e Fósforo nas formulações testadas para a produção de biomassa celular de <i>A. brasilense</i> Ab-V5	38
Tabela 3	Número de células de <i>A. brasilense</i> Ab-V5 em diferentes meios de cultivo e tempos de crescimento, determinadas pelo número de unidades formadoras de colônia pelo método da gota (drop plate)	49
Tabela 4	Variação do pH em diferentes meios líquidos de cultura em resposta ao crescimento de <i>A. brasilense</i> Ab-V5	56
Tabela 5	Taxa de crescimento (μ) e tempo de geração (g) de <i>A. brasilense</i> Ab-V5 durante o cultivo no meio NFB e nas diferentes formulações desenvolvidas	60
Tabela 6	Produção de biomassa e polihidroxitirato por <i>A. brasilense</i> Ab-V5 durante o cultivo na formulação MCA2, MCA4 e FORM15	66
Tabela 7	Contagem de Unidades Formadoras de Colônia antes do armazenamento das formulações de inoculantes (36, 72 e 144 h de cultivo)	77

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVO GERAL	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3	REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1	BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS E BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL (BPCVS)	18
3.1.1	Gênero <i>Azospirillum</i>	21
3.2	INOCULANTES	22
3.2.1	Formulação e Produção de Inoculantes	24
3.2.2	Características Desejáveis do Veículo a ser Utilizado nas Formulações de Inoculante	27
3.2.3	Tipos de Veículos Inoculantes Comerciais	28
3.2.3.1	Veículo sólido	28
3.2.3.2	Veículo líquido.....	29
3.2.4	Fatores que Limitam a Eficiência do Inoculante	29
3.2.5	Alternativas para Melhoria da Qualidade dos Inoculantes.....	32
3.2.5.1	Utilização de polímeros	32
3.2.5.2	Mecanismos fisiológicos do microrganismo.....	33
3.2.6	Controle de Qualidade dos Inoculantes.....	35
4	MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1	DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO PARA VEICULAÇÃO DE <i>AZOSPIRILLUM BRASILENSE</i> AB-V5	37
4.1.1	Microrganismo	37
4.1.2	Composição e Preparo das Formulações	37
4.2	ENSAIO 1. SELEÇÃO DE MEIOS DE CULTURA PARA A PRODUÇÃO DE BIOMASSA CELULAR DE <i>AZOSPIRILLUM BRASILENSE</i> AB-V5	39
4.2.1	Preparo do Inóculo e Condições de Cultivo.....	39
4.2.2	Contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC).....	40

4.2.3	Produção de Exopolissacarídeos (EPS).....	40
4.2.4	Determinações de pH.....	40
4.3	ENSAIO 2. AVALIAÇÃO DA QUALIDADE FISIOLÓGICA DAS CÉLULAS DE <i>AZOSPIRILLUM BRASILENSE</i> AB-V5 CULTIVADAS NAS FORMULAÇÕES DESENVOLVIDAS	41
4.3.1	Preparo do Inóculo e Condições de Cultivo.....	41
4.3.2	Cinética de Crescimento de <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5.....	42
4.3.3	Avaliação da Agregação Celular de <i>A. brasilense</i> Ab-V5 por Microscopia de Fluorescência	42
4.3.4	Produção de Biomassa	43
4.3.5	Produção de Polihidroxibutirato (PHB).....	43
4.3.6	Avaliação da Presença de Grânulos de Polihidroxibutirato (PHB) em Cultivos de <i>A. brasilense</i> Ab-V5 por Microscopia de Fluorescência	44
4.4	VIABILIDADE DE <i>A. BRASILENSE</i> AB-V5 NAS FORMULAÇÕES INOCULANTES: UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA	45
4.5	VIABILIDADE DE <i>A. BRASILENSE</i> AB-V5 NAS FORMULAÇÕES INOCULANTES: MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA ASSOCIADA AO USO DE CORANTES VITAIS.....	45
4.6	ESCALONAMENTO DA PRODUÇÃO DE INOCULANTE CONTENDO <i>A.</i> <i>BRASILENSE</i> AB-V5: ESCALA SEMI-PILOTO	46
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1	DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO PARA VEICULAÇÃO DE <i>AZOSPIRILLUM BRASILENSE</i> AB-V5.....	48
5.1.1	Ensaio 1. Seleção de Meios de Cultura para a Produção de Biomassa Celular de <i>A. brasilense</i> Ab-V5.....	48
5.1.1.1	Contagem de unidades formadoras de colônia	48
5.1.1.2	Produção de exopolissacarídeos.....	51
5.1.1.3	Avaliação do pH das formulações	56
5.1.2	Ensaio 2. Avaliação da Qualidade Fisiológica das Células de <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5 Cultivadas nas Formulações Desenvolvidas	57

5.1.2.1	Cinética de crescimento de <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5.....	58
5.1.2.2	Avaliação da agregação celular de <i>A. brasilense</i> Ab-V5 por microscopia de fluorescência	61
5.1.2.3	Produção de biomassa e polihidroxibutirato.....	66
5.1.2.4	Avaliação da presença de grânulos de polihidroxibutirato em cultivos de <i>A. brasilense</i> Ab-V5 por microscopia de fluorescência.....	72
5.2	VIABILIDADE DE <i>A. BRASILENSE</i> AB-V5 NAS FORMULAÇÕES INOCULANTES: DETERMINAÇÕES DE UFC E MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA COM USO DE CORANTES VITAIS	77
5.3	ESCALONAMENTO DA PRODUÇÃO DE INOCULANTE CONTENDO <i>A.</i> <i>BRASILENSE</i> AB-V5: ESCALA SEMI-PILOTO	84
6	CONCLUSÕES	88
	REFERÊNCIAS	89
	ANEXOS	99
	ANEXO A – PEDIDO DE PATENTE	99
	REFERÊNCIAS	117

1 INTRODUÇÃO

Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal (BPCVs) se associam a diferentes espécies de plantas em ambientes naturais, e sua principal característica é favorecer o desenvolvimento do vegetal por mecanismos como: a fixação biológica de nitrogênio (FBN), produção de fitormônios, solubilização de fósforo, o controle biológico de fitopatógenos (DOBBELARE; VANDERLEYDERN; OKON, 2003), entre outros.

A utilização de BPVCs em ambientes agrícolas é uma alternativa frente ao uso de fertilizantes químicos, podendo contribuir para o desenvolvimento de uma agricultura sustentável e de menor impacto ambiental (HERRMANN; LESUEUR, 2013). A inoculação desses microrganismos em cultivos agrícolas é realizada pela aplicação de inoculantes, definidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), como um produto que contém microrganismos que atuam favoravelmente no desenvolvimento das plantas (BRASIL, 2011).

Em comparação com os produtos químicos, os inoculantes apresentam as seguintes vantagens: aumento do crescimento e da produtividade das culturas pela disponibilidade de nutrientes, melhoria na qualidade do solo, redução da poluição ambiental causada pela aplicação de fertilizantes e produtos químicos utilizados na agricultura, além de proporcionar uma maior economia ao agricultor (BERG, 2009; BRAHMAPRAKASH; SAHU, 2012). No Brasil, estima-se que a utilização desses insumos biotecnológicos proporciona uma economia em torno de R\$ 4,6 bilhões para cultura do milho (HUNGRIA, 2011), e R\$ 14 bilhões de reais para a da soja, anualmente (BRASIL, 2012).

Apesar dos bons resultados encontrados devido à utilização de inoculantes agrícolas, diversos fatores influenciam a utilização eficiente da tecnologia, e estes vão desde a sua produção até a sua utilização a campo (BASHAN et al., 2013). Como proposto por Stephens e Rask (2000) para que se possa formular e produzir comercialmente os inoculantes é necessária a integração dos parâmetros físicos, químicos e biológicos, permitindo assim elevadas populações do microrganismo alvo e maior tempo de sobrevivência no produto. Os mesmos autores relatam que formulações inadequadas são frequentemente as barreiras mais comuns para a comercialização dos inoculantes.

Dessa forma, diversos tipos de polímeros e materiais orgânicos têm sido empregados como aditivos aos meios de cultivo de células bacterianas para o desenvolvimento de novas formulações inoculantes (ALBAREDA et al., 2008; JÚNIOR et al., 2009, 2012). Ainda, as BPCVs utilizadas na produção de inoculante apresentam uma série de mecanismos fisiológicos eficazes que podem auxiliar na manutenção da viabilidade celular durante condições estressantes para a bactéria, podendo aumentar a eficiência da tecnologia de inoculação. Dentre esses mecanismos estão a produção de biopolímeros como exopolissacarídeos (EPS) e polihidroxibutirato (PHB), agregação celular e a formação de cistos (SADASIVAN; NEYRA, 1985, 1987; BURDMAN et al., 1998, 2000; KONNOVA et al., 2001; KADOURI; JURKEVITCH; OKON, 2003; FIBACH-PALDI; BRUDMAN; OKON, 2012). A exploração destes mecanismos pode levar ao desenvolvimento de formulações inoculantes com elevada eficiência agrônômica, pela melhoria da sobrevivência da bactéria no inoculante ou no solo (BASHAN; TREJO; DE-BASHAN, 2011; KUMARESAN; REETHA, 2011; JOE et al., 2012; MORENO-GALVÁN; ROJAS-TAPIAS; BONILLA, 2012; SILVA et al., 2012). Assim, estudar a qualidade fisiológica das células de *Azospirillum* é um parâmetro adicional para o desenvolvimento de novas formulações de inoculantes.

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo desenvolver um meio de cultura para a produção de biomassa celular de *Azospirillum brasilense* que proporcione elevada densidade de células e alta concentração de biopolímeros (EPS e PHB), buscando favorecer a sobrevivência do microrganismo no produto e após sua utilização como inoculante.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um meio de cultura para a produção de biomassa celular de *Azospirillum brasilense* que proporcione uma elevada densidade de células e alta concentração de biopolímeros (exopolissacarídeos e polihidroxibutirato), buscando favorecer a sobrevivência do microrganismo no produto e após sua utilização como inoculante.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar formulações de meio de cultura para a produção de biomassa celular de *Azospirillum brasilense* Ab-V5 e exopolissacarídeos;
- Avaliar a qualidade fisiológica das células de *Azospirillum brasilense* Ab-V5 durante o cultivo nas formulações desenvolvidas pela cinética de crescimento, agregação celular, produção e formação dos grânulos de polihidroxibutirato;
- Avaliar a viabilidade de *Azospirillum brasilense* Ab-V5 nas formulações inoculante pela contagem de UFC e microscopia de fluorescência associada ao uso de corantes vitais;
- Avaliar o crescimento de *Azospirillum brasilense* Ab-V5 em meio FORM15 em escala semi-piloto.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS E BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL (BPCVs)

O nitrogênio é considerado fator limitante na produção agrícola, influenciando o crescimento das plantas mais do que qualquer outro nutriente. Isso porque está presente na composição das mais importantes biomoléculas, como proteínas, aminoácidos, bases nitrogenadas, clorofila, enzimas, entre outras (KIM; REES, 1994).

Dentre os processos que disponibilizam nitrogênio para as plantas estão: (1) a decomposição da matéria orgânica do solo, (2) fixação não-biológica, resultante de descargas elétricas, combustão e vulcanismo, (3) fixação biológica de nitrogênio (FBN), (4) e adição de fertilizantes nitrogenados (HUNGRIA; CAMPOS; MENDES, 2001). Este último é o método mais comum utilizado em cultivos agrícolas. Porém, a produção química industrial dos fertilizantes nitrogenados é um processo caro, além de seu uso excessivo causar poluição ambiental através de perdas por lixiviação ou volatilização (BRAHMAPRAKASH, SAHU, 2012).

Embora a atmosfera seja composta por 78% de N_2 , nenhum animal ou planta consegue utilizá-lo como nutriente, pois os dois átomos do N_2 estão ligados por uma tripla ligação muito estável, requerendo alta energia para quebrá-la. Entretanto, alguns microrganismos possuem capacidade de fazer a conversão do N_2 molecular em forma amoniacal em condições biológicas, a 25 °C e 1 atm, via complexo enzimático chamado dinitrogenase, que é capaz de romper a tripla ligação do N_2 atmosférico e reduzi-lo a amônia, a mesma forma obtida no processo industrial (HUNGRIA; CAMPOS; MENDES, 2001; BRAHMAPRAKASH; SAHU, 2012) Esses microrganismos são denominados diazotróficos e o processo biológico realizado pelos mesmos é chamado fixação biológica de nitrogênio. Após a fotossíntese, a FBN é considerada o mais importante processo biológico fundamental para a vida (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002).

Essas bactérias, também denominadas fixadoras de N_2 , se associam a diversas espécies de plantas, em diferentes graus de especificidade, levando à classificação como simbióticas, associativas, de vida livre ou endofíticas (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007). *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*,

Allorhizobium, *Sinorhizobium* e *Mesorhizobium* são exemplos de bactérias simbióticas e são encontradas associadas às espécies de leguminosas arbóreas, forrageiras e de grãos. Já as bactérias pertencentes ao gênero *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Pseudomonas* são ditas de vida livre ou associativas, enquanto *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia* são classificadas como endofíticas. Os microrganismos associativos e endofíticos são geralmente encontrados colonizando espécies de gramíneas (VIDEIRA; ARAÚJO; BALDANI, 2007; HAYAT et al., 2010).

Para que a associação entre bactéria e planta seja estabelecida, é necessário que ocorra a colonização das bactérias, que inclui o reconhecimento, adesão, invasão (simbióticos e endófitos), colonização, crescimento e várias estratégias para estabelecer essas interações. As raízes das plantas iniciam a comunicação com os microrganismos do solo por meio da produção de sinais que são reconhecidos pelos microrganismos, que por sua vez, produzem sinais que iniciam a colonização (BAIS et al., 2006). Após a colonização, a sobrevivência das bactérias ao longo do tempo está sob influência de fatores bióticos e abióticos do ambiente.

A maior contribuição do processo de FBN ocorre pela associação simbiótica de leguminosas com bactérias denominadas rizóbios, apresentando as taxas mais elevadas de fixação biológica (HUNGRIA, 2011). A cultura da soja, por exemplo, dispensa totalmente a adição de fertilizantes nitrogenados, pois o nitrogênio proveniente da FBN supre completamente as necessidades da planta (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007). A simbiose com essas bactérias é identificada devido à formação de uma estrutura especializada nas raízes chamada nódulo (HUNGRIA, 2011).

As bactérias associativas contribuem para o crescimento da planta sem a formação de estruturas diferenciadas, neste caso, estão dispersas no solo e/ou na rizosfera (VIDEIRA; ARAÚJO; BALDANI, 2007). Diversas bactérias que derivam da rizosfera também podem colonizar tecidos internos das plantas e estas são ditas endófitas ou endofíticas. Estudos confirmam que o interior da planta é colonizado por uma variedade de endófitos em sua maioria decorrentes da rizosfera e muitos deles têm demonstrado efeitos benéficos no crescimento das plantas (STURZ; NOWAK, 2000; HARDOIM et al., 2008).

No caso da FBN realizada por bactérias endofíticas ou associativas, o mesmo complexo da dinitrogenase realiza a conversão do N₂ da atmosfera em amônia. Porém, ao contrário das bactérias simbióticas, as bactérias associativas excretam somente uma parte do nitrogênio fixado diretamente para a planta associada; posteriormente, a mineralização das bactérias pode contribuir com aportes adicionais de nitrogênio para as plantas. Neste caso, o processo de fixação biológica por essas bactérias consegue suprir apenas parcialmente as necessidades das plantas (HUNGRIA, 2011).

As bactérias diazotróficas também podem ser classificadas como BPCVs, pois são capazes de promover benefícios às plantas não apenas pela FBN, mas também, por outros mecanismos. Esses mecanismos incluem ações diretas como: síntese de sideróforos, produção de fitormônios, solubilização e mineralização de fosfato. Inclui também mecanismos de ação indireta como: indução de resistência sistêmica nos vegetais, diminuição de fatores de estresse, produção de antibióticos e antagonismo a fitopatógenos, entre outros fatores. Em geral, acredita-se que as BPCVs favorecem o crescimento das plantas por uma combinação de todos esses mecanismos (DOBBELARE; VANDERLEYDERN; OKON, 2003).

A produção de reguladores de crescimento como fitormônios faz parte do metabolismo de diversas espécies de bactérias associadas aos vegetais e podem ser considerados agentes causais da alteração do crescimento e desenvolvimento vegetal (BASHAN; HOLGUIM, 1997). Entre essas substâncias estão as auxinas, citocininas, e giberelinas. Estes fitormônios causam modificações na morfologia das raízes, podendo contribuir para melhor absorção de água e nutrientes do solo (BASHAN; HOLGUIN; DE-BASHAN, 2004).

As contribuições da inoculação de BPCVs em diversas espécies de plantas são vastamente relatadas na literatura, e dentre as bactérias associativas, o gênero *Azospirillum* é o mais estudado. Okon e Vanderleyden (1997) relataram que o gênero *Azospirillum* promove ganhos em rendimento em importantes culturas, e salientam que a inoculação desta bactéria não se restringe apenas ao suprimento de nitrogênio pela FBN, mas também ao aumento no sistema radicular da planta, podendo aumentar o volume do solo explorado. Desse modo, os benefícios das bactérias diazotróficas vão além da FBN, razão pela qual as bactérias são classificadas como BPCVs (HUNGRIA, 2011).

3.1.1 Gênero *Azospirillum*

As bactérias pertencentes ao gênero *Azospirillum* são conhecidas por sua associação com diversas espécies de plantas e atuam como promotoras do crescimento vegetal seja pela sua capacidade de fixar nitrogênio, ou produzir substâncias que auxiliam no crescimento das plantas (STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000; BASHAN; HOLGUIN; DE-BASHAN, 2004; REIS; PEDRAZA; TEIXEIRA, 2010). Essas bactérias geralmente são encontradas habitando a rizosfera, mas algumas estirpes possuem mecanismos específicos de interação com as raízes e podem colonizar o interior das mesmas (STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000). Podem ser encontradas em associação com gramíneas de grande importância econômica, como o trigo, milho, arroz, e diversas forrageiras (HARTMAN; BALDANI, 2006).

O gênero *Azospirillum* ganhou destaque mundial a partir da década de 1970, e atualmente compreende cerca de 15 espécies descritas (DOBEREINER; DAY, 1976; REIS; PEDRAZA; TEIXEIRA, 2010). Em termos de fisiologia e genética, as espécies mais estudadas são *Azospirillum lipoferum* e *Azospirillum brasilense* (REIS; PEDRAZA; TEIXEIRA, 2010).

As bactérias do gênero *Azospirillum* pertencem à subdivisão α -proteobactéria, são caracterizadas como Gram-negativas, e apresentam morfologia celular em forma de bastonete com dimensões de 0,8-1,0 μm de diâmetro e 2,0-4,0 μm de comprimento. Quando supridos com fonte de nitrogênio combinado, são aeróbios típicos, porém, quando dependem da fixação de N_2 , são microaerofílicos (DOBEREINER et al., 1995; REIS; PEDRAZA; TEIXEIRA, 2010). Representantes do gênero *Azospirillum* são conhecidos por utilizar ácidos tricarbóxicos (malato, citrato, α -cetoglutarato, succinato) e outros ácidos orgânicos como única fonte de carbono. No entanto, estudos demonstraram uma variabilidade no uso de outras fontes de carbono como açúcares (D-frutose e D-glicose) (REIS; PEDRAZA; TEIXEIRA, 2010).

Em condições desfavoráveis como a dessecação e a limitação de nutrientes, as células de *Azospirillum* podem sofrer mudanças morfológicas ocorrendo a formação de cistos (SADASIVAN; NEYRA, 1985, 1987). Esta alteração é acompanhada pela produção de exopolissacarídeos (EPS) e acúmulo intracelular de polihidroxibutirato (PHB), que podem servir como fonte de C e energia em

condições de estresse para a bactéria (OKON; ITZIGSOHN, 1992; SKVORTSOV; IGNATOV, 1998; KONNOVA et al., 2001; KADOURI; JURKEVITCH; OKON, 2003).

3.2 INOCULANTES

A agricultura brasileira apresenta um alto consumo de fertilizantes, sendo o quarto maior consumidor mundial. No entanto, o país permanece dependente da disponibilidade e dos preços do mercado internacional, uma vez que a produção nacional de fertilizantes supre somente cerca de 30% do mercado (ANDA, 2014). Além dos aspectos econômicos, problemas ambientais podem ser parcialmente atribuídos ao uso indiscriminado de fertilizantes industrializados como a contaminação da água e do solo, a diminuição da biodiversidade nos agroecossistemas, o aparecimento de problemas fitossanitários, entre outros (FERRAZ, 1999).

Neste contexto, a utilização de BPCVs em ambientes agrícolas é uma alternativa frente ao uso de fertilizantes químicos, podendo contribuir para o desenvolvimento de uma agricultura sustentável e de menor impacto ambiental (HERRMANN; LESUEUR, 2013). A inoculação desses microrganismos em cultivos agrícolas é realizada pela aplicação de um produto chamado inoculante. Segundo o MAPA, o inoculante é definido como um produto que contém microrganismos que atuam favoravelmente no desenvolvimento das plantas (BRASIL, 2011). No entanto, o termo utilizado e a definição de inoculante podem ser passíveis de modificações e ampliações à medida que o conhecimento sobre o assunto avança (SILVA, 2009). Alguns autores referem-se a este produto utilizando o termo biofertilizante (BUCHER; REIS, 2008; BRAHMAPRAKASH; SAHU, 2012; HERRMANN; LESUER, 2013).

Os inoculantes têm sido utilizados por mais de um século, e a comercialização desse produto teve início nos EUA, após o registro da primeira patente de inoculante contendo rizóbio ("Nitragin"), para a aplicação em leguminosas no ano de 1896 (NOBBE; HILTNER, 1896 apud BASHAN, 1998). Após esse período, a inoculação de estirpes de rizóbio em leguminosas tornou-se uma prática comum (BASHAN, 1998).

No Brasil, a produção industrial destes inoculantes começou na década de 50 (FREIRE, 1968), a partir do estudo de bactérias fixadoras de nitrogênio para a cultura da soja. Atualmente, a aplicação de inoculantes em leguminosas como a soja é um método bem consolidado, levando o país à liderança mundial no uso de bactérias fixadoras de nitrogênio na agricultura (ARAUJO, 2014).

Além das leguminosas, há alguns anos têm-se conhecimento da ocorrência de associação entre bactérias diazotróficas com espécies da família Poaceae, além de outras famílias vegetais. Dessa forma, em 2010 foi possível o desenvolvimento do primeiro inoculante comercial para milho e trigo pela EMBRAPA Soja (PR), em parceria com a Universidade Federal do Paraná (UFPR) e a iniciativa privada. Ao longo de cinco anos de estudo, os resultados mostraram incrementos médios de 25% a 30% no rendimento do milho e de 13% a 18% no rendimento do trigo (HUNGRIA, 2011). Estimativas mostram que na safra 2012/2013 no Brasil mais de 2,5 milhões de hectares de milho foram inoculados (SEI, 2013).

Segundo o presidente da XVI rede de laboratórios para recomendação, padronização e difusão de tecnologia de inoculantes microbiológicos de interesse agrícola (RELARE), atualmente são comercializados 25 milhões de doses de inoculantes no Brasil, dos quais a maioria delas é destinada à cultura da soja (BRASIL, 2012). Juntamente com o Brasil, a Argentina é um dos maiores produtores e usuários de inoculantes do mundo (DAMASCENO, 2011).

A utilização de inoculantes microbianos em ambientes agrícolas tem apresentado um interesse crescente na atualidade e, em comparação com os produtos químicos, estes apresentam as seguintes vantagens (BERG, 2009; BRAHMAPRAKASH; SAHU, 2012):

- ❖ aumento no crescimento das plantas e na produtividade da cultura através da disponibilidade de nutrientes e fertilidade do solo;
- ❖ protege as plantas contra patógenos do solo;
- ❖ auxilia no crescimento da planta sob condições de estresse;
- ❖ promove a melhoria na qualidade do solo;

- ❖ reduz a poluição ambiental causada pela aplicação de fertilizantes e produtos químicos utilizados na agricultura;
- ❖ são eficazes em pequenas quantidades;
- ❖ oferece uma maior economia ao agricultor, uma vez que, os fertilizantes nitrogenados podem chegar a participar com até 40% dos custos de produção (MC LAUGHLIN et al., 2000; HUNGRIA; VARGAS, 2000). Além disso, o baixo custo dos inoculantes cria também condições para que agricultores familiares e/ou de baixa renda utilizem esta tecnologia.

Ainda com relação à economia, no Brasil, considerando somente a reposição parcial do fertilizante nitrogenado (50%) requerido por culturas como o milho e o trigo, a eficiência de utilização dos fertilizantes nitrogenados pelas plantas e o preço médio tradicional dos fertilizantes no mercado nacional a US\$ 1 por kg de N, estima-se que o uso dos inoculantes nessas culturas pode resultar em uma economia estimada de R\$ 4,6 bilhões por ano (HUNGRIA, 2011). Já no caso de inoculação da soja, a cultura dispensa totalmente o uso de fertilizantes nitrogenados, o que resulta em uma economia de cerca de R\$ 14 bilhões de reais anualmente no país (BRASIL, 2012).

3.2.1 Formulação e Produção de Inoculantes

O sucesso da tecnologia de inoculação de BPCVs depende de dois fatores: da estirpe microbiana e da formulação de inoculante (BRAHMAPRAKASH; SAHU, 2012). A formulação consiste de um veículo que deve proporcionar um ambiente adequado, incorporado à proteção física, que permita uma alta densidade de células viáveis no produto até sua utilização a campo. Além disso, qualquer formulação deve ser estável durante a produção, armazenamento e transporte até o agricultor. Deve-se levar em conta também a facilidade no manuseio e na aplicação do produto a campo, tendo em vista as limitações dos produtores agrícolas (BASHAN, 1998; BASHAN et al., 2013; HERRMANN; LESUEUR, 2013).

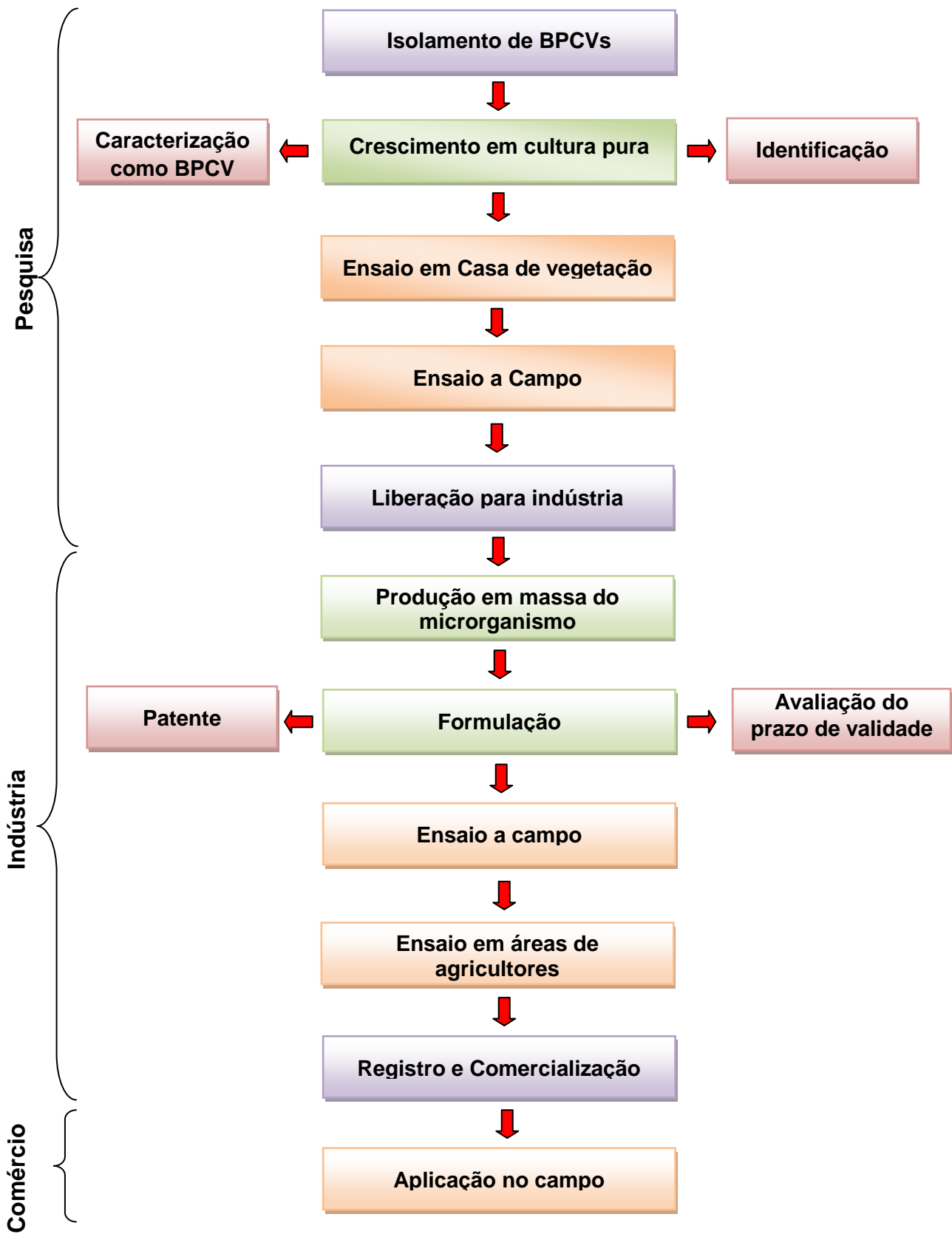
Para o desenvolvimento de inoculantes microbianos são necessárias várias etapas até a obtenção do produto comercial conforme demonstrado na Figura

1. Um dos primeiros e mais importantes passos na produção de um inoculante é a seleção de estirpes de BPCVs com alto potencial biotecnológico (HUNGRIA et al., 2005). Para a escolha das estirpes, são necessários estudos *in vitro* que permitam a identificação e caracterização dessas bactérias, bem como ensaios em casa de vegetação e em condições de campo. O passo seguinte é a elaboração de uma formulação de inoculante para a cultura-alvo. As estirpes bacterianas selecionadas são geralmente cultivadas em meio líquido para obtenção de altos níveis populacionais, sendo que a composição do meio e as condições do cultivo (temperatura, agitação, tempo de cultivo) estão diretamente relacionadas com a natureza da estirpe e o tipo de inoculante que será produzido. Os cultivos de bactérias são então incorporados ao veículo se este for sólido, e quando o inoculante for líquido, realiza-se a adição de aditivos como será discutido a frente. Para produção industrial em larga escala, o cultivo da estirpe bacteriana é realizado em fermentadores (BURTON, 1984; BASHAN, 1998; ANPII, 2012; BASHAN et al., 2013; HERRMANN; LESUEUR, 2013).

No Brasil, o inoculante é desenvolvido e produzido de acordo com protocolos estabelecidos pela RELARE. A RELARE é um fórum em que os pesquisadores se reúnem a cada dois anos e, após análise dos resultados obtidos, uma lista com as estirpes selecionadas passam a ser recomendadas. Se aprovadas, as estirpes são cadastradas pelo MAPA para que possam ser usadas na produção de inoculantes (BRASIL, 2011). A determinação das estirpes recomendadas é complexa, pois deve considerar fatores como: a eficiência com todas as cultivares recomendadas, capacidade de competir com os organismos do solo, apresentar fermentação adequada na indústria e, principalmente, ter a capacidade de se adaptar aos solos, sem nenhum prejuízo a comunidade microbiana natural do mesmo (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007; HERRMANN; LESUEUR, 2013).

Bashan et al. (2013) relatam que a literatura científica está repleta de estirpes com alto potencial biotecnológico, no entanto, estas não aparecem no mercado comercial possivelmente devido à formulação inapropriada. Dessa forma, um dos maiores desafios na atualidade é desenvolver uma formulação de inoculante que reúna todas as características acima descritas e que sejam adequadas para o uso sob condições de campo (HERRMANN; LESUEUR, 2013).

Figura 1 Fluxograma de procedimentos para o desenvolvimento de inoculantes.



Fonte: modificado de Bashan et al. (2013).

3.2.2 Características Desejáveis do Veículo a ser Utilizado nas Formulações de Inoculante

O veículo utilizado na formulação de inoculante representa a maior porção (em volume ou peso) do produto, e dentre as características desejáveis de um veículo, estes devem (BRAHMAPRAKASH; SAHU, 2012; BASHAN et al., 2013; HERRMANN; LESUEUR, 2013):

- ❖ proporcionar um ambiente adequado para a sobrevivência do microrganismo durante o prazo de validade do produto;
- ❖ as características físicas e químicas devem ser uniformes;
- ❖ ser adequado para o maior número de espécies e estirpes bacterianas possíveis;
- ❖ apresentar afinidade pela água;
- ❖ ser de fácil produção;
- ❖ possuir pH quase neutro ou facilmente ajustável;
- ❖ ser de fácil manejo (grande preocupação dos agricultores);
- ❖ não ser tóxico, apresentar biodegradabilidade e não fornecer riscos ambientais;
- ❖ ser constituído de matéria prima de baixo custo;
- ❖ fornecer liberação rápida e controlada de bactérias no solo.

O veículo utilizado também deve ter a capacidade de manter uma grande quantidade de células inoculadas viáveis no solo e na semente até o período em que essa começa a germinar (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007).

3.2.3 Tipos de Veículos Inoculantes Comerciais

No mercado, os inoculantes estão disponíveis em duas formas físicas: na forma sólida e líquida, sendo que o veículo utilizado na produção desses inoculantes é crucial para a manutenção da viabilidade celular (ANPII, 2012).

3.2.3.1 Veículo sólido

Os inoculantes sólidos são veiculados em turfa, sendo vendidos no Brasil desde a década de 1950 (JARDIM-FREIRE; VERNETTI, 1999). Esse material é formado pela decomposição anaeróbica lenta de restos vegetais de diferentes origens e em diferentes estádios de decomposição, apresentando mais de 90% de matéria orgânica em sua composição. A turfa como veículo inoculante proporciona viabilidade adequada de células durante o tempo de prateleira do produto, oferece proteção física contra as adversidades do solo, apresenta alta capacidade de retenção de umidade, não é tóxica para o microrganismo, e tem capacidade de tamponamento de pH (SILVA, 2009; BASHAN et al., 2013).

Entretanto, a turfa é um material não renovável e poderá se tornar escasso no futuro, já que no Brasil há poucas turfeiras de qualidade adequada a produção de inoculantes, o que demanda importação deste substrato, com elevação do custo de produção. Além disso, há uma grande variação nas propriedades físicas e químicas das turfas sendo essa de composição desigual (FERNANDES JUNIOR et al., 2009). Este problema foi observado no trabalho realizado por Ferreira et al. (2010), no qual demonstraram que a turfa importada resultou em maior sobrevivência das estirpes de bactérias diazotróficas quando comparadas com a turfa nacional. Segundo os autores, esse comportamento pode ter sido influenciado pelas diferenças existentes entre teores de nutrientes e a origem do material dos substratos turfosos.

3.2.3.2 Veículo Líquido

Visando facilitar o uso do inoculante, em torno de 1990 começaram a surgir os inoculantes líquidos, mais práticos de usar e que hoje ocupam cerca de 70% do mercado (ANPII, 2012).

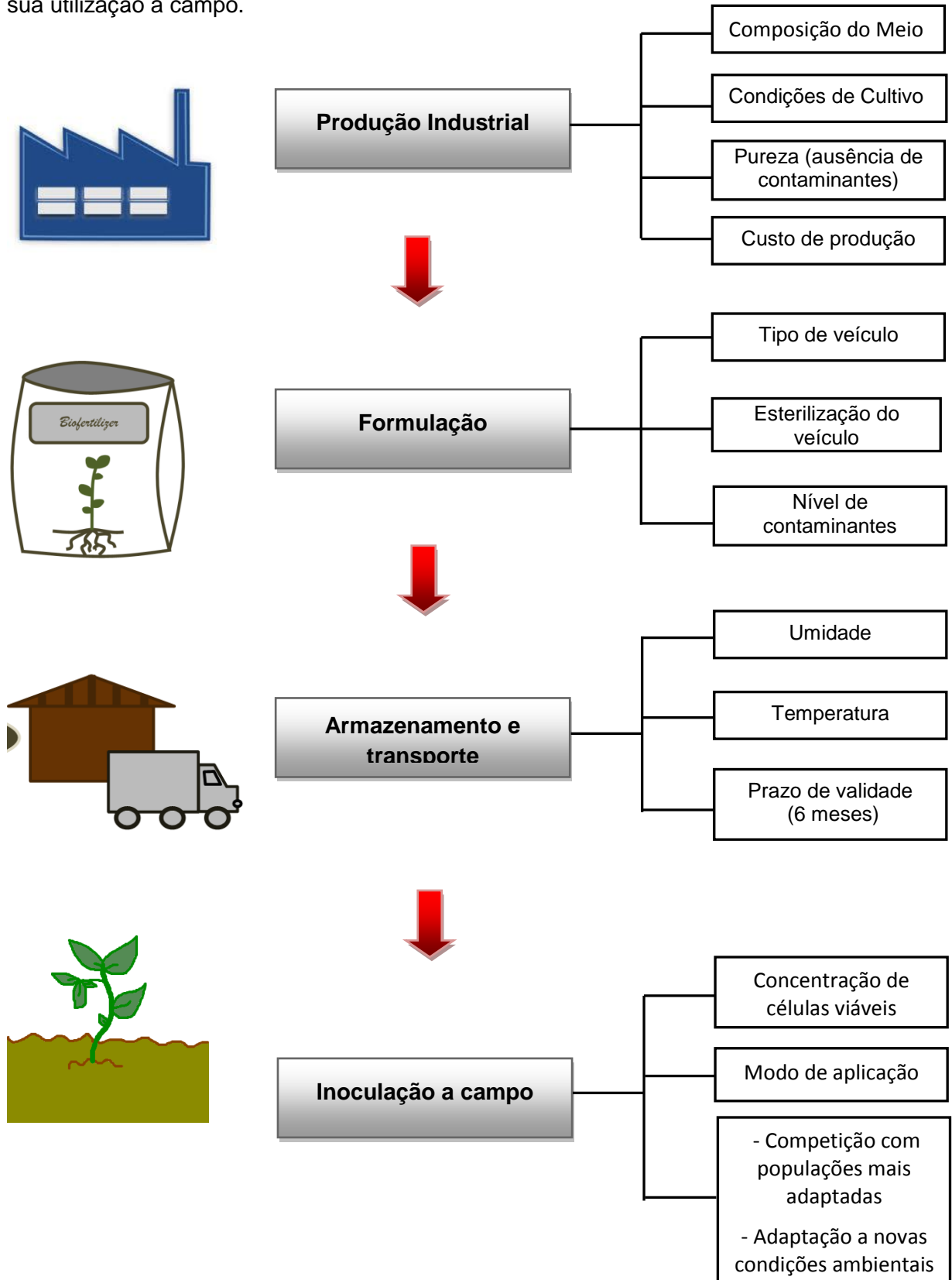
Os inoculantes líquidos são constituídos de um substrato aquoso estéril onde se veiculam as bactérias, e apresentam vantagens pela facilidade de esterilização evitando a presença de contaminantes. Assim, é possível obter um maior número de células no produto (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007). Devido a sua natureza fluida, a adesão dos microrganismos e a aplicação em sementes ou no campo tornam-se facilitadas. Além disso, o inoculante líquido pode ser produzido por um processo de fermentação simples, sendo embalado asépticamente direto do fermentador e armazenado. Isso minimiza o custo de produção, evitando o processamento e esterilização do material de suporte sólido (BRAHMAPRAKASH; SAHU, 2012). No entanto, a sobrevivência de bactérias nesse tipo de inoculante e nas sementes inoculadas é dificultada porque as bactérias não estão protegidas do estresse ambiental quanto aquelas presentes em um inoculante contendo turfa (TITTABUTR et al., 2007). Para resolver este problema, após a multiplicação da bactéria, esta é misturada com substâncias protetoras (ANPII, 2012).

Uma pesquisa realizada pela Associação Nacional dos Produtores e Importadores de Inoculantes (ANPII) revelou que 61% dos agricultores preferem a utilização de inoculante líquido, enquanto 19% ainda preferem o turfoso, e outros 19% utilizam a mistura dos dois. A pesquisa demonstrou que o inoculante líquido desponta como o preferido pelos agricultores. Dessa forma, os maiores investimentos das empresas devem se concentrar no desenvolvimento de formulações líquidas de inoculante, uma vez que esta apresenta maior mercado (ANPII, 2014).

3.2.4 Fatores que Limitam a Eficiência do Inoculante

Existe uma série de fatores que influenciam a qualidade e a eficácia do inoculante, e estes vão desde a sua produção até a utilização a campo (Figura 2).

Figura 2 Principais fatores que afetam a qualidade dos inoculantes desde a produção até sua utilização a campo.



Fonte: Modificado de Herrmann e Lesueur (2013).

A eficiência da inoculação com BPCVs depende em grande parte da qualidade das formulações inoculantes existentes no mercado, que devem assegurar conformidade com a legislação específica do MAPA (BRASIL, 2011). Essa legislação determina um número mínimo de células viáveis de 1×10^8 (inoculantes para gramíneas) ou 1×10^9 (Inoculantes para leguminosas) células por grama ou mililitro de formulação por pelo menos 6 meses após a fabricação. Entretanto, a sobrevivência de bactérias em formulações inoculantes líquidas ainda é um fator limitante para a expansão do uso da tecnologia de inoculação de plantas não-leguminosas com BPCVs. Durante o processo de armazenamento e transporte do produto, os microrganismos podem atingir uma mortalidade maior que 90% da população inicial incorporada ao veículo. A sobrevivência da bactéria pode ser afetada por diversos fatores como o meio de cultura utilizado para o crescimento das bactérias, o estado fisiológico das bactérias, o tipo de veículo utilizado, e a umidade e temperatura de armazenamento (BASHAN et al., 2013).

Após a aplicação do inoculante nas sementes ou no solo, alguns fatores também podem influenciar a ocorrência de uma associação eficiente entre as BPCVs e seu hospedeiro. A heterogeneidade e variabilidade, encontrada nos diferentes ambientes agrícolas, dificultam a colonização e o estabelecimento de bactérias inoculadas, que devem competir com microrganismos nativos, portanto melhor adaptados, além de sobreviver ao ataque de outros organismos predadores. Esta variabilidade na capacidade de estabelecimento de uma estirpe inoculante depende do tipo de solo e sua microbiota nativa, das espécies vegetais presentes, da densidade de inóculo e das condições edafoclimáticas. Tais fatores podem atuar no declínio da densidade populacional dos microrganismos introduzidos e levar ao insucesso das respostas pretendidas (KIM et al., 1997; BASHAN, 1998; O'CALLAGHAN et al., 2001; STRIGUL; KRAVCHENKO, 2006).

Os microrganismos podem se desenvolver muito bem em condições de laboratório, mas a dificuldade está em ajustar uma formulação para o inoculante de modo que o produto seja capaz de manter uma alta população viável do microrganismo e proporcionar resultados equivalentes em condições de campo (STEPHENS; RASK, 2000).

3.2.5 Alternativas para Melhoria da Qualidade dos Inoculantes

3.2.5.1 Utilização de polímeros

A utilização de veículos alternativos tem sido foco de estudos e diversos materiais testados têm demonstrado bons resultados para o desenvolvimento de novas formulações de inoculantes. Uma das estratégias mais recorrentes apresentadas como alternativa ao uso de inoculantes turfosos e melhoria aos líquidos é o uso de misturas poliméricas. Dentre os polímeros estudados estão carboximetilcelulose (CMC), alginato, amido, polivinilpirrolidona (PVP), goma xantana, outras gomas de origem microbiana ou vegetal e o glicerol (TITTABUTR et al., 2007; ALBAREDA et al., 2008; JÚNIOR et al., 2009, 2012; BASHAN; TREJO; DE-BASHAN, 2011).

Alguns aditivos são utilizados em formulações líquidas com função principal de proteger as células microbianas contra compostos tóxicos presentes no solo ou na semente em processo de germinação, ou contra estresses térmicos. O glicerol, por exemplo, interage com a água e protege as células dos efeitos de dessecação, apresenta também uma elevada estabilidade físico-química, limita a transferência de calor e pode ainda ser usado como fonte de carbono por bactérias, como demonstrado por Bashan, Trejo e de-Bashan (2011). Polímeros como PVP e goma xantana também interagem com a água, atuando contra os efeitos de dessecação e sua consistência viscosa pode melhorar a adesão das células às sementes (TEMPRANO et al., 2002). Kumaresan e Reetha (2011) avaliaram a sobrevivência de *Azospirillum brasilense* em formulações líquidas de inoculante com adição de diferentes polímeros como goma arábica, PVP, glicerol, trealose, polietileno glicol (PEG) e polivinil álcool (PVA). Os resultados demonstraram que a adição de trealose, glicerol, goma arábica e PVP permitiu a manutenção de células de *Azospirillum* (10^8 UFC.mL⁻¹) até 11 meses de armazenamento do produto, seguido por PEG até 8 meses e PVA até 7 meses.

Polímeros como carboximetilcelulose (CMC) e amido também têm sido estudados em formulações de inoculante. Fernandes Junior et al. (2009) avaliaram a mistura desses dois polímeros e observaram que as composições M4 (60-40% de CMC e amido respectivamente) e M3 (50-50% de CMC e amido, respectivamente) com 1% de MgO foram capazes de manter a mesma concentração

de células de *Bradyrhizobium* durante todo o período de armazenamento, enquanto que a formulação com turfa apresentou um ligeiro decréscimo. Neste mesmo trabalho foi observado que o inoculante à base de polímeros apresentou semelhante eficiência de nodulação quando comparado com a turfa. Silva et al. (2012) também avaliaram a mistura de CMC e amido em formulações de inoculante e constataram a sobrevivência de *G. diazotrophicus* e *A. amazonense* (10^9 UFC.mL⁻¹) até 120 dias de armazenamento.

O encapsulamento de BPCVs em uma matriz polimérica também tem sido relatado na literatura e o alginato é o material mais utilizado para esse fim (TRIVEDI; PANDEY; PALNI, 2005; YOUNG et al., 2006; JOE et al., 2012). As vantagens das formulações de alginato são a sua natureza não tóxica, a biodegradabilidade, o fornecimento de um ambiente protegido para o microrganismo, e a liberação lenta da bactéria imobilizada, que é controlada pela estrutura polimérica (BASHAN et al., 2013). No entanto, o encapsulamento da bactéria pode apresentar altos custos de produção e necessidade de mão de obra especializada (REIS, 2007).

3.2.5.2 Mecanismos fisiológicos do microrganismo

Diversas BPCVs utilizadas na produção de inoculante apresentam mecanismos fisiológicos eficazes que podem auxiliar na manutenção da viabilidade celular durante condições estressantes para a bactéria, podendo aumentar a eficiência da tecnologia de inoculação. Dentre esses mecanismos estão a produção de biopolímeros como exopolissacarídeos e polihidroxibutirado, agregação celular, e a formação de cisto (BAHAT-SAMET; CASTRO-SOWINSKI; OKON, 2004; BURDMAN et al., 2000; FIBACH-PALDI; BURDMAN; OKON, 2012; JOE et al., 2009; KADOURI; JURKEVITCH; OKON, 2003; KONNOVA et al., 2001; OKON; ITZIGSOHN, 1992; SADASIVAN; NEYRA, 1985, 1987).

A capacidade de produção de exopolissacarídeos (EPS) é um fenômeno bastante comum entre as bactérias que habitam o solo (PRIETO et al., 2011). Esta classe de biomoléculas compreende uma grande diversidade de biopolímeros extracelulares produzidos por microrganismos, em geral classificados como polissacarídeos capsulares (CPSs) e polissacarídeos dissociados da célula

bacteriana (PSs) (SKVORTSOV; IGNATOV, 1998). Estes biopolímeros possuem grande importância em associações simbióticas e patogênicas, pois estão presentes indissociadamente aos biofilmes formados quando os microrganismos sacrificam sua capacidade de locomoção em ambientes privados de nutrientes, para que possam economizar energia e se manter sob estas condições (SUTHERLAND et al., 2001; BEAUREGARD et al., 2013). Em *Azospirillum*, a produção de polissacarídeos extracelulares parece estar relacionada com a capacidade de adesão ao sistema radicular (BURDMAN et al., 2000), capacidade de agregação celular e floculação (JOE et al., 2012), e a formação de estruturas de resistência (SADASIVAN; NEYRA, 1985; TRUJILLO-ROLDÁN et al., 2013).

A produção de EPS por *A. brasilense* tem grande relevância para o desenvolvimento de novas formulações de inoculantes. Isso porque o polímero exerce um importante papel na proteção das células microbianas contra a dessecação, e auxiliam na adesão das bactérias às sementes durante o processo de inoculação (DROGUE et al., 2012; KONNOVA et al., 2001). Em adição, a presença de EPS pode influenciar positivamente a sobrevivência das células em condições desfavoráveis como as encontradas no ambiente de cultivo agrícola, atuar na proteção da enzima nitrogenase sob alta concentração de oxigênio e participar dos mecanismos bioquímicos envolvidos na interação planta – bactéria (BAHAT-SAMET; CASTRO-SOWINSKI; OKON, 2004; KEFALOGIANNI; AGGELIS, 2002).

O biopolímero polihidroxibutirato é conhecido como um material de armazenamento intracelular, sintetizado por muitos microrganismos, incluindo as bactérias do gênero *Azospirillum*. O acúmulo, degradação e utilização de PHB por bactérias sob condições de estresse constituem mecanismos que podem favorecer o estabelecimento, proliferação, sobrevivência e competição dos organismos, especialmente em ambientes competitivos em que fontes de carbono e de energia são limitantes, tais como os encontrados no solo (OKON; ITZIGSOHN, 1992). Diversos trabalhos já comprovaram que células ricas em PHB resistem a condições de estresse (OKON; ITZIGSOHN, 1992; RATCLIFF; KADAM; DENISON, 2008; SADASIVAN; NEYRA, 1987). Assim, estudos têm sido conduzidos com a finalidade de produzir células com alto conteúdo de PHB, visando maior longevidade da bactéria no inoculante (BURDMAN et al., 1998; KADOURI; JURKEVITCH; OKON, 2003).

A produção de exopolissacarídeo e polihidroxitirato durante o crescimento bacteriano é influenciada por fatores como: a composição do meio de cultura, concentração dos nutrientes no meio e as condições de cultivo (BAHAT-SAMET; CASTRO-SOWINSKI; OKON, 2004; BURDMAN et al., 2000; KADOURI; JURKEVITCH; OKON, 2003). Dessa forma, o estudo desses fatores pode proporcionar a produção desses metabólitos por BPCVs, e conseqüentemente, levar ao desenvolvimento de inoculantes com elevada eficiência agrônômica, pela melhoria da sobrevivência da bactéria no produto ou após sua aplicação em condições de campo.

3.2.6 Controle de Qualidade dos Inoculantes

A regulamentação para a produção e comercialização dos inoculantes varia dependendo do país, no entanto, nem sempre são aplicadas. Na França, todos os inoculantes devem ser testados de modo a não serem prejudiciais ao meio ambiente, plantas, animais e seres humanos. Além disso, os inoculantes devem ser produzidos a partir de culturas puras e veículos estéreis, fornecer pelo menos 10^6 células de rizóbios viáveis por semente no momento do plantio, e manter-se livre de contaminantes durante o armazenamento. No Canadá, existe também uma legislação apropriada para os inoculantes que requer o registro do produto e análise regular dos mesmos. Já em outros países como a Austrália, a Tailândia ou África do Sul, o controle de qualidade dos inoculantes é voluntário, de modo que os ensaios são realizados por laboratórios independentes, mas não são obrigatórios. Os Estados Unidos e Reino Unido também não apresentam uma regulamentação para produção de inoculantes, com o controle de qualidade dependente dos fabricantes (BRAHMAPRAKASH; SAHU, 2012; HERRMANN; LESUEUR, 2013).

Os inoculantes comercializados no Brasil têm sua qualidade controlada pelo MAPA que utiliza os parâmetros determinados pelo protocolo da RELARE. Segundo a Instrução Normativa nº 13, de 24 de março de 2011 do MAPA (BRASIL, 2011), todos os inoculantes devem:

- Apresentar concentração mínima de $1,0 \times 10^9$ (bactérias fixadoras de nitrogênio para simbiose com leguminosas) ou $1,0 \times 10^8$ (inoculantes para

gramíneas) Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por grama ou mililitro de produto;

- serem elaborados em suporte esterilizados;
- estarem livres de microrganismos não especificados em fator de diluição 10^{-5} ;
- serem elaborados em suporte que forneça todas as condições de sobrevivência ao microrganismo;
- apresentarem prazo de validade de, no mínimo, seis meses a partir da data de fabricação;
- serem elaborados somente com microrganismos autorizados para a produção de inoculantes.

Existem atualmente no Brasil registros de microrganismos autorizados para produção de inoculantes para as culturas da soja, feijão, ervilha, milho, trigo, arroz, amendoim, entre outros (BRASIL, 2011).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO PARA VEICULAÇÃO DE *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* AB-V5

4.1.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado para o experimento foi a estirpe Ab-V5 de *Azospirillum brasilense*, cedida pelo Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, PR. Esta estirpe está registrada no MAPA para uso como inoculante nas culturas de milho, trigo e arroz (BRASIL, 2011). A estirpe está armazenada sob criopreservação no laboratório de Bioquímica Molecular da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

4.1.2 Composição e Preparo das Formulações

Estudos anteriores desenvolvidos pelo grupo de pesquisa em biofertilizantes da UEL resultaram no desenvolvimento de uma formulação líquida (FORM15) para veiculação de *Azospirillum brasiliense* Ab-V5. Apesar dessa formulação estar sendo utilizada na produção de inoculantes aplicados experimentalmente em ensaios realizados pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fixação Biológica de Nitrogênio (INCT-FBN) (dados ainda não publicados), foram realizados ajustes nesta formulação com o objetivo de ampliar a capacidade de manutenção da viabilidade das células veiculadas.

Dessa forma, quatro novas formulações de meio de cultura foram desenvolvidas e testadas, tendo como base a composição da FORM15. Foram realizadas modificações na composição da formulação original, principalmente pela introdução de novos componentes (Tabela 1) e alteração da relação C/N (Tabela 2). As novas formulações de meio de cultura desenvolvidas foram denominadas MCA1, MCA2, MCA3 e MCA4, e a FORM15 (MARCELINO, 2012) foi utilizada como referência em todos os ensaios realizados.

Tabela 1 Composição química das formulações dos meios de cultura utilizados neste estudo (FORM15; MCA1; MCA2; MCA3; MCA4).

REAGENTES	FORM 15	MCA1	MCA2	MCA3	MCA4
Sacarose (g.L ⁻¹)	50	50	50	50	50
Extrato de Levedura (g.L ⁻¹)	50	10	50	10	50
Glicerol (g.L ⁻¹)	30	30	30	100	100
K ₂ HPO ₄ (g.L ⁻¹)	1,5	6,0	6,0	6,0	6,0
NH ₄ NO ₃ (g.L ⁻¹)	–	1,5	1,5	1,5	1,5
KH ₂ PO ₄ (g.L ⁻¹)	–	4,0	4,0	4,0	4,0
MgsO ₄ (g.L ⁻¹)	–	1,0	1,0	1,0	1,0
NaCl (g.L ⁻¹)	–	0,1	0,1	0,1	0,1
Goma xantana (g.L ⁻¹)	–	1,0	1,0	1,0	1,0
Polinilpirrolidona (PVP; g.L ⁻¹)	–	1,0	1,0	1,0	1,0
Fe-EDTA (sol. 0,5 M; mL.L ⁻¹)	–	2,0	2,0	2,0	2,0
Solução de micronutrientes* (mL.L ⁻¹)	0,08	5,0	5,0	5,0	5,0

*Dobereiner et al. (1995).

Tabela 2 Conteúdo médio de Carbono, Nitrogênio e Fósforo nas formulações testadas para a produção de biomassa celular de *A. brasilense* Ab-V5.

NUTRIENTES g/L*	FORM15	MCA1	MCA2	MCA3	MCA4
Carbono total (C_T)	46,26	28,31	47,51	55,7	74,9
Carbono assimilável (C_A)	46,26	27,06	46,26	54,45	73,65
Nitrogênio total (N_T)	5,51	1,79	6,2	1,79	6,2
Nitrogênio assimilável (N_A)	5,51	1,63	6,04	1,63	6,04
Fósforo total	1,02	2,13	2,73	2,13	2,73
RELAÇÃO C/N					
C_T/N_T	8,39	15,83	7,66	31,13	12,08
C_A/N_A	8,39	16,6	7,66	33,41	12,19

*Teores médios de carbono, nitrogênio e fósforo presentes nos componentes da formulação; C_A e N_A compreendem somente os teores de carbono e nitrogênio fornecidos pela sacarose, glicerol e extrato de levedura.

Para a elaboração das formulações testadas, os reagentes foram diluídos em água destilada e adicionados na ordem apresentada na Tabela 1. Todos os meios de cultura tiveram valores de pH ajustados para 6,6 - 6,8 e foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 30 min.

4.2 ENSAIO 1. SELEÇÃO DE MEIOS DE CULTURA PARA A PRODUÇÃO DE BIOMASSA CELULAR DE *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* AB-V5.

Com o objetivo de identificar dentre as novas formulações aquelas com potencial para aplicação na produção de biomassa celular e produção de EPS, foram determinadas a concentração de células viáveis, conteúdo de EPS e a avaliação do pH do meio conforme descrito a seguir.

4.2.1 Preparo do Inóculo e Condições de Cultivo

A partir da cultura de *A. brasilense* Ab-V5 criopreservada, foi preparado um cultivo em 5 mL de meio Dygs líquido (RODRIGUES NETO et al., 1986) por 24 h em agitador orbital a 180 rpm e 28 °C. Após este período de crescimento, a densidade de células no cultivo foi determinada por contagem em câmara de Neubauer. Paralelamente, foram preparados frascos Erlenmeyers (volume de 2 L) contendo 500 mL de cada um dos meios de cultivo ensaiados (Tabela 1). Os frascos contendo os meios de cultivo foram esterilizados a 121 °C durante 15 minutos, e inoculados com uma suspensão de células de *A. brasilense* Ab-V5 crescidas em meio Dygs líquido. A concentração celular inicial nos cultivos realizados em frascos Erlenmeyer foi de 1×10^4 células de *A. brasilense* Ab-V5 por mL de meio de cultura. Após a inoculação, os frascos foram incubados em agitador orbital a 180 rpm e 28 °C por até 120 h, em triplicata.

Foram coletadas amostras de 10 mL de cada um dos cultivos após 72, 96 e 120 h de incubação, sendo avaliados para cada coleta: o número de células viáveis da estirpe *A. brasilense* Ab-V5, a concentração de exopolissacarídeos e o pH dos cultivos.

4.2.2 Contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC)

A avaliação da viabilidade celular de Ab-V5 nas formulações foi realizada através da contagem de Unidades Formadoras de Colônia pelo método da gota (MILES; MISRA, 1938). Amostras de 1,0 mL dos cultivos foram seriadamente diluídas (1/10, v/v) em solução salina (NaCl 0,85%), e alíquotas de 30 µL das diluições 10^{-6} a 10^{-8} foram inoculadas em meio Dygs sólido. As placas foram divididas em seis setores, utilizando-se dois setores da placa por diluição. Cada diluição foi inoculada em três placas distintas, obtendo-se, portanto, seis repetições por diluição, para cada amostra. Após a inoculação, as placas foram incubadas em estufa a 30 ± 2 °C por 24 h, sendo a seguir efetuada a contagem do número de colônias em cada diluição. Os resultados foram expressos como número de unidades formadoras de colônia por mL de cultivo (UFC.mL⁻¹).

4.2.3 Produção de Exopolissacarídeos (EPS)

Para determinação da concentração de EPS, foram tomadas alíquotas de 10 mL das culturas de cada uma das formulações testadas, as quais foram centrifugadas a 9.956 g por 15 minutos a 4 °C para precipitação da biomassa celular e obtenção do extrato livre de células (ELC). Ao volume de ELC obtido como descrito (aproximadamente 10 mL) foram adicionados 30 mL de etanol absoluto gelado, agitando-se vigorosamente a mistura. Em seguida, a solução foi colocada em freezer -20 °C por 24 h, seguindo-se uma nova centrifugação (9000 rpm, 4 °C por 15 min) e descarte do sobrenadante. O EPS precipitado foi solubilizado em 5 mL de água destilada e submetido à diálise exaustiva contra água destilada em um volume de 4000 mL sob temperatura de 4 °C por 3 dias consecutivos (MENESES et al., 2009). Após a diálise, o material foi liofilizado e pesado.

4.2.4 Determinações de pH

Em adição às determinações de concentração de células viáveis e concentração de EPS nos cultivos, foram feitas determinações de pH para os tempos de cultivos definidos no item 4.2.1.

4.3 ENSAIO 2. AVALIAÇÃO DA QUALIDADE FISIOLÓGICA DAS CÉLULAS DE *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* AB-V5 CULTIVADAS NAS FORMULAÇÕES DESENVOLVIDAS

A partir dos resultados obtidos no ensaio anterior, foi possível selecionar duas formulações (MCA2 e MCA4) para essa próxima etapa. Além das formulações selecionadas o meio de cultivo FORM15 (MARCELINO, 2012) foi utilizado como referência em todas as avaliações. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Essa etapa do trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade fisiológica das células de *A. brasilense* Ab-V5 durante o cultivo nas formulações selecionadas, visando o desenvolvimento de um inoculante de alta eficiência. Foram determinadas a cinética de crescimento de *A. brasilense* Ab-V5, agregação celular, produção de biomassa e polihidroxibutirato. As avaliações foram realizadas em diferentes tempos de cultivo, e seguem descritas a baixo.

4.3.1 Preparo do Inóculo e Condições de Cultivo

A partir da cultura criopreservada, foi preparado um cultivo em 5 mL de meio Dygs (RODRIGUES NETO et al., 1986) líquido por 24 h, em agitador orbital a 180 rpm e 28 °C . Após este período de crescimento, a densidade de células nos cultivos foi determinada por contagem em câmara de Neubauer. Paralelamente ao preparo do inóculo, foram preparados frascos Erlenmeyers (volume de 250 mL) contendo 120 mL de cada um dos meios de cultivo ensaiados: MCA2, MCA4 e FORM15. Os frascos contendo os meios de cultivo foram esterilizados a 121 °C durante 15 minutos, e inoculados com uma suspensão de células de *A. brasilense* Ab-V5 crescida em meio Dygs líquido. A concentração inicial de células nos cultivos realizados em frascos Erlenmeyers foi de 1×10^4 células de *A. brasilense* Ab-V5 por mL de meio de cultura, seguindo uma incubação em agitador orbital a 180 rpm e 28 °C por até 10 dias. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.3.2 Cinética de Crescimento de *Azospirillum brasilense* Ab-V5

A cinética de crescimento de Ab-V5 nas formulações foi avaliada através da contagem de UFC pelo método da gota (MILES; MISRA, 1938). Para este ensaio, além das formulações MCA2, MCA4 e FORM15, foi utilizado o meio seletivo NFB para *A. brasilense*, usado por Baldani e Dobereiner (1980) para produção de inoculante, e que possui ácido málico (5 g L^{-1}) como fonte de carbono. O meio NFB foi utilizado a fim de comparar o comportamento da bactéria com as formulações desenvolvidas.

Resumidamente, foram coletadas alíquotas de 1,0 mL de cada um dos cultivos nas primeiras 6 e 12 h após a inoculação, e posteriormente em intervalos de 12 h até 10 dias de cultivo. Em cada coleta, as amostras foram seriadamente diluídas (1/10, v/v) em solução salina (NaCl 0,85%), e 30 μL das diluições 10^{-3} a 10^{-7} foram inoculadas em meio Dygs (RODRIGUES NETO et al., 1986) sólido. Após a inoculação, as placas foram incubadas em estufa a $30 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 h, sendo a seguir efetuada a contagem do número de colônias em cada diluição. Os resultados foram expressos como número de unidades formadoras de colônia por mL de cultivo (UFC.mL^{-1}).

A partir dos valores de contagens obtidos, foi calculada a taxa de crescimento (μ) utilizando a equação: $\mu = (\ln N_{t_1} - \ln N_{t_0}) / (t_1 - t_0)$, onde N_{t_1} é o número de células no momento da amostragem e N_{t_0} é o número de células inicial. O tempo de geração (g) também foi calculado utilizando a equação $g = \ln 2 / \mu$ (BASHAN; TREJO; DE-BASHAN, 2011).

4.3.3 Avaliação da Agregação Celular de *A. brasilense* Ab-V5 por Microscopia de Fluorescência

A capacidade de formar agregados e de realizar floculação pode influenciar positivamente a dispersão e a sobrevivência no solo de bactérias associativas, como *Azospirillum brasilense* (BURDMAN et al., 1998; JOE et al., 2010, 2012). Neste estudo, a agregação celular de cultivos de *A. brasilense* Ab-V5 nos diferentes meios foi visualizada através de microscopia de fluorescência por coloração com 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Esse corante interage com ácidos

nucleicos e permite a visualização de microrganismos em uma amostra. A máxima absorção do corante DAPI ocorre no comprimento de onda de 358 nm (ultravioleta) e seu máximo de emissão é de 461 nm (azul).

Para avaliação, foi coletado 1,0 mL de cada cultivo em intervalos de 24 h após a inoculação, perfazendo um total de 10 coletas (10 dias de cultivo). Alíquotas de 30 μ L de cada amostra foram coradas com 30 μ L de DAPI (1 μ g/mL, em água ultrapura esterilizada), e incubadas durante 5 min no escuro em temperatura ambiente (OLIVEIRA et al., 2008). Em seguida, as lâminas foram montadas em óleo de imersão com baixa fluorescência (Zeiss ImmersolTM 518F) e as amostras examinadas sob objetiva EC-Plan-Neofluar 100x em microscópio de epifluorescência Zeiss AxioVision. As imagens foram digitalizadas com o programa axion vision Rel. 4.8.2, em triplicata.

4.3.4 Produção de Biomassa

Para quantificar a produção de biomassa celular de *A. brasilense* Ab-V5 nas diferentes formulações, foram coletados 10 mL dos cultivos 12 h após a inoculação, e posteriormente em intervalos de 24 h até que fossem completados 10 dias de cultivo. Estas alíquotas foram centrifugadas a 9.956 g por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e a biomassa presente na fração precipitada foi lavada duas vezes com 5 mL de solução salina (NaCl 0,85%), seguida de centrifugação e descarte do sobrenadante. Em seguida, as amostras foram secas a 80 °C por 48 h, pesadas para determinação da produção de biomassa, e armazenadas a - 20 °C para posterior extração e quantificação da produção de polihidroxibutirato.

4.3.5 Produção de Polihidroxibutirato (PHB)

A quantificação da produção de PHB foi realizada de acordo com Karr; Waters e Emerich (1983) e Law e Slepecky (1961). Este método se baseia na mensuração de ácido crotônico, que é formado durante a despolimerização de PHB catalisada por ácido sulfúrico concentrado. A extração do polímero PHB foi realizada

a partir da biomassa seca que foi obtida como descrita no item 4.3.4. A biomassa seca de células foi ressuspendida em 12 mL de uma solução de hipoclorito de sódio 5,25 %, e a mistura foi incubada por 2 h a 40 °C. Decorrido o período de digestão celular, a mistura foi centrifugada a 3.910 g por 15 min a 4 °C e o sobrenadante foi descartado. O PHB presente na fração precipitada foi lavado com água (10 mL, agitação manual e centrifugação a 3.910 g por 15 min a 4 °C), em seguida com etanol (10 mL, agitação manual e centrifugação a 3.910 g por 15 min a 4 °C), e posteriormente foi seco em estufa a 70 °C.

O material seco contendo o polímero foi digerido em 1 mL de ácido sulfúrico concentrado a 90 °C durante 30 min. A solução foi resfriada, e a concentração de PHB foi determinada por absorvância em espectrofotômetro a 235 nm, utilizando ácido sulfúrico para calibração do aparelho (branco). A quantidade de ácido crotônico foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar desta substância que é $1,55 \times 10^4$ (LAW, SLEPECKY, 1961). Dessa forma, calculou-se a concentração de PHB sabendo que a quantidade de ácido crotônico é proporcional ao conteúdo de PHB da amostra.

4.3.6 Avaliação da Presença de Grânulos de Polihidroxibutirato (PHB) em Cultivos de *A. brasilense* Ab-V5 por Microscopia de Fluorescência

A formação dos grânulos intracelulares de PHB foi acompanhada durante os cultivos de *A. brasilense* Ab-V5 nas formulações MCA2, MCA4 e FORM15. Para esta finalidade, foram tomadas amostras dos cultivos 12 h após a inoculação, e em intervalos regulares de 24 h até 10 dias de cultivo.

Para visualização dos grânulos de PHB presentes nas células, as amostras foram coradas com vermelho do Nilo (Nile Red) e visualizadas em microscópio de epifluorescência (Zeiss AxionVision) como segue. Primeiramente, as amostras dos cultivos foram imobilizadas em lâminas para microscopia com a mistura de 10 µL de suspensão bacteriana com 10 µL de agarose a 1% em tampão PBS (50 °C). Imediatamente foram adicionados 50 µL de solução Nile red (0,1- 1 µg/mL em etanol) (JENDROSSEK, 2005; HERMAWAN; JENDROSSEK, 2007).

As preparações foram examinadas sob objetiva de imersão em óleo EC-Plan-Neofluar 100x, e as imagens foram digitalizadas pelo programa axion vision Rel. 4.8.2, em triplicata.

4.4 VIABILIDADE DE *A. BRASILENSE* AB-V5 NAS FORMULAÇÕES INOCULANTES: UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA

As formulações (MCA2; MCA4 e FORM15) foram avaliadas quanto a manutenção da viabilidade das células microbianas por um período de 20 dias de armazenamento.

Foi preparado um pré-inóculo a partir do cultivo de *A. brasilense* Ab-V5 em 5 mL de meio Dygs (RODRIGUES NETO et al., 1986) líquido sob agitação orbital de 180 rpm, a 28 °C por um período de 24 h. Após este período de crescimento, a densidade de células nos cultivos foi determinada por contagem em câmara de Neubauer e ajustadas a uma concentração de 1×10^4 células por mL, sendo esta suspensão inoculada em 900 mL de cada uma das formulações.

As formulações foram incubadas em agitador orbital a 180 rpm e 28 °C, sendo tomadas amostras de 30 mL após 36, 72 e 144 h de crescimento. As amostras foram imediatamente transferidas assepticamente para frascos de vidro âmbar com capacidade total de 100 mL, fechados com tampa plástica de rosca e armazenados sob temperatura ambiente (± 25 °C) ao abrigo da luz, em triplicata.

A viabilidade das células de *A. brasilense* Ab-V5 foi determinada pela contagem do número de UFC pelo método da gota, conforme anteriormente descrito. As contagens de UFC foram realizadas no momento das amostragens (36, 72 e 144 h de cultivo) e após 20 dias de armazenamento nas condições descritas.

4.5 VIABILIDADE DE *A. BRASILENSE* AB-V5 NAS FORMULAÇÕES INOCULANTES: MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA ASSOCIADA AO USO DE CORANTES VITAIS

Em adição à avaliação de viabilidade celular de *A. brasilense* Ab-V5 por contagem do número de UFC, as amostras foram coradas com auxílio do corante vital *BacLight* L-13152 LIVE/DEAD *kit* para visualização de membrana celular intacta (células vivas) e células com membrana danificada (células mortas).

Esse *kit* consiste de um mistura de dois corantes: o marcador verde fluorescente SYTO® 9 (480/500 nm excitação/emissão) e o marcador vermelho fluorescente iodeto de propídeo (490/638 nm excitação/emissão). O corante SYTO 9 penetra todas as bactérias presentes na amostra, estejam com a membrana citoplasmática intacta ou danificada. Em contraste, o iodeto de propídeo penetra apenas bactérias com a membrana danificada, causando uma redução de SYTO 9 quando ambos os corantes estão presentes. Dessa forma, utilizando uma mistura adequada destes dois corantes, bactérias com membrana citoplasmática intacta (ou as células viáveis) coram verde fluorescente, enquanto que as bactérias com membranas danificadas (ou células inviáveis) coram em vermelho fluorescente.

As avaliações microscópicas de viabilidade celular foram realizadas no momento da coleta das amostras (36, 72 e 144 h de cultivo) e após 20 dias de armazenamento nas condições descritas. Com esta finalidade, os corantes SYTO 9 e Iodeto de propídeo foram misturados para uma concentração final de 6 μ M (SYTO 9) e 30 mM (Iodeto de propídeo), em H₂O deionizada esterilizada. Após a preparação da mistura do corante, esta foi armazenada a -20 °C até a sua utilização. Para a etapa de coloração, 60 μ L da suspensão de células previamente lavadas com solução salina (NaCl 0,85 %), foram misturadas com 60 μ L da mistura dos corantes e incubadas no escuro durante 15 min em temperatura ambiente. Em seguida, uma alíquota de 5 μ L foi aplicada em lâmina para microscopia, recobertas com lamínulas e examinadas com objetiva de imersão em óleo EC-Plan-Neofluar 100x em microscópio de epifluorescência Zeiss AxioVision. As imagens foram digitalizadas pelo programa axion vision Rel. 4.8.2, em triplicata, e foi calculada a porcentagem de células vivas e mortas.

4.6 ESCALONAMENTO DA PRODUÇÃO DE INOCULANTE CONTENDO *A. BRASILENSE* AB-V5: ESCALA SEMI-PILOTO

O experimento foi realizado em fermentador de 5 L, com volume de trabalho de 4 L, que permite o controle da frequência de agitação, aeração, temperatura e pH.

O meio de fermentação utilizado foi a FORM15 usada como referência durante o desenvolvimento do trabalho. Inicialmente, o biorreator foi preenchido com 4 L de meio de cultivo (FORM15), o pH foi ajustado para 6,8,

seguindo a esterilização em autoclave por 40 min a 121°C. Após o resfriamento do meio de cultivo a temperatura ambiente, foi feita a inoculação de *A. brasilense* Ab-V5 a partir de um pré-inóculo crescido em meio líquido Dygs como descrito anteriormente (Item 4.4). A inoculação foi realizada com auxílio de uma das bombas peristálticas do fermentador, buscando-se uma concentração inicial de 1×10^4 células por mL de cultura.

As condições de cultivo durante a fermentação foram as seguintes: velocidade de agitação 180 rpm; a taxa de aeração foi mantida a 0,1 vvm; temperatura $28^\circ\text{C} \pm 0,2^\circ\text{C}$; e o pH foi mantido automaticamente a $6,8 \pm 0,2$ utilizando uma solução de HCl 4M (KEFALOGIANNI; AGGELIS, 2002).

O microrganismo foi cultivado durante 4 dias, e as avaliações foram realizadas diariamente em intervalos de tempo definidos (18, 24, 42, 48, 66, 72, 90 e 96 h após a inoculação).

As avaliações compreenderam a determinação do número de UFC, e a viabilidade celular utilizando corantes vitais em microscopia de epifluorescência realizadas conforme anteriormente descrito (item 4.4 e 4.5).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância com aplicação do teste F, seguida do teste de Tukey para comparação de médias ($p \leq 0,05$) empregando-se o programa SASM-Agri (CANTERI et al., 2001).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO PARA VEICULAÇÃO DE *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* AB-V5

5.1.1 Ensaio 1. Seleção de Meios de Cultura para a Produção de Biomassa Celular de *A. brasilense* Ab-V5

Para a seleção dos meios de cultura as avaliações foram realizadas somente após 72 h de cultivo. Esta decisão foi baseada nos resultados prévios de Marcelino (2012), que demonstrou um prolongamento da fase estacionária das culturas de *A. brasilense* Ab-V5 crescidas no meio FORM15. Além disso, a manutenção de elevadas populações de *A. brasilense* Ab-V5 em fases tardias de cultivo foi considerada um parâmetro para a seleção de novas formulações com capacidade de prolongar o tempo de prateleira de produtos inoculantes.

5.1.1.1 Contagem de unidades formadoras de colônia

A Tabela 3 apresenta os valores de UFC para as cinco formulações testadas, após 72, 96 e 120 h de cultivo em frascos erlenmeyers. Os valores de contagens de UFC obtidas foram convertidos em escala logarítmica.

Tabela 3 Número de células de *A. brasilense* Ab-V5 em diferentes meios de cultivo e tempos de crescimento, determinadas pelo número de unidades formadoras de colônia pelo método da gota (drop plate).

FORMULAÇÕES	TEMPO DE CULTIVO (h)		
	72	96	120
	Log UFC.mL ⁻¹		
MCA1	< 6,00*	< 6,00*	< 6,00*
MCA2	8,00 ± 0,1 Bb	8,30 ± 0,1 Ba	7,05 ± 0,1 Bc
MCA3	< 6,00*	< 6,00*	< 6,00*
MCA4	9,18 ± 0,3 Aa	8,79 ± 0,1 Aa	8,12 ± 0,1 Ab
FORM 15	7,96 ± 0,1 Ba	7,99 ± 0,1 Ca	7,85 ± 0,6 Aa

*Desvio padrão não determinado devido à ausência na contagem de UFC nas diluições plaqueadas (10^6 a 10^8). Letras maiúsculas comparam as médias entre as formulações dentro de cada tempo de cultivo (coluna), e minúsculas, comparam as médias de cada formulação entre os tempos de cultivo (linha) pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Observa-se que na fase estacionária, somente os meios de cultura MCA2, MCA4 e FORM15 apresentaram populações bacterianas acima de 10^6 células por mL. Além disso, houve diferença estatística significativa nas populações de *A. brasilense* Ab-V5 entre as diferentes formulações, e entre os diferentes tempos de crescimento. As populações de *A. brasilense* observadas no cultivo do meio MCA4 apresentaram as maiores contagens, independentemente do tempo de cultivo, alcançando um máximo de $1,7 \times 10^9$ UFC.mL⁻¹ após 72 h de cultivo, sendo 17 e 18 vezes maior do que as populações encontradas nos meios MCA2 ($1,0 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹) e FORM15 ($9,4 \times 10^7$ UFC.mL⁻¹). Além do mais, houve uma tendência de diminuição das populações de *A. brasilense* quando os cultivos foram mantidos por mais de 96 h, independentemente da formulação.

Poucos estudos relacionados com a cinética de crescimento de *A. brasilense* estão disponíveis para períodos acima de 30 h de cultivo, uma vez que culturas bacterianas após a fase exponencial tardia tendem a entrar em uma fase senescente (ou de decaimento populacional) pelo esgotamento dos nutrientes no meio de cultivo (MONOD, 1949; BREN et al., 2013). Prinsen et al. (1993) e Spaepen et al. (2007) apresentam estudos de cinética de *Azospirillum* em cultivos de até 100 h e 72 h, respectivamente, entretanto a densidade de células foi monitorada por

leitura da absorbância (600 nm) em ambos estudos, sem referência ao número de células viáveis nestes cultivos. No presente estudo, apresentamos três meios de cultura nos quais a fase de decaimento populacional ocorreu de maneira bastante tênue, possibilitando o aproveitamento do estágio fisiológico alcançado pelas células em cultivos prolongados para que estas desenvolvam características diferenciadas (SCOTT; HWA, 2011). Em adição, a ocorrência de uma fase de decaimento populacional lenta está relacionada com a presença de extrato de levedura em elevada concentração (5%, p/v), e a relação C/N não deve ser superior a 12, enquanto relações C/N menores do que 10 (MCA2 e FORM15; Tabela 2) tendem a suportar menores concentrações de células em cultivos prolongados (Tabela 3). Ainda, é possível perceber que a adição de novos componentes à formulação original não acarretou diminuição da capacidade de manutenção de elevadas populações de *A. brasilense* Ab-V5, e que o aumento da concentração de carbono em MCA4, como resultado do aumento da concentração de glicerol na formulação, proporcionou maiores contagens de UFC em períodos tardios de cultivo.

Cabe destacar que o uso de sacarose para o cultivo de *A. brasilense* é descrito como inadequado (HARTMANN; BALDANI, 2006), resultando em baixas taxas de crescimento e densidade de cultivo. Por outro lado, Yudy et al. (2013) estudaram o crescimento de *A. brasilense* na presença de elevadas concentrações de NaCl (até 1,2%, p/v) em meio de cultivo suplementado com 40 g L⁻¹ de sacarose, registrando o consumo deste açúcar pelo microrganismo sem que ocorressem incrementos na concentração de açúcares redutores no meio de cultura. As formulações aqui apresentadas possuem 5% de sacarose em sua composição devido a estudos prévios realizado por Marcelino (2012) que encontrou relação positiva entre a concentração de sacarose e a biomassa celular de *A. brasilense*, e um consumo de 13 a 40% da sacarose adicionada ao meio de cultura após 36 h de cultivo. A existência de enzimas hidrolíticas em *A. brasilense* com capacidade de catalisar a quebra da sacarose ainda está para ser determinada.

Tarrand (1978 apud SILVA, 2006) utilizando glicerol no meio de cultura como fonte de carbono, observou respostas positivas no crescimento do gênero *Azospirillum*. Bashan; Trejo e de-Bashan (2011) substituíram a glicose por glicerol em meio triptona - extrato de levedura - glicose (TYG), e observaram um aumento no crescimento de *Azospirillum* (~ 4,5 x 10⁹ UFC.mL⁻¹) e redução no tempo de geração. Trabalhos realizados com outros microrganismos como *Rhizobium* e

Pseudomonas fluorescens também demonstraram que a adição de glicerol ao meio de cultivo pode influenciar positivamente o crescimento da bactéria, e favorecer a manutenção de elevadas populações durante o período de armazenamento dos inoculantes (ALBAREDA et al., 2008; MANIKANDAN et al., 2010).

Diversos tipos de polímeros e materiais orgânicos têm sido empregados como aditivos aos meios de cultivo de células bacterianas para o desenvolvimento de inoculantes (ALBAREDA et al., 2008; JÚNIOR et al., 2012, 2009). Tittabutr et al. (2007) avaliaram o efeito de seis diferentes aditivos poliméricos no crescimento de várias estirpes de *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*, e observaram que dentre os polímeros estudados, a adição de PVP, amido de mandioca e goma arábica resultaram em maior crescimento celular para todas as estirpes avaliadas ($\sim 1 \times 10^9$ células.mL⁻¹) comparado com o meio YEM sem adição dos polímeros (1×10^8 células.mL⁻¹). Neste mesmo trabalho, foi constatado que os diferentes aditivos conferiram maior proteção para as células rizobianas aplicadas sobre as sementes contra temperaturas elevadas.

Desse modo, no presente trabalho, foi possível identificar dentre as formulações testadas, algumas com capacidade de desenvolver e manter números populacionais elevados de *A. brasilense* Ab-V5 (até $1,7 \times 10^9$ UFC.mL⁻¹ em cultivos de 72 h) utilizando fontes de carbono alternativas à utilizada no meio específico para esse gênero. Trabalhos encontrados na literatura reforçam que os componentes presentes no meio de cultura para o crescimento de *Azospirillum* podem influenciar na qualidade dos inoculantes (BAHAT-SAMET; CASTRO-SOWINSKI; OKON, 2004; SERRATO et al., 2006; SANTOS, 2010; GAURI; MANDAL; PATI, 2012), e devido a isso foi realizada a determinação da concentração de exopolissacarídeos em adição aos resultados de concentração de células.

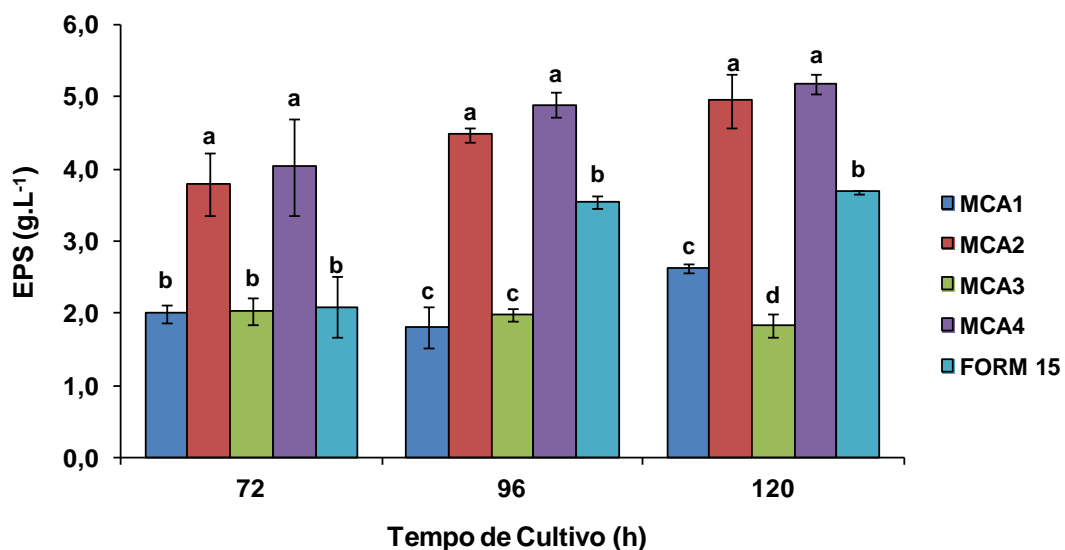
5.1.1.2 Produção de exopolissacarídeos

As BPCVs podem produzir exopolissacarídeos durante o seu crescimento, e a produção desses biopolímeros, em conjunto com a formação de agregados, pode exercer um importante papel na proteção das células microbianas contra a dessecação, facilitando a sobrevivência destas em condições desfavoráveis. A presença de EPS em formulações de inoculante também auxilia na

adesão às sementes durante o processo de inoculação de BPCVs (KEFALOGIANNI; AGGELIS, 2002; BAHAT-SAMET; CASTRO-SOWINSKI; OKON, 2004).

A concentração total de EPS obtida pelo cultivo de *A. brasilense* Ab-V5 nas diferentes formulações testadas, e diferentes tempos de cultivo estão apresentadas na Figura 3.

Figura 3 Produção de Exopolissacarídeos por *A. brasilense* Ab-V5 cultivado em diferentes formulações de meio de cultura.



As letras comparam as médias entre as formulações dentro de cada tempo de cultivo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Todas as formulações induziram a produção de exopolissacarídeo, embora a quantidade observada entre as diferentes formulações e tempos de cultivo tenha apresentado grande variação (1,81 a 5,18 g EPS L⁻¹). Estes resultados estão de acordo com o trabalho realizado por Kefalogianni e Aggelis (2002) que encontraram uma produção de 1,44 a 4,44 g.L⁻¹ de EPS por estirpes de *Azospirillum brasilense* e *Azospirillum lipoferum*.

A quantidade e a qualidade do EPS produzido por *A. brasilense* são influenciadas pelas condições de cultivo (BURDMAN et al., 2000; KEFALOGIANNI; AGGELIS, 2002; BAHAT-SAMET; CASTRO-SOWINSKI; OKON, 2004; LERNER et al., 2010). Diversos estudos têm apontado uma correlação positiva entre a qualidade

e a quantidade de EPS produzido com os parâmetros de cultivo: aeração, relação C/N, temperatura, salinidade, e qualidade da fonte de carbono utilizada para cultivo, apresentando influência na síntese do polímero (KONNOVA et al., 2003; SERRATO et al., 2006; SANTOS, 2010).

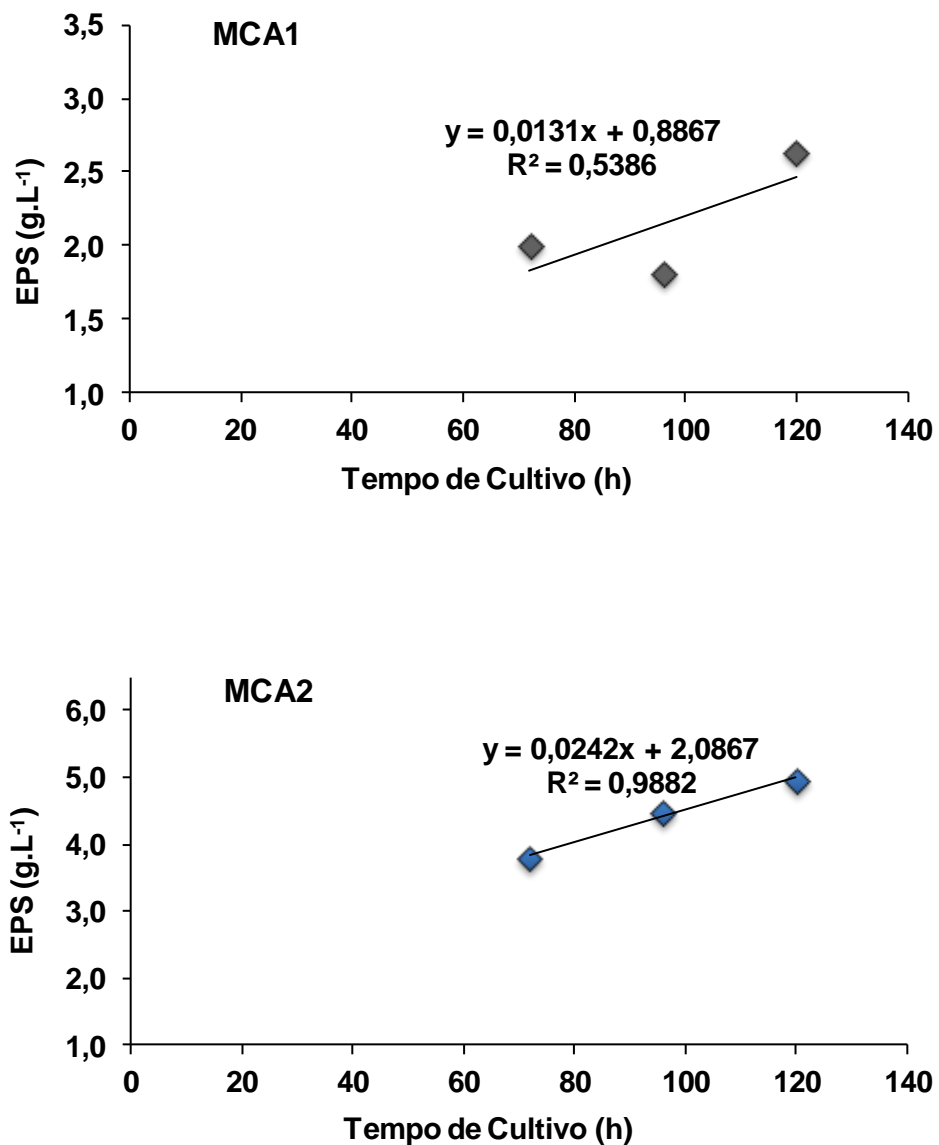
Considerando os meios de cultura avaliados neste trabalho, as diferenças observadas na concentração de EPS estão principalmente relacionadas com as diferenças na relação C/N, que por sua vez refletem as diferentes composições das formulações. A produção de EPS por *A. brasilense* é favorecida sob condições de elevada relação C/N (BURDMAN et al., 1998, 1999, 2000; LERNER et al., 2010). No entanto, Serrato et al. (2006), avaliando as condições de cultivo para a produção de EPS pela bactéria fixadora de nitrogênio *Burkholderia tropica*, observou que a relação C/N do meio de cultivo não influenciou a quantidade de EPS produzida pela bactéria. Em vez disso, a temperatura de crescimento e aeração foram fatores-chave na biossíntese de EPS. Em nosso trabalho não identificamos uma grande concentração de EPS na formulação com a maior relação C/N (31,1 – 33,4; MCA3), na qual foi possível perceber uma pequena queda da concentração de biopolímeros nesta formulação em resposta ao aumento do tempo de cultivo. Controversamente, os meios de cultura com a menor relação C/N (7,7; MCA2 e 12,1; MCA4) apresentaram os maiores valores de EPS em todos os tempos de cultivo avaliados, com máximo de produção de 4,95 g EPS L⁻¹ (MCA2) e 5,18 g EPS L⁻¹ (MCA4).

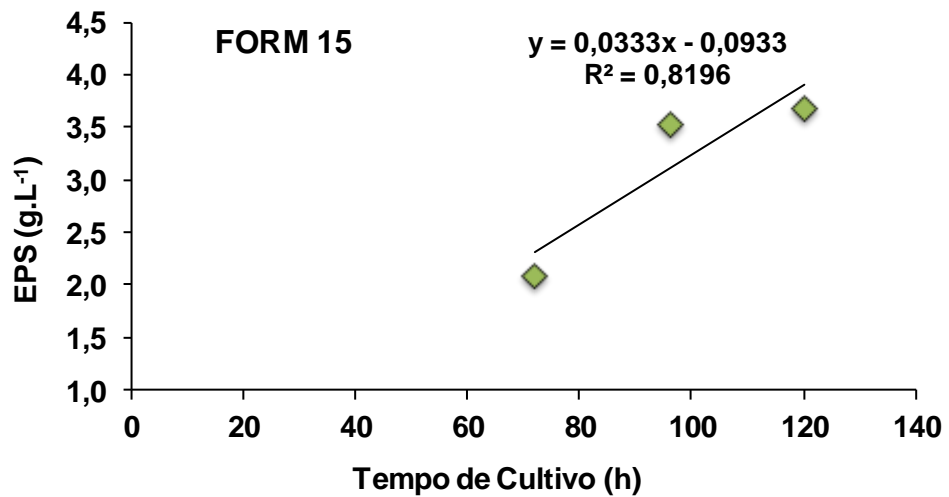
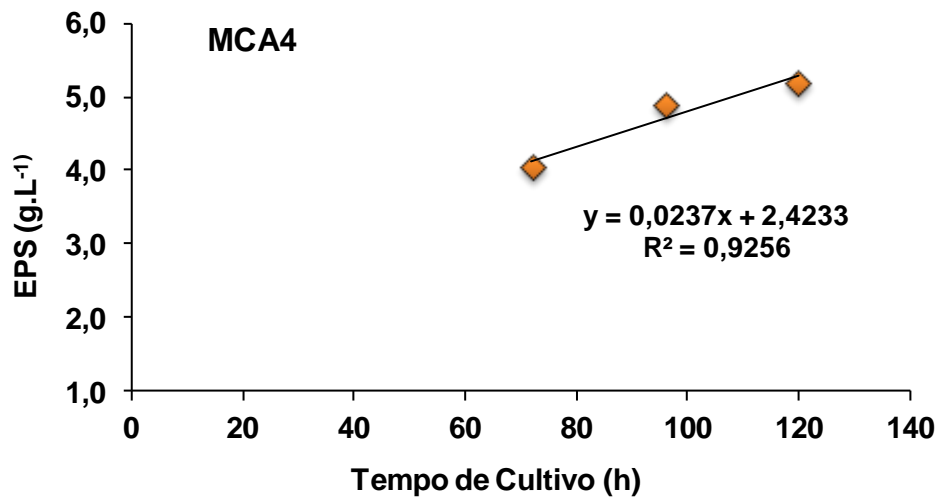
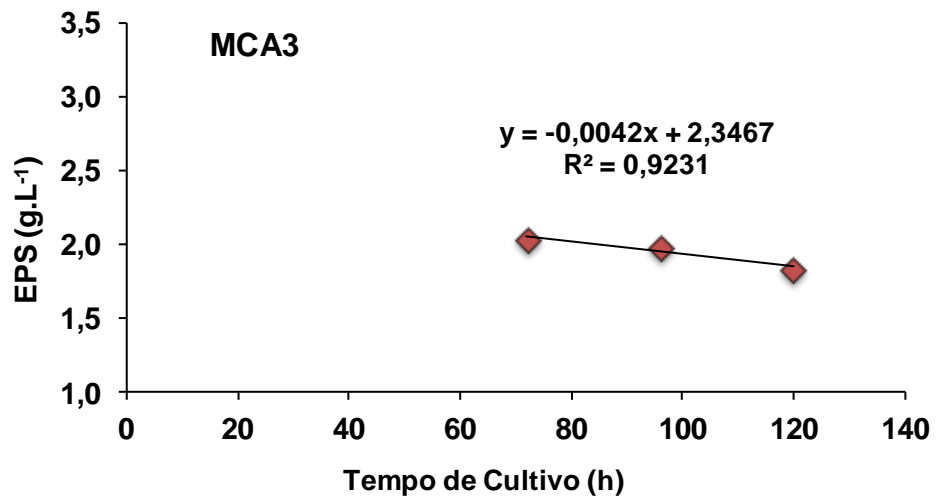
A diminuição da concentração de EPS em cultivos de *Azospirillum* também foi observada por Tsagou e Aggelis (2006), que estudaram o comportamento de *A. lipoferum* na fase estacionária de crescimento e identificaram uma diminuição na concentração de EPS e de CPS em cultivos mantidos sob elevadas razões de diluição. Cabe lembrar que a razão de diluição, ou taxa de diluição em cultivos realizados em fermentadores corresponde ao fluxo volumétrico de nutrientes adicionado dividido pelo volume total do cultivo.

As formulações MCA1, MCA2, MCA4 e FORM15 apresentaram regressão linear positiva entre produção de EPS e o tempo de cultivo, sendo que o valor de r² encontrado para MCA1 mostrou baixo ajuste devido a uma pequena queda na produção em 96 h de cultivo, e posterior aumento em 120 h (Figura 4). Já a formulação MCA3 apresentou uma regressão linear negativa, visto que o aumento no tempo de cultivo propiciou uma diminuição na produção de EPS (Figura 4).

Burdman et al. (2000) demonstraram que *Azospirillum brasilense* é capaz de metabolizar o EPS produzido, utilizando-o como fonte de carbono para manutenção da atividade celular. Desse modo, o decréscimo na concentração de EPS na formulação MCA3 sugere que este biopolímero tenha sido reutilizado pela bactéria como fonte de nutriente.

Figura 4 Regressão entre produção de exopolissacarídeo e o tempo de cultivo.





O aumento na produção de EPS de 72 h para 120 h de cultivo foi de 31,5% (MCA1), 30,6% (MCA2), 28,2% (MCA4) e 76,5% (FORM15). De acordo com Sutherland (2001), alguns exopolissacarídeos são sintetizados durante todo o crescimento bacteriano enquanto que outros são produzidos somente durante a fase logarítmica ou na fase estacionária. Kefalogianni e Aggelis (2002), avaliando a produção de EPS por estirpes de *A. lipoferum* e *A. brasilense*, observaram que todas as estirpes produziram quantidades consideráveis de EPS durante a fase inicial de crescimento, enquanto que durante a fase estacionária o EPS produzido foi degradado. No entanto, estudos realizados por Serrato et al. (2006) indicaram que a quantidade de EPS produzida por *Burkholdeira tropica* aumentou até 30 h de cultivo, e se manteve constante até o fim do cultivo (72 h).

Considerando conjuntamente as avaliações de densidade populacional (UFC) e a produção de EPS, foi possível observar que as formulações MCA2 e MCA4 foram as que apresentaram as maiores contagens de *A. brasilense* Ab-V5 bem como a maior produção de exopolissacarídeos quando comparados com as demais formulações. Dessa forma, essas formulações (MCA2 e MCA4) foram selecionadas para a próxima etapa do trabalho.

5.1.1.3 Avaliação do pH das formulações

O pH das formulações foi avaliado antes da inoculação da suspensão bacteriana de *A. brasilense* Ab-V5, e após 72, 96 e 120 h de cultivo (Tabela 4).

Tabela 4 Variação do pH em diferentes meios líquidos de cultura em resposta ao crescimento de *A. brasilense* Ab-V5.

FORMULAÇÕES	pH INICIAL	TEMPO DE CULTIVO (h)					
		72	Δ pH	96	Δ pH	120	Δ pH
MCA1	6,61	5,31	- 1,30	5,36	- 1,25	5,35	- 1,26
MCA2	6,59	5,41	- 1,18	5,56	- 1,03	5,57	- 1,02
MCA3	6,66	5,40	- 1,26	5,43	- 1,23	5,41	- 1,25
MCA4	6,63	5,42	- 1,21	5,56	- 1,07	5,63	- 1,00
FORM 15	6,61	5,25	- 1,36	5,33	- 1,28	5,47	- 1,14

Em 72 h de cultivo houve uma diminuição no pH em todas as formulações testadas. Esta queda no pH pode ser explicada pela formação de ácidos orgânicos, principalmente acético, láctico, glioxálico, málico, 2-oxoglutárico e β -hidroxibutírico decorrentes do metabolismo de *Azospirillum* (GOEBEL; KRIEG, 1984).

No período de 72 a 120 h de cultivo, o pH das formulações apresentou pequenas variações de 5,31-5,35 (MCA1), 5,41-5,57 (MCA2), 5,40-5,41 (MCA3), 5,42- 5,63 (MCA4) e 5,25-5-47 (FORM15). Nota-se que as formulações MCA2, MCA4 e FORM15 apresentaram os maiores valores de pH ao final do cultivo. Estudo realizado por Trujillo-Roldán et al. (2013), revelaram que o aumento do pH durante o armazenamento de uma formulação líquida de inoculante contendo *A. brasilense* pode estar associada com a liberação de material intracelular (lise das células) e/ou a formação de subprodutos devido ao consumo de PHB.

Correlacionado o valor de pH com a contagem de UFC foi possível observar que as formulações que apresentaram os maiores valores de pH foram as que obtiveram as maiores populações de *A. brasilense*. Isso pode ser explicado pelo fato de que *Azospirillum brasilense* apresenta melhor crescimento em pH neutro (em torno de 6,8).

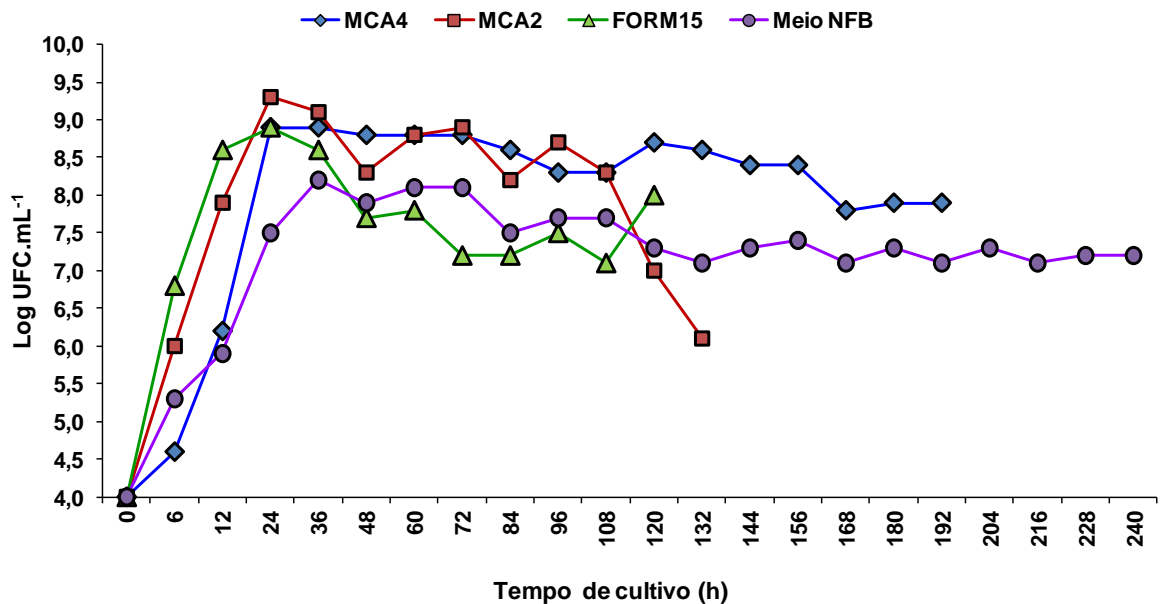
5.1.2 Ensaio 2. Avaliação da Qualidade Fisiológica das Células de *Azospirillum brasilense* Ab-V5 Cultivadas nas Formulações Desenvolvidas

O estudo da qualidade fisiológica das células de *A. brasilense* Ab-V5 é um parâmetro adicional de grande relevância para o desenvolvimento de novas formulações inoculantes. Dessa forma, a partir dos resultados de contagem de células, produção de EPS e avaliação do pH, obtidos no ensaio anterior, foram selecionadas duas formulações (MCA2 e MCA4) para uma caracterização mais detalhada do comportamento de *A. brasilense* Ab-V5 durante o crescimento.

5.1.2.1 Cinética de crescimento de *Azospirillum brasilense* Ab-V5

A Figura 5 apresenta a cinética de crescimento de *A. brasilense* Ab-V5 durante o cultivo no meio NFB e nas diferentes formulações ao longo do tempo. Os valores de contagens de UFC foram convertidos em escala logarítmica.

Figura 5 Cinética de crescimento de *A. brasilense* Ab-V5, em diferentes meios de cultura selecionados para o desenvolvimento de formulações inoculantes.



O estudo da cinética de *Azospirillum brasilense* Ab-V5 permitiu avaliar o comportamento da bactéria durante o cultivo nas formulações desenvolvidas, bem como no meio NFB utilizado como referência.

Quando a bactéria foi cultivada nas formulações MCA2, MCA4 e FORM15, foi observado um maior número de células (2×10^9 em 24 h; 9×10^8 em 36 h; 8×10^8 em 24 h UFC.mL⁻¹, respectivamente), comparado com o meio de referência NFB que alcançou uma densidade máxima de 2×10^8 células mL⁻¹ (36 h), e que foi originalmente desenvolvido para o cultivo de *Azospirillum* (DOBEREINER; DAY, 1976). Esse aumento na densidade de células pode ter ocorrido devido às formulações desenvolvidas consistirem de um meio rico em nutrientes, contendo

altas concentrações de carbono e nitrogênio, diferentemente do meio NFB. Ainda que o número de células encontrado no meio NFB tenha sido mais baixo, observa-se que, após a fase de crescimento exponencial foi possível a manutenção do número de células viáveis (em torno de 4×10^7 UFC.mL⁻¹) até o fim do cultivo em 240 h.

No geral, os valores de contagem obtidos revelaram diferença no comportamento da estirpe Ab-V5 ao longo do tempo, variando conforme a formulação testada. A fase de crescimento exponencial teve início praticamente imediato para todos os meios testados. No entanto, notou-se que esta fase foi mais curta para MCA2; MCA4 e FORM15 (6-24 h de cultivo), em comparação ao crescimento no meio NFB (6-36 h cultivo).

Um fato interessante observado foi que após a fase exponencial, o cultivo da bactéria em MCA4 propiciou a manutenção de células viáveis até 204 h de cultivo. Já o cultivo em MCA2 e FORM15 levou a uma queda no número de células anteriormente a este período. Essa observação pode ser explicada devido à diferença na concentração de glicerol presente nas formulações, visto que a MCA4 possui uma elevada quantidade de glicerol (100 g.L⁻¹) comparada com MCA2 e FORM15 (30 g.L⁻¹). Sendo assim, essa manutenção na densidade de células (MCA4) foi possível em virtude da maior quantidade de fonte de carbono no meio, o que consequentemente retardou a fase de declínio das bactérias no cultivo. Deve-se lembrar também que o glicerol atua na proteção das células contra os efeitos de dessecação, fato de grande importância para manter as células viáveis (BASHAN; TREJO; DE-BASHAN, 2011). A produção de compostos como EPS, demonstrada anteriormente neste trabalho, e PHB, durante a fase de crescimento de *Azospirillum*, também podem ter influenciado na maior longevidade celular.

A descoberta do gênero *Azospirillum* foi possível devido ao desenvolvimento do meio semi-sólido NFB, livre de nitrogênio, que foi baseado em ácidos orgânicos, principalmente malato e succinato, sendo estas as fontes de carbono preferenciais utilizadas por essa bactéria *in situ* (DOBEREINER; DAY 1976). A utilização deste meio para o isolamento e estudos de novas estirpes de *Azospirillum* tem sido empregada até hoje. No entanto, por produzirem populações relativamente baixas, não é adequado para o cultivo em massa na produção de inoculantes em escalas maiores, pois sabe-se que um meio de cultura com alto rendimento é fundamental para produção de inoculantes contendo BPCVs

(BASHAN; TREJO; DE-BASHAN, 2011). Com o intuito de solucionar os problemas relacionados à baixa produção em massa de *Azospirillum* nos inoculantes, alguns meios complexos têm sido desenvolvidos, e, quando comparados com os meios comumente utilizados em laboratório, apresentam um aumento significativo no crescimento celular (BASHAN; TREJO; DE-BASHAN, 2011; FALLIK; OKON, 1996). Essa observação corrobora os resultados de cinética de Ab-V5 encontrados neste trabalho, pois as formulações desenvolvidas apresentaram maior concentração de células viáveis comparada ao meio NFB.

A partir dos resultados de cinética de crescimento de *A. brasilense* Ab-V5 foi possível determinar a taxa de crescimento (μ) e o tempo de geração (g) da bactéria durante o cultivo (Tabela 5).

Tabela 5 Taxa de crescimento (μ) e tempo de geração (g) de *A. brasilense* Ab-V5 durante o cultivo no meio NFB e nas diferentes formulações desenvolvidas.

Tempo de Cultivo	MCA2	MCA4	FORM 15	NFB	MCA2	MCA4	FORM 15	NFB
	μ (h^{-1})				g (h)			
6 Horas	0,76	0,23	1,08	0,51	0,91	3,06	0,64	1,36
12 Horas	0,76	0,42	0,88	0,36	0,91	1,66	0,79	1,94
24 Horas	0,51	0,47	0,47	0,34	1,37	1,48	1,47	2,05
36 Horas	0,33	0,32	0,29	0,27	2,11	2,19	2,36	2,55

A maior taxa de crescimento (μ) de *A. brasilense* Ab-V5 foi observada em 6 h de cultivo para FORM15 ($1,08 h^{-1}$), MCA2 ($0,76 h^{-1}$) e meio NFB ($0,51 h^{-1}$). Já o cultivo de Ab-V5 na formulação MCA4 apresentou a maior taxa de crescimento em 24 h ($0,47 h^{-1}$). Esses resultados estão de acordo com a cinética de crescimento (Figura 5), pois o cultivo da bactéria na formulação MCA4 proporcionou um crescimento mais lento durante a fase log comparado com as demais formulações.

Quanto ao tempo de geração (g), foi possível notar este mesmo comportamento, em que o menor tempo de geração foi encontrado em 6 h de cultivo na FORM15 (0,64 h), MCA2 (0,91 h), e meio NFB (1,36 h), e 24 h em MCA4 (1,48 h).

Os parâmetros cinéticos de *A. brasilense* Ab-V5 encontrados neste trabalho apresentaram resultados superiores comparados com os encontrados na

literatura. Bashan; Trejo e de-Bashan (2011) desenvolveram dois meios de cultura suplementados com gluconato e glicerol, para o cultivo de *Azospirillum spp*, e obtiveram uma taxa de crescimento de 0,4 a 0,5 h⁻¹, e tempo de geração de 1 a 2 h. Westby; Cutshall e Vigil (1983), avaliando o crescimento de *Azospirillum* em meio de cultura contendo glicerol como fonte de carbono observaram um tempo de geração de 11,2 h. Essa variação nos parâmetros cinéticos pode ser atribuída à adição de diferentes fontes de carbono e nitrogênio nos meios de cultura.

5.1.2.2 Avaliação da agregação celular de *A. brasilense* Ab-V5 por microscopia de fluorescência

O fenômeno da agregação bacteriana é de grande interesse na produção, armazenamento e sobrevivência de inoculantes bacterianos para aplicação na agricultura. Isto porque a agregação celular pode aumentar a sobrevivência de células de *Azospirillum* sob diversas condições de estresse. Este fenômeno também pode ser importante durante a colonização da bactéria onde a agregação celular é comumente observada. Bahat-Samet; Castro-Sowinski e Okon (2004) sugerem que a compreensão do processo de agregação celular pode ampliar o conhecimento das interações entre raízes das plantas e as bactérias. Os mesmos autores ainda explicam que a estrutura dos agregados celulares contém canais, em que os nutrientes podem circular, e provavelmente, podem proteger as células da explosão oxidativa produzida durante a morte celular.

A formação de agregados celulares no presente trabalho foi evidenciada durante a cinética de crescimento de *A. brasilense* Ab-V5 por microscopia de fluorescência (Figuras 6, 7 e 8). As observações microscópicas durante o crescimento de *A. brasilense* revelaram a formação de microagregados de células em todas as formulações desenvolvidas. Na formulação MCA2 (Figura 6), a agregação celular foi observada a partir da fase exponencial de crescimento (24 h) até o final do cultivo (240 h). No entanto, quando a estirpe foi cultivada na formulação MCA4 (Figura 7) e FORM15 (Figura 8), os agregados celulares foram evidenciados a partir de 48 h de cultivo (imagens não apresentadas) até o final da avaliação (240 h). O cultivo de *A. brasilense* Ab-V5 na FORM15 demonstrou uma menor agregação das células quando comparado com as formulações MCA2 e MCA4 em que foi possível a visualização mais definida dos microagregados

formados. Sadasivan e Neyra. (1985) relataram que os tipos de células, atividade metabólica e padrões de agregação parecem mudar com a idade da cultura sob condições propícias à floculação.

A produção de EPS por *Azospirillum brasilense* apresenta uma forte correlação com a formação de agregados celulares (BURDMAN et al., 1998, 2000). Diversos trabalhos revelam que os exopolissacarídeos de *A. brasilense* participam na adesão célula-célula durante a agregação, agindo como floculantes não-específicos, ou através da interação com proteínas ou outras moléculas ligadas ao envelope bacteriano (BURDMAN et al., 1998, 2000; SKVORTSOV; IGNATOV, 1998). Tem sido relatado ainda que a presença de arabinose na composição desse biopolímero apresenta alta influência no grau de agregação celular de diferentes estirpes de *A. brasilense* (BAHAT-SAMET; CASTRO-SOWINSKI; OKON, 2004; BURDMAN et al., 1998, 2000).

Através das avaliações de microscopia obtidas neste trabalho, foi possível observar que as células pareciam estar envoltas por um material extracelular. Dessa forma, os exopolissacarídeos produzidos pela estirpe em estudo podem estar envolvidos na agregação celular, corroborando os resultados encontrados na literatura, que demonstram uma correlação entre produção de EPS e agregação celular (BURDMAN et al., 1998, 2000; BAHAT-SAMET; CASTRO-SOWINSKI; OKON, 2004).

Figura 6 Avaliação da agregação celular de *A. brasilense* Ab-V5 por microscopia de fluorescência durante o cultivo na formulação MCA2. (A) células cultivadas por 24 h (B) células cultivadas por 168 h (C) células cultivadas por 216 h.

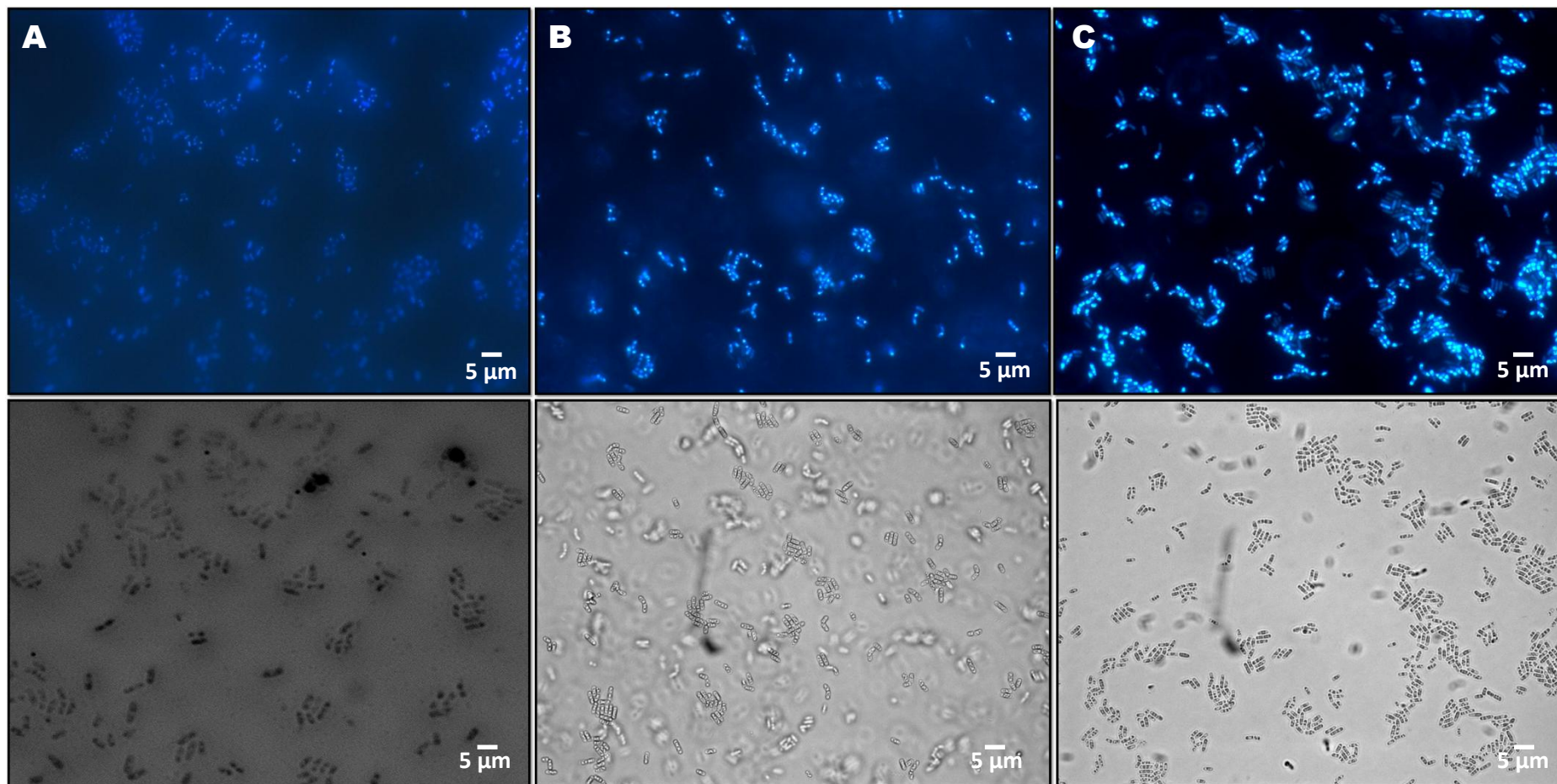


Figura 7 Avaliação da agregação celular de *A. brasilense* Ab-V5 por microscopia de fluorescência durante o cultivo na formulação MCA4. (A) células cultivadas por 24 h (B) células cultivadas por 72 h (C) células cultivadas por 240 h.

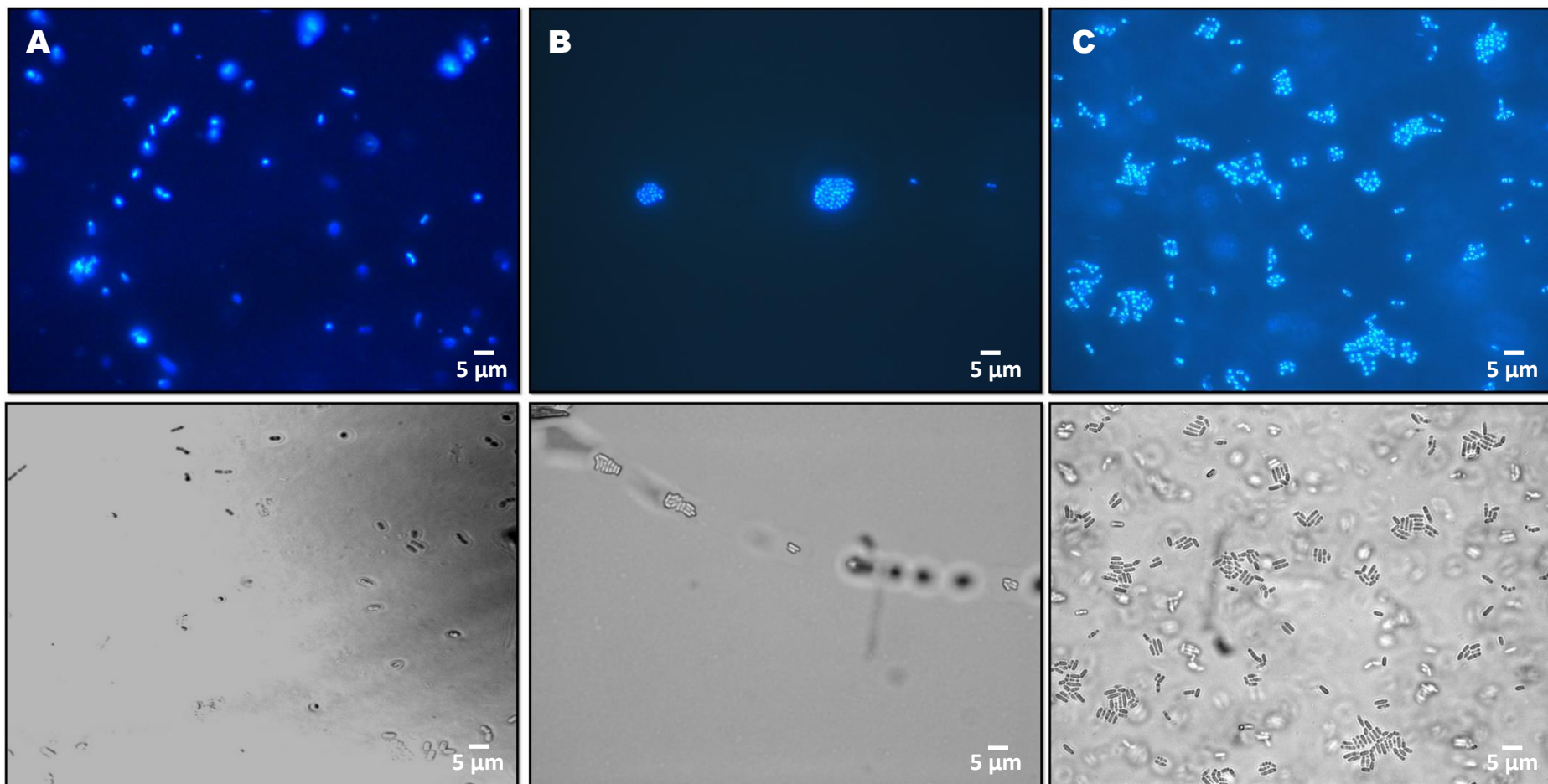
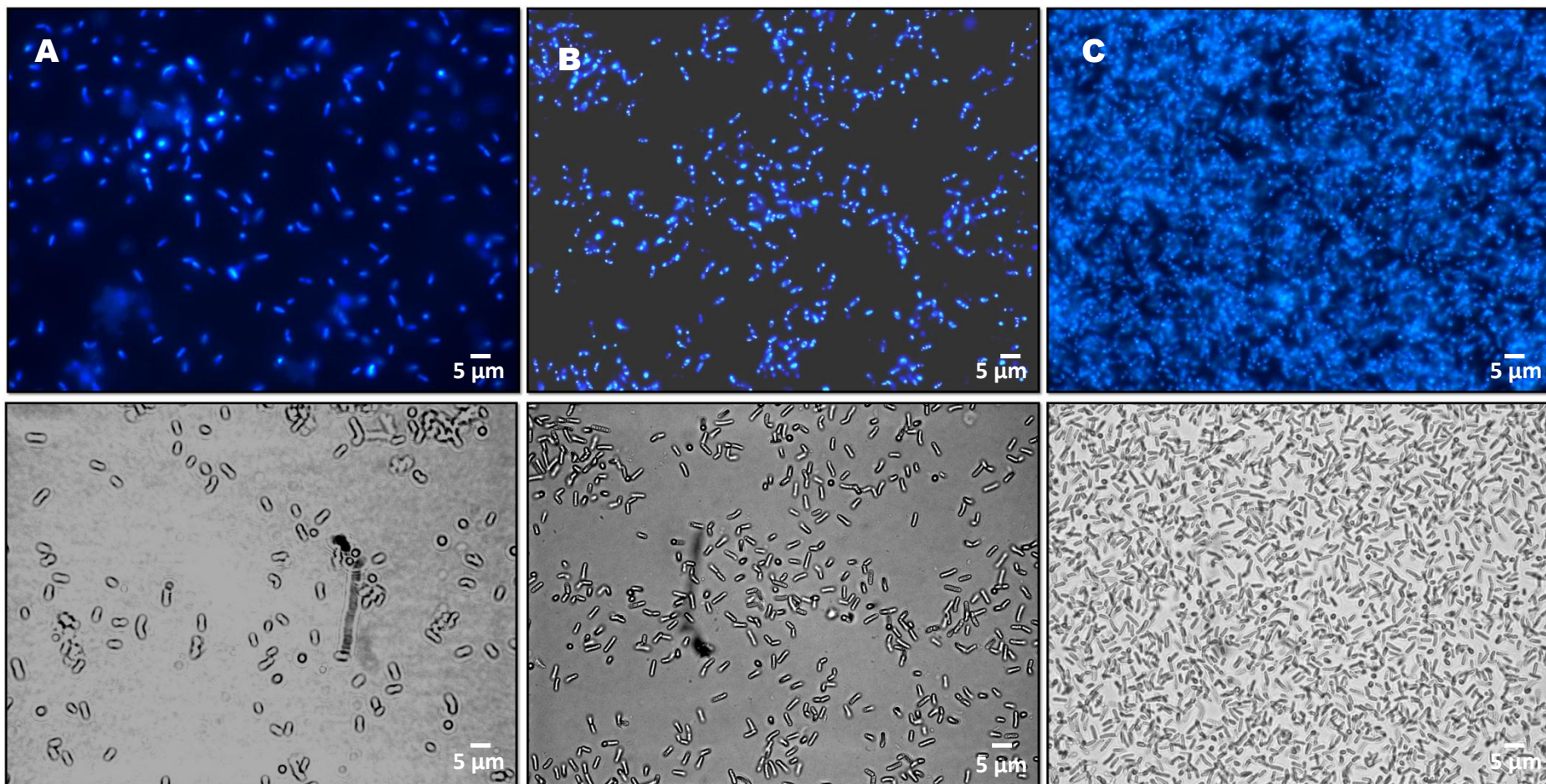


Figura 8 Avaliação da agregação celular de *A. brasilense* Ab-V5 por microscopia de fluorescência durante o cultivo na FORM15. (A) células cultivadas por 24 h (B) células cultivadas por 72 h (C) células cultivadas por 216 h.



5.1.2.3 Produção de biomassa e polihidroxibutirato

Os resultados de produção de biomassa e polihidroxibutirato obtidos durante o cultivo de *A. brasilense* Ab-V5 nas diferentes formulações de meio de cultura estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 Produção de biomassa e polihidroxibutirato por *A. brasilense* Ab-V5 durante o cultivo na formulação MCA2, MCA4 e FORM15.

TEMPO DE CULTIVO (h)	BIOMASSA (g.L ⁻¹)			PHB (g.L ⁻¹)			PRODUÇÃO DE PHB (%)		
	FORM 2	FORM 4	FORM 15	FORM 2	FORM 4	FORM 15	FORM 2	FORM 4	FORM 15
12	0,54 ± 0,1 b	0,41 ± 0,03 d	1,85 ± 0,1 f	0,03 ± 0,01 e	0,01 ± 0,001 f	0,004 ± 0,004 e	5,56	2,44	0,22
36	3,69 ± 0,2 a	2,92 ± 0,1 c	3,41 ± 0,2 e	0,20 ± 0,04 de	0,17 ± 0,03 ef	0,43 ± 0,03 d	5,42	5,82	12,61
60	3,90 ± 0,1 a	3,31 ± 0,2 bc	3,95 ± 0,3 cde	0,30 ± 0,02 d	0,32 ± 0,001 e	0,47 ± 0,13 d	7,69	9,67	11,90
84	4,32 ± 0,3 a	3,64 ± 0,1 ab	4,74 ± 0,6 b	0,65 ± 0,08 c	0,60 ± 0,06 d	0,84 ± 0,05 bc	15,05	16,48	17,72
108	4,37 ± 2,0 a	3,94 ± 0,3 a	5,59 ± 0,3 a	0,61 ± 0,14 c	0,74 ± 0,09 d	1,10 ± 0,09 a	13,96	18,78	19,68
132	4,42 ± 0,3 a	3,87 ± 0,3 ab	4,63 ± 0,2 b	1,00 ± 0,004 b	0,75 ± 0,14 d	0,91 ± 0,03 b	22,62	19,38	19,65
156	4,07 ± 0,2 a	3,62 ± 0,1 ab	4,70 ± 0,3b	0,94 ± 0,05 b	1,20 ± 0,11 b	0,95 ± 0,09 b	23,10	33,15	20,21
180	3,84 ± 0,1 a	3,90 ± 0,1 ab	4,41 ± 0,4 bc	1,00 ± 0,03 b	0,99 ± 0,19 c	0,84 ± 0,06 bc	26,04	25,32	19,05
204	4,52 ± 0,6 a	3,92 ± 0,8 a	3,67 ± 0,3 de	1,25 ± 0,29 a	1,73 ± 0,15 a	0,73 ± 0,11 c	27,65	44,13	19,89
228	4,01 ± 2,7 a	3,57 ± 0,3 ab	4,02 ± 0,06 cd	1,21 ± 0,08 a	1,27 ± 0,18 b	0,73 ± 0,07 c	29,44	35,57	18,16

Letras na coluna comparam as médias de cada formulação entre os tempos de cultivo pelo teste de tukey a 5% de probabilidade.

A produção de PHB pela estirpe *A. brasilense* Ab-V5 apresentou uma elevada variabilidade em função do tempo de cultivo e da formulação testada (Tabela 6). O acúmulo do polímero em g.L^{-1} variou de 0,03 a 1,25 no meio de cultura MCA2, e nas formulações MCA4 e FORM15 a variação foi de 0,01 a 1,73 g.L^{-1} e 0,004 a 1,10 g.L^{-1} , respectivamente. No geral, o percentual de PHB encontrado nas células de *A. brasilense* Ab-V5 foi de 0,22 a 44,13% da biomassa seca.

Estudos avaliando a produção de PHB por *Azospirillum spp* apresentam diferentes valores de produção, dependendo da estirpe utilizada e das condições de cultivo. Fallik e Okon (1996) produziram células de *Azospirillum brasilense* com 40% de PHB, resultado semelhante ao encontrado neste trabalho (44,13%). Vendan e Thangaraju (2007) avaliaram a produção de PHB pela estirpe *Azospirillum lipoferum* (Az-204) e encontraram uma produção de 3,8 mg/g de peso seco da bactéria. JOE et al. (2009) obtiveram uma produção de 0,13 g.L^{-1} do polímero pela estirpe *Azospirillum* MTCC – 125.

A maior produção de PHB no decorrer do cultivo de *A. brasilense* Ab-V5 nas diferentes formulações testadas foi observada na formulação MCA4 (1,73 g.L^{-1} ; 204 h de cultivo), seguida da MCA2 (1,25 g.L^{-1} ; 204 h de cultivo) e FORM15 (1,10 g.L^{-1} ; 108 h de cultivo). A formulação MCA4 propiciou a maior produção de PHB pela bactéria, com aumento de 38% e 57% quando comparado com a produção do polímero nos meios de cultura MCA2 e FORM15, respectivamente.

Observa-se que houve um aumento crescente no acúmulo intracelular do biopolímero nas formulações MCA2 e MCA4 durante os tempos de cultivo avaliados. Neste caso, a produção de PHB foi significativamente maior ao final do cultivo. No entanto, o crescimento de *A. brasilense* Ab-V5 em FORM15 demonstrou um comportamento diferente quanto à produção de PHB no decorrer do tempo. Isto porque o conteúdo do polímero nas células aumentou até 108 h de cultivo quando atingiu sua máxima produção (1,10 g.L^{-1}), e após esse período houve uma queda do mesmo.

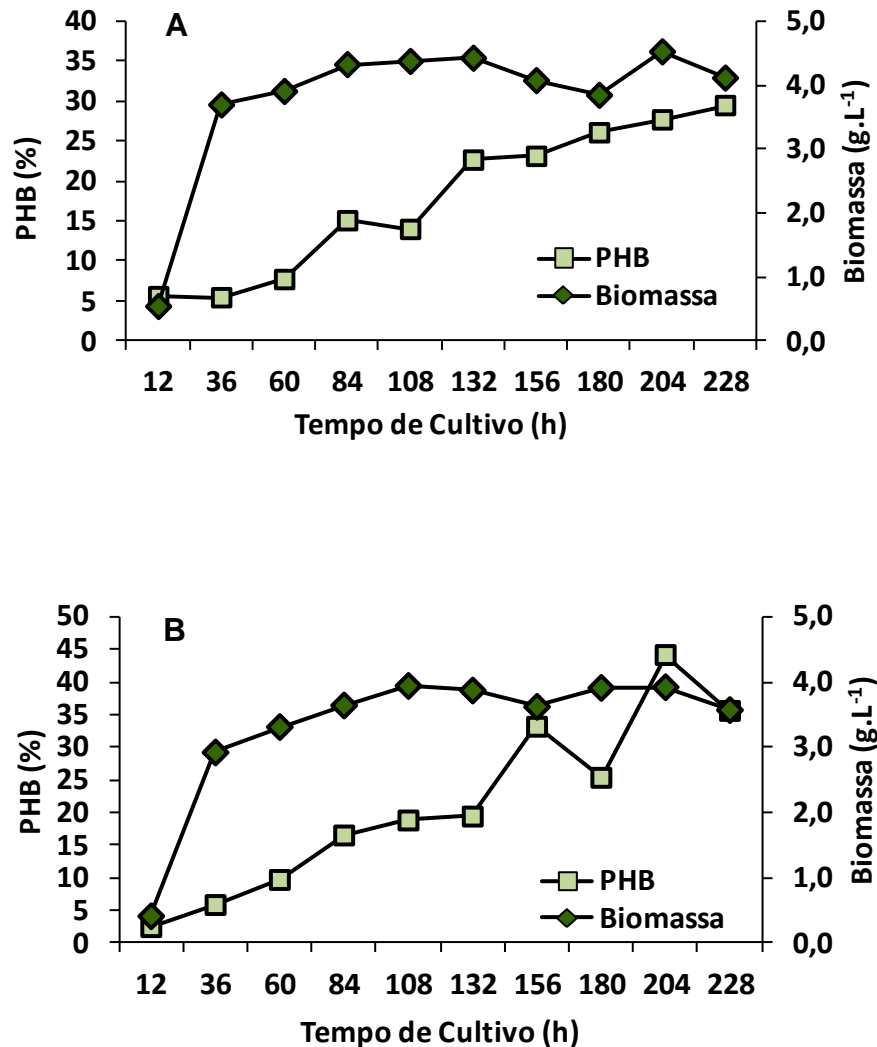
Quanto à produção de biomassa durante o cultivo, a formulação MCA2 não apresentou diferença significativa após 36 h de cultivo até o final da avaliação. No entanto, quando *A. brasilense* Ab-V5 foi crescida na formulação MCA4 e FORM15 o maior valor de biomassa foi observado em 108 h para ambas as formulações.

A produtividade de PHB avaliada em função da biomassa bacteriana demonstrou que a estirpe de *A. brasilense* Ab-V5 foi capaz de acumular um alto conteúdo intracelular do polímero durante o cultivo nos meios de cultura desenvolvidos. O crescimento de *A. brasilense* na formulação MCA4 proporcionou o maior acúmulo de PHB, no qual 44% da biomassa celular foi representada pelo polímero (204 h de cultivo). Já o maior percentual de produtividade de PHB durante o cultivo de *A. brasilense* Ab-V5 na formulação MCA2 e FORM15 foi de 29,44% (228 h de cultivo) e 20,21% (156 h de cultivo).

Sabe-se que a síntese de PHB é favorecida sob limitação de oxigênio e devido à maior relação C/N presente no meio de cultura (TAL; OKON, 1985). Belal (2013) avaliou a produção de PHB por *Rhizobium elti* e *Pseudomonas stutzeri* e verificou que a relação C/N do meio de cultura foi um dos fatores que afetaram a produção do polímero, sendo que a razão C/N 20:1 foi considerada a melhor proporção para obter a máxima produção do mesmo. Dessa forma, o maior percentual de PHB encontrado nas células de *A. brasilense* Ab-V5 crescidas na formulação MCA4, pode ter ocorrido devido a maior relação C/N existente nessa formulação (31,1 – 33,4), quando comparado com a formulação MCA2 (7,66) e FORM15 (8,39), corroborando os estudos encontrados na literatura.

A maior porcentagem intracelular de PHB durante o crescimento de *A. brasilense* Ab-V5 em MCA2 e MCA4 foi observada durante a fase estacionária de crescimento da bactéria (Figura 9).

Figura 9 Acúmulo intracelular de PHB (%) durante o crescimento de *A. brasilense* Ab-V5 em MCA2 (A), e MCA4 (B).

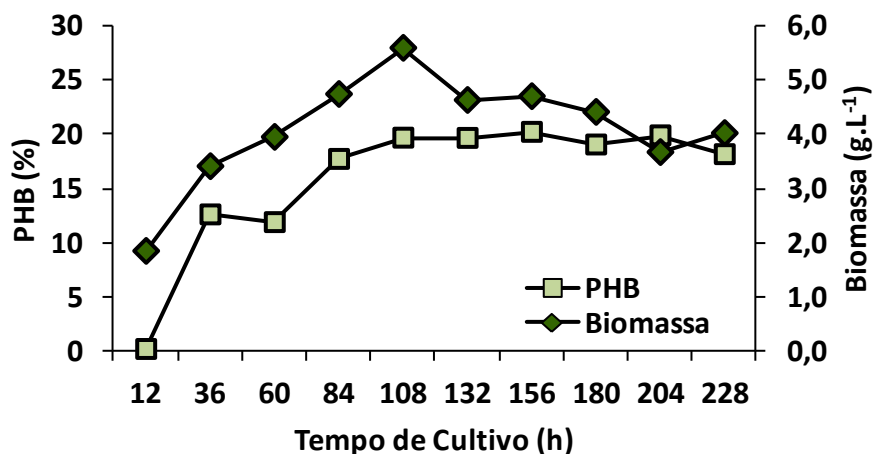


Na formulação MCA2 (Figura 9-A) verificou-se um aumento no acúmulo intracelular do polímero até o final da avaliação, com máximo de produtividade em 228 h de cultivo (29,44%). Já em MCA4 (Figura 9-B) foi observada uma oscilação na síntese de PHB a partir de 156 h. Em 180 h de cultivo ocorreu uma queda na produtividade, sendo que logo após (204 h) a porcentagem do polímero na célula aumentou obtendo o máximo acúmulo (44,13%), e caiu novamente em 228 h (35,57%). Essa variação indica que o PHB presente na biomassa celular pode estar sendo utilizado como fonte de carbono pela bactéria durante a fase estacionária de crescimento, fase em que ocorre o esgotamento de

nutrientes. A degradação de PHB durante condições limitantes de nutrientes já foi demonstrada em diversos trabalhos (TAL; SMIRNOFF; OKON, 1990; OKON; ITZIGSOHN, 1992; MANNA; PAL; PAUL, 1997; CHEN; WU; LEE, 2012). Ratcliff; Kadam e Denison (2008) também observaram uma variação na quantidade de PHB em células de *Sinorhizobium meliloti* durante a utilização do polímero em condições de escassez de nutrientes. Os autores verificaram que a utilização do PHB armazenado pelo microrganismo possibilitou a reprodução e manutenção de células viáveis ao longo do tempo sob condições limitantes de crescimento.

O cultivo da estirpe Ab-V5 em FORM15 indicou que o acúmulo de PHB na célula foi associado ao crescimento da bactéria, pois sua produtividade aumentou quando a cultura apresentou a maior produção de biomassa, e posteriormente, a porcentagem intracelular de PHB foi praticamente mantida até o final do cultivo (Figura 10).

Figura 10 Acúmulo intracelular de PHB (%) durante o crescimento de *A. brasilense* Ab-V5 em FORM15.



O período de acúmulo de polihidroxibutirato na célula durante a cinética de crescimento do microrganismo é dependente da composição do meio de cultura bem como da concentração de nutrientes no meio. Ratcliff, Kadam e Denison (2008) verificaram que células de *Sinorhizobium meliloti* coletadas no final da fase estacionária apresentaram um maior acúmulo de PHB quando comparadas com as

células coletadas na fase de crescimento exponencial. Já Samantaray e Mallick (2011) avaliando a produção e caracterização de PHB sintetizado por *Aulosira fertilíssima*, encontraram que a maior produção do polímero ocorreu na fase exponencial de crescimento da bactéria, apresentando um declínio na fase estacionária.

Pode-se observar que o cultivo de *A. brasilense* Ab-V5 em FORM15 apresentou um alto acúmulo de PHB já no início do cultivo (Figura 10), o que não foi observado para MCA2 (Figura 9-A) e MCA4 (Figura 9-B). Em 36 h de cultivo em MCA2 e MCA4, a bactéria apresentava 5% de PHB intracelular, já na FORM15 a produtividade encontrada nesse mesmo tempo foi de 12%.

Diversos trabalhos já comprovaram que células ricas em PHB resistem mais a condições de estresse. Kadouri, Jurkevitch e Okon (2003) observaram que células de *Azospirillum brasilense* contendo PHB apresentaram maior resistência a alta temperatura, exposição a peróxido de hidrogênio, exposição a radiação ultravioleta (UV), dessecação, e estresse osmótico. Okon e Itzigsohn (1992) revelaram que sob condições limitantes de nutrientes, a taxa de sobrevivência e a respiração de *Azospirillum brasilense* foram maiores em células que possuíam uma produtividade de aproximadamente 40% de PHB, comparadas com as que apresentavam 5%. Sadasivan e Neyra (1987) também verificaram que células com alto conteúdo de PHB conferiram maior resistência à dessecação, comparadas com células que não sintetizaram o polímero.

Durante o armazenamento dos inoculantes, as condições de estresse geradas como: falta de umidade, alta temperatura, limitada fonte de carbono disponível, podem levar as bactérias presentes no produto à morte. No entanto, Kadouri, Jurkevitch e Okon (2003), avaliando inoculantes armazenados em condições sub-ótimas, observaram uma queda na sobrevivência da estirpe *Azospirillum basilense* phbC (deficiente na produção de PHB) comparada com a estirpe Sp7 (produtora de PHB). Os autores então concluíram que a produção desse polímero é criticamente importante para melhorar o tempo de prateleira, eficiência e confiabilidade de inoculantes comerciais.

Dessa forma, a produção de polihidroxibutirato por *Azospirillum brasilense* Ab-V5 pode aumentar sua sobrevivência em formulações inoculantes, bem como em condições de campo.

5.1.2.4 Avaliação da presença de grânulos de polihidroxibutirato em cultivos de *A. brasilense* Ab-V5 por microscopia de fluorescência

Juntamente com a avaliação da produção de PHB por *Azospirillum brasilense* Ab-V5, foi investigada a formação dos grânulos do polímero por microscopia de fluorescência (Figuras 11, 12 e 13).

Após 12 h de cultivo, algumas células apresentavam pequenos grânulos de PHB, em média dois ou três, em todas as formulações testadas (Figuras 11-A, 12-A e 13-A). Em determinadas células esses grânulos exibiam uma fraca fluorescência sendo detectada apenas durante a observação direta no microscópio, não sendo possível a visualização nas imagens captadas pelo equipamento. Já outras células ainda estavam isentas de quaisquer grânulos.

Observa-se que os grânulos de PHB formados inicialmente (12 h de cultivo) estavam localizados aleatoriamente no citoplasma, com a maioria no polo das células e alguns no centro. Hermawan e Jendrossek (2007) e Jendrossek (2005) avaliando a formação de grânulos de PHB em *Azotobacter vinelandii*, *Rhodospirillum rubrum*, *Ralstonia eutropha* e *Escherichia coli* observaram que a distribuição dos grânulos na fase inicial de formação foi verificada próximo ao polo das células em todas as bactérias.

A partir de 36 h de cultivo, verificou-se que os grânulos intracelulares do biopolímero se apresentavam com uma maior intensidade de fluorescência e esses aumentavam em número em todas as formulações testadas, sendo possível a visualização em todas as células (imagens não apresentadas). Em 60 h de cultivo ainda era possível visualizar os grânulos de PHB individualmente nas células (Figuras 11-B, 12-B e 13-B). No entanto, após 84 h até o final do cultivo, as células estavam inteiramente preenchidas do polímero (Figuras 11C-D, 12 C-D e 13 C-D).

Estudos realizados anteriormente demonstraram a formação grânulos de PHB em células de *Azospirillum brasilense* por análises microscópicas (BURDMAN et al., 1998; SADASIVAN; NEYRA, 1985, 1987), corroborando as imagens de microscopia encontradas neste trabalho. Esses autores reportaram que o acúmulo de PHB, juntamente com a formação de uma camada espessa de EPS, foi observado durante a floculação e encistamento de *Azospirillum brasilense*.

A observação dos grânulos de PHB em células de *A. brasilense* Ab-V5 durante a avaliação microscópica confirmam os resultados de produção do polímero demonstrados anteriormente (Tabela 6).

Figura 11 Formação de grânulos intracelulares de PHB avaliada por microscopia de fluorescência durante o cultivo de *A. brasilense* Ab-V5 na formulação MCA2. As células foram coradas com Nile red. (A) células cultivadas por 12 h (B) células cultivadas por 60 h (C) células cultivadas por 132 h (D) células cultivadas por 180 h.

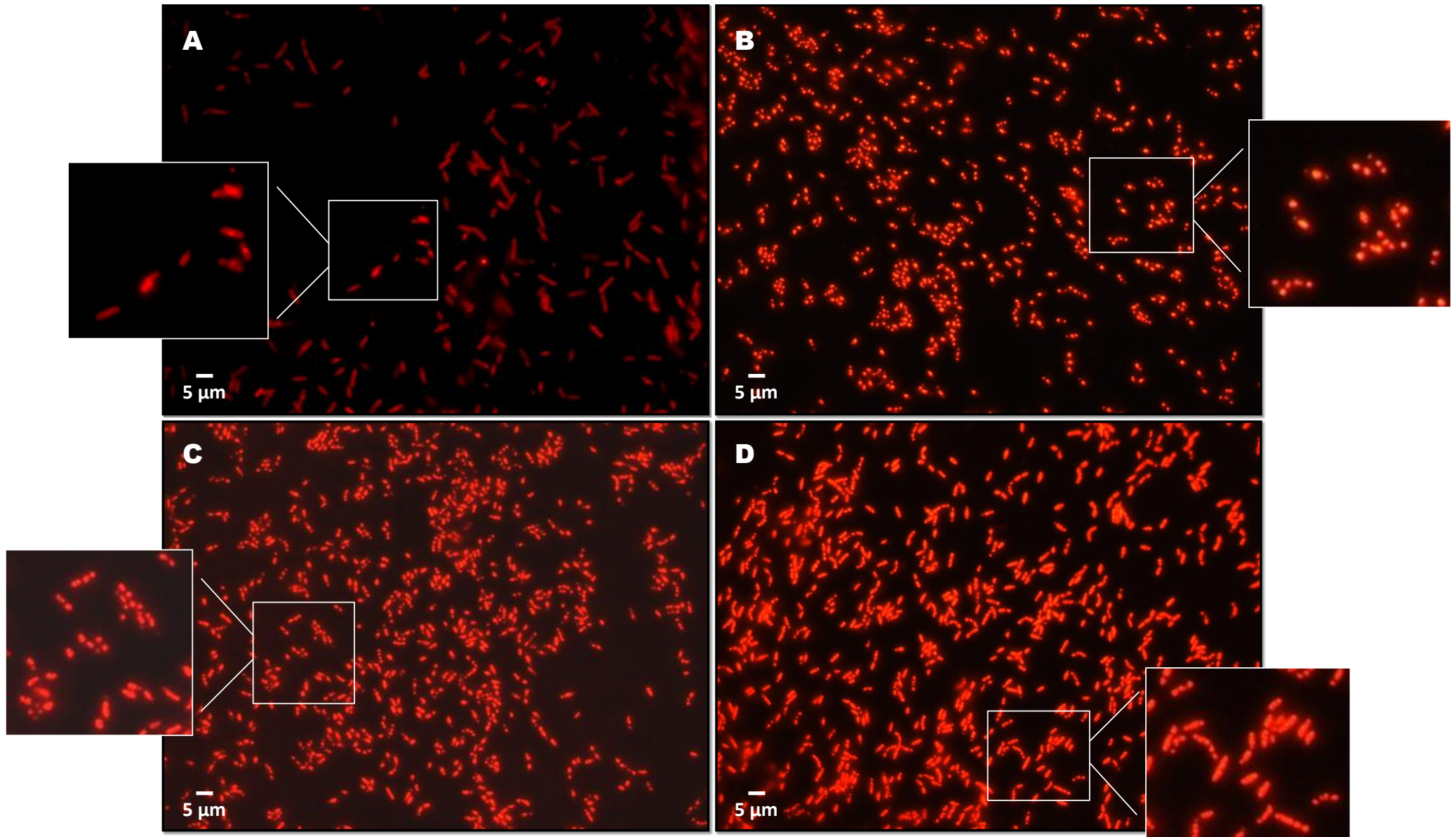


Figura 12 Formação de grânulos intracelulares de PHB avaliada por microscopia de fluorescência durante o cultivo de *A. brasilense* Ab-V5 na formulação MCA4. As células foram coradas com Nile red. (A) células cultivadas por 12 h (B) células cultivadas por 60 h (C) células cultivadas por 132 h (D) células cultivadas por 18 h.

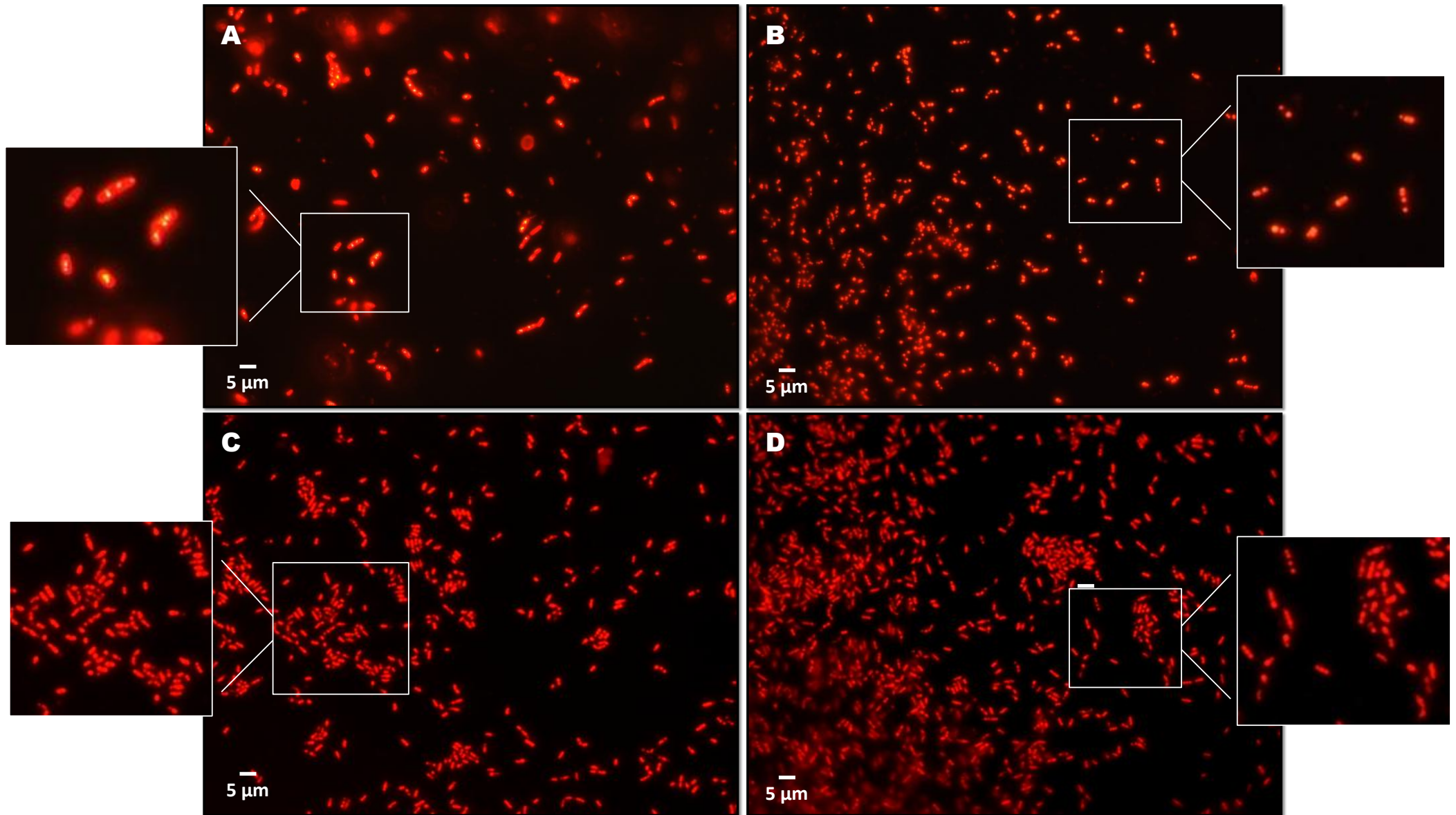
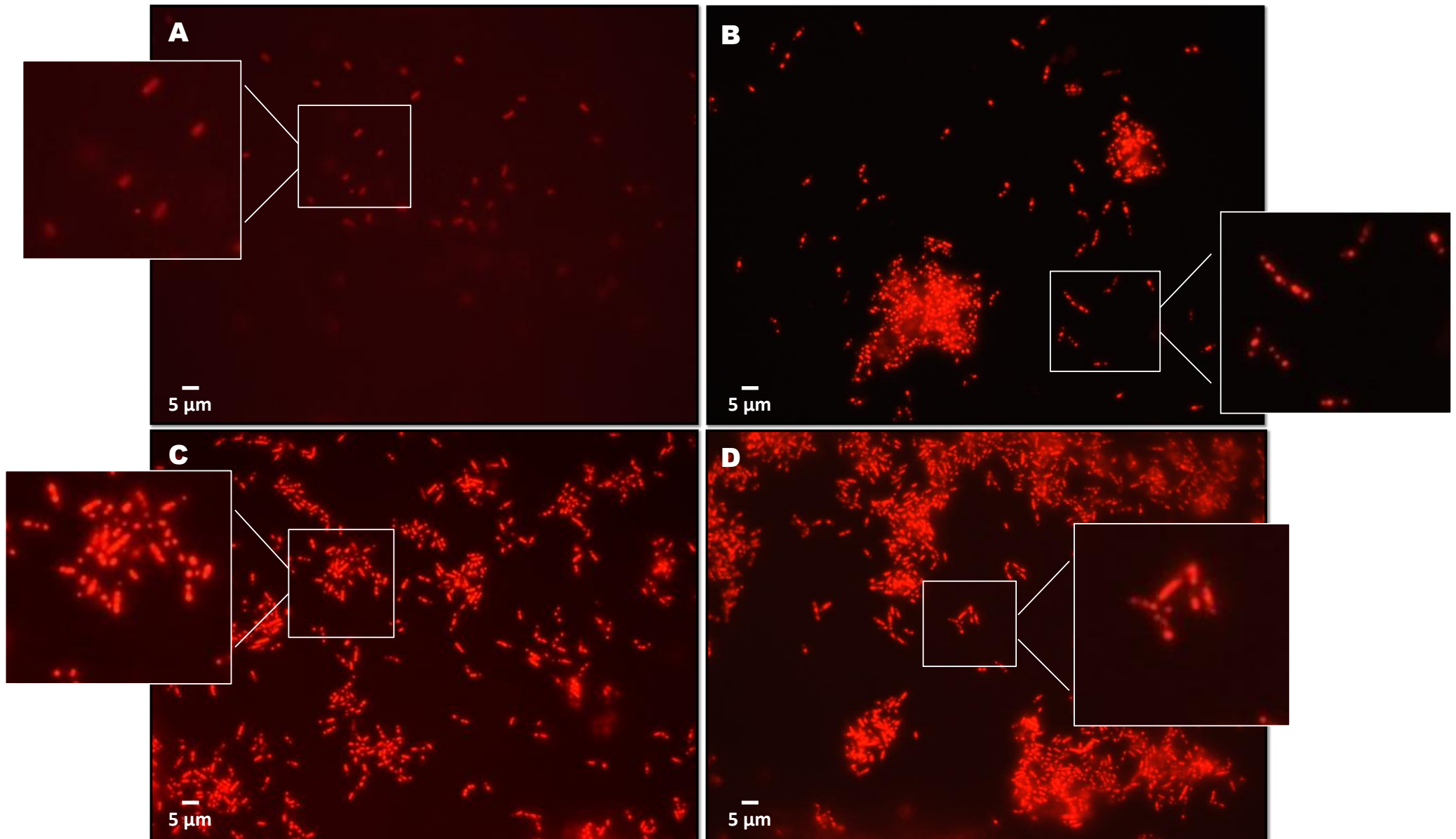


Figura 13 Formação de grânulos intracelulares de PHB avaliada por microscopia de fluorescência durante o cultivo de *A. brasilense* Ab-V5 na FORM15. As células foram coradas com Nile red. (A) células cultivadas por 12 h (B) células cultivadas por 60 h (C) células cultivadas por 132 h (D) células cultivadas por 180 h.



5.2 VIABILIDADE DE *A. BRASILENSE* AB-V5 NAS FORMULAÇÕES INOCULANTES: DETERMINAÇÕES DE UFC E MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA COM USO DE CORANTES VITAIS

A avaliação da viabilidade celular de *A. brasilense* Ab-V5 nas formulações desenvolvidas foi realizada no momento da coleta dos cultivos (36, 72 e 144 h de cultivo) e após 20 dias de armazenamento, por meio da contagem de UFC (Tabela 7) e mediante microscopia de fluorescência (Figuras 14, 16 e 18). A partir das imagens de microscopia foi possível obter a porcentagem de células vivas em cada formulação (Figuras 15,17 e 19).

Tabela 7 Contagem de Unidades Formadoras de Colônia antes do armazenamento das formulações de inoculantes (36, 72 e 144 h de cultivo).

FORMULAÇÕES	TEMPO DE CULTIVO (h)		
	36	72	144
Log UFC.mL ⁻¹			
MCA2	8,8	9,0	ND
MCA4	8,9	8,0	8,0
FORM 15	8,6	8,1	ND

ND (não detectado) = Ausência de colônias

As formulações foram armazenadas após 36, 72 e 144 h de cultivo. Esses três tempos foram definidos com base nos resultados de cinética de crescimento de *A. brasilense* Ab-V5 e produção de biopolímeros (EPS e PHB), no qual buscou-se um balanço entre maior número de células, juntamente com alto acúmulo de EPS e PHB.

No momento da coleta das amostras, todos os cultivos de 36 e 72 h (MCA2, MCA4 e FORM15) apresentavam em média 8,5 log UFC.mL⁻¹, no entanto, o cultivo de 144 h não apresentou contagem de células em MCA2 e FORM15 (Tabela 7). Mesmo na ausência de contagem nessas formulações, esse tempo de cultivo foi selecionado devido a uma maior produção de PHB comparado com 36 e 72 h de cultivo (Tabela 6).

Após 20 dias de armazenamento das formulações, não foram detectadas células viáveis em nenhuma das formulações avaliadas (dados não apresentados).

As imagens de microscopia revelaram que com o aumento no tempo de cultivo de 72 para 144 h, no momento da coleta, houve uma elevada redução no número de células vivas na formulação MCA2 (Figura 14) e FORM15 (Figura 18), confirmando os resultados de contagem de UFC (Tabela 7). Essa observação foi comprovada pela porcentagem de células vivas encontradas nessas formulações (Figuras 15 e 19). No entanto, observa-se que após 20 dias de armazenamento das formulações ocorreu exatamente o contrário. As formulações armazenadas tardiamente (72 e 144 h de cultivo) revelaram um maior número de células vivas (Figuras 14E-F, 16E-F e 18E-F) quando comparadas com o cultivo de 36 h (Figuras 14D, 16D e 18D). Na formulação MCA2, a porcentagem de células vivas foi 21 e 24%, em MCA4 19 e 20% (cultivo de 72 e 144 h respectivamente para cada formulação), e em FORM 15 a maior porcentagem foi observada no cultivo de 72 h (27%). É interessante notar que a maior produtividade de PHB, dentre os tempos de cultivo escolhidos para o armazenamento das formulações, foi encontrado nas células cultivadas por mais tempo (72 e 144 h). Assim, a presença do polímero nas células pode ter proporcionado um aumento na sobrevivência de *A. brasilense* Ab-V5 durante os 20 dias de armazenamento das formulações, já que as células com maior acúmulo de PHB podem resistir por mais tempo a condições adversas.

Figura 14 Sobrevivência de *A. brasilense* Ab-V5 no momento da coleta dos cultivos e após 20 dias de armazenamento da formulação MCA2. As células foram coradas com o kit LIVE/DEAD BacLight L-13152, e avaliadas em microscópio de fluorescência. (A) 36 h de cultivo; (B) 72 h de cultivo; (C) 144 h de cultivo; (D) 20 dias de armazenamento (cultivo de 36 h); (E) 20 dias de armazenamento (cultivo de 72 h); (F) 20 dias de armazenamento (cultivo de 144 h).

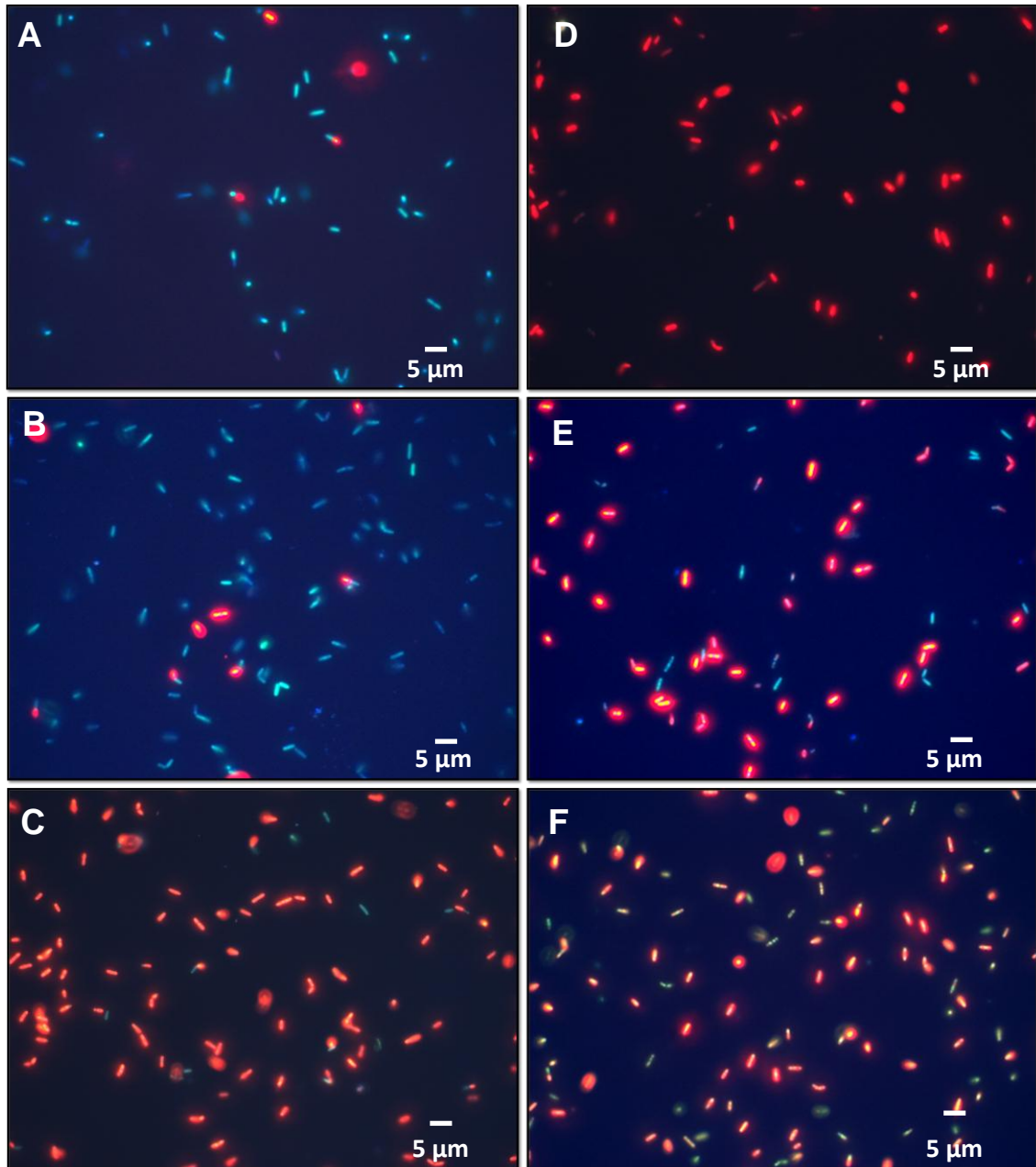


Figura 15 Porcentagem de células vivas de *A. brasilense* Ab-V5 no momento da coleta dos cultivos (36, 72 e 144 h) e após 20 dias de armazenamento da formulação MCA2.

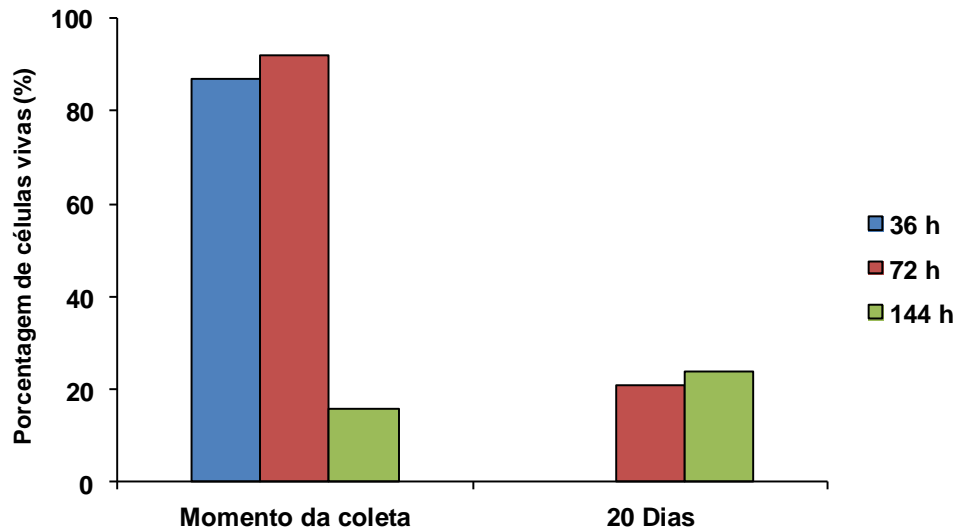
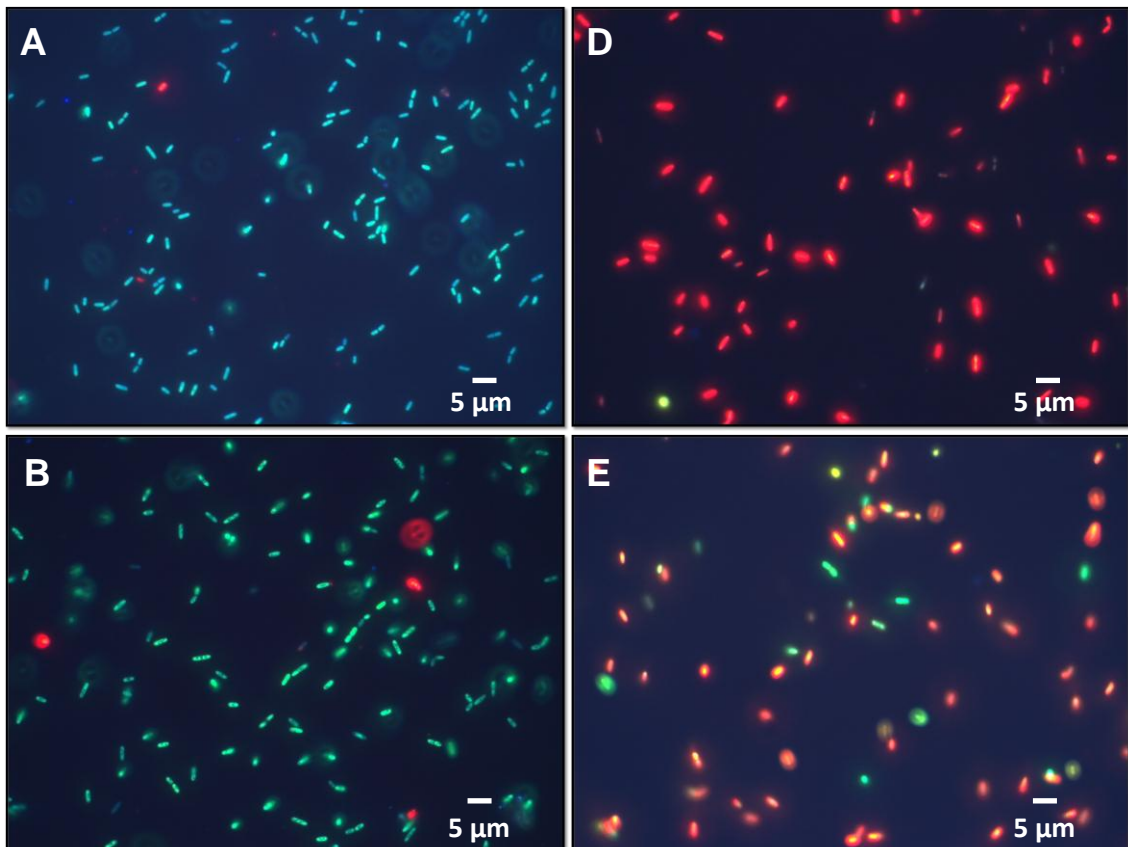


Figura 16 Sobrevivência de *A. brasilense* Ab-V5 no momento da coleta dos cultivos e após 20 dias de armazenamento da formulação MCA4. As células foram coradas com o kit LIVE/DEAD BacLight L-13152, e avaliadas em microscópio de fluorescência. **(A)** 36 h de cultivo; **(B)** 72 h de cultivo; **(C)** 144 h de cultivo; **(D)** 20 dias de armazenamento (cultivo de 36 h); **(E)** 20 dias de armazenamento (cultivo de 72 h); **(F)** 20 dias de armazenamento (cultivo de 144 h).



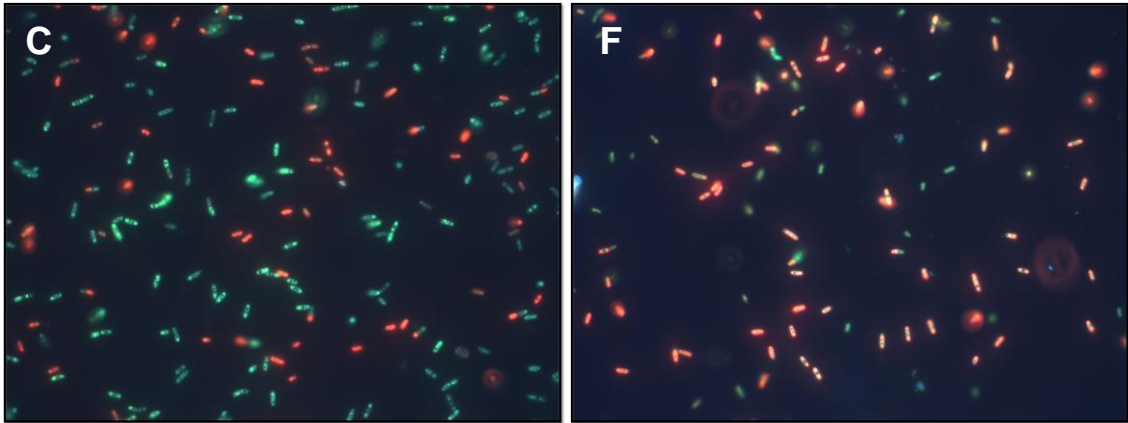


Figura 17 Porcentagem de células vivas de *A. brasilense* Ab-V5 no momento da coleta dos cultivos (36, 72 e 144 h) e após 20 dias de armazenamento da formulação MCA4.

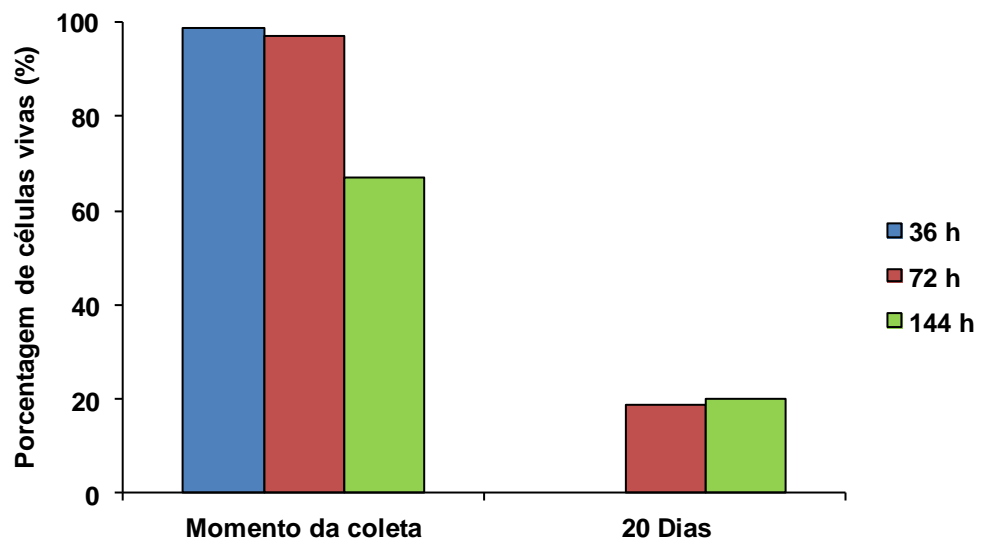


Figura 18 Sobrevivência de *A. brasilense* Ab-V5 no momento da coleta dos cultivos e após 20 dias de armazenamento da FORM15. As células foram coradas com o kit LIVE/DEAD BacLight L-13152, e avaliadas em microscópio de fluorescência. **(A)** 36 h de cultivo; **(B)** 72 h de cultivo; **(C)** 144 h de cultivo; **(D)** 20 dias de armazenamento (cultivo de 36 h); **(E)** 20 dias de armazenamento (cultivo de 72 h); **(F)** 20 dias de armazenamento (cultivo de 144 h).

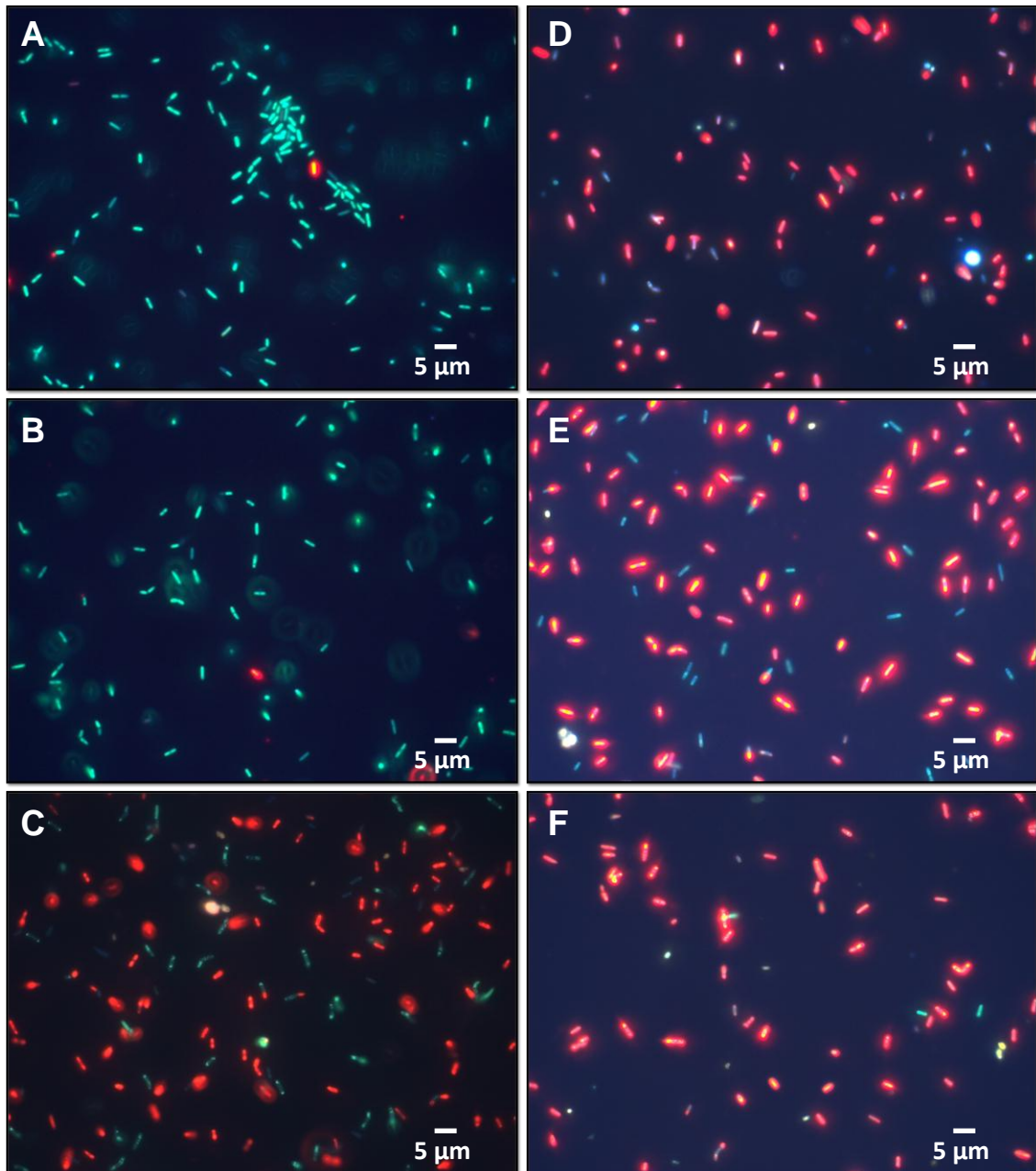
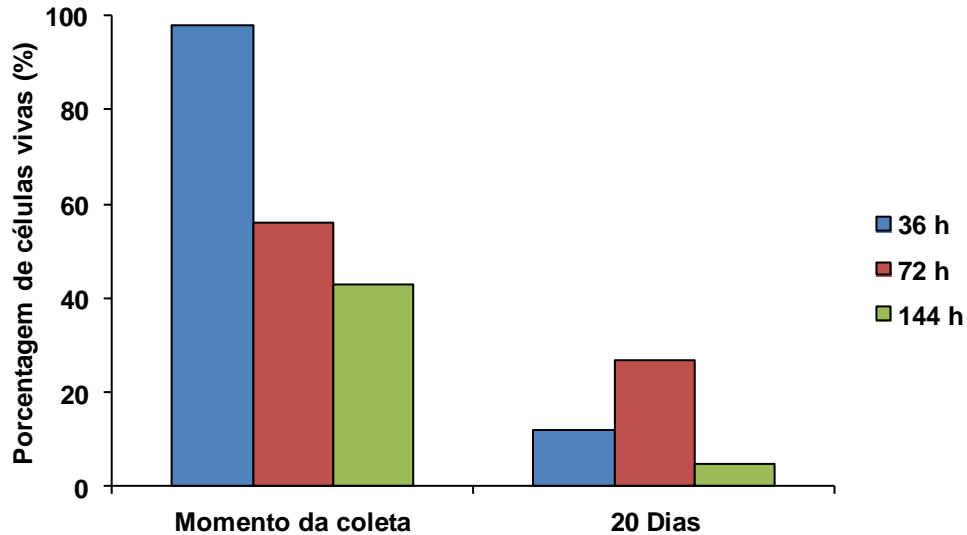


Figura 19 Porcentagem de células vivas de *A. brasilense* Ab-V5 no momento da coleta dos cultivos (36, 72 e 144 h) e após 20 dias de armazenamento da FORM15.



Apesar da ausência de contagem de UFC após 20 dias de armazenamento das formulações, foi possível visualizar nas imagens de microscopia a presença de células vivas (verdes) em todas as formulações armazenadas com 72 e 144 h de cultivo. Dessa forma, a não detecção de contagem pode ser explicado devido a altas diluições plaqueadas (10^5 a 10^7), ou ainda a problemas com a metodologia utilizada para a contagem de células.

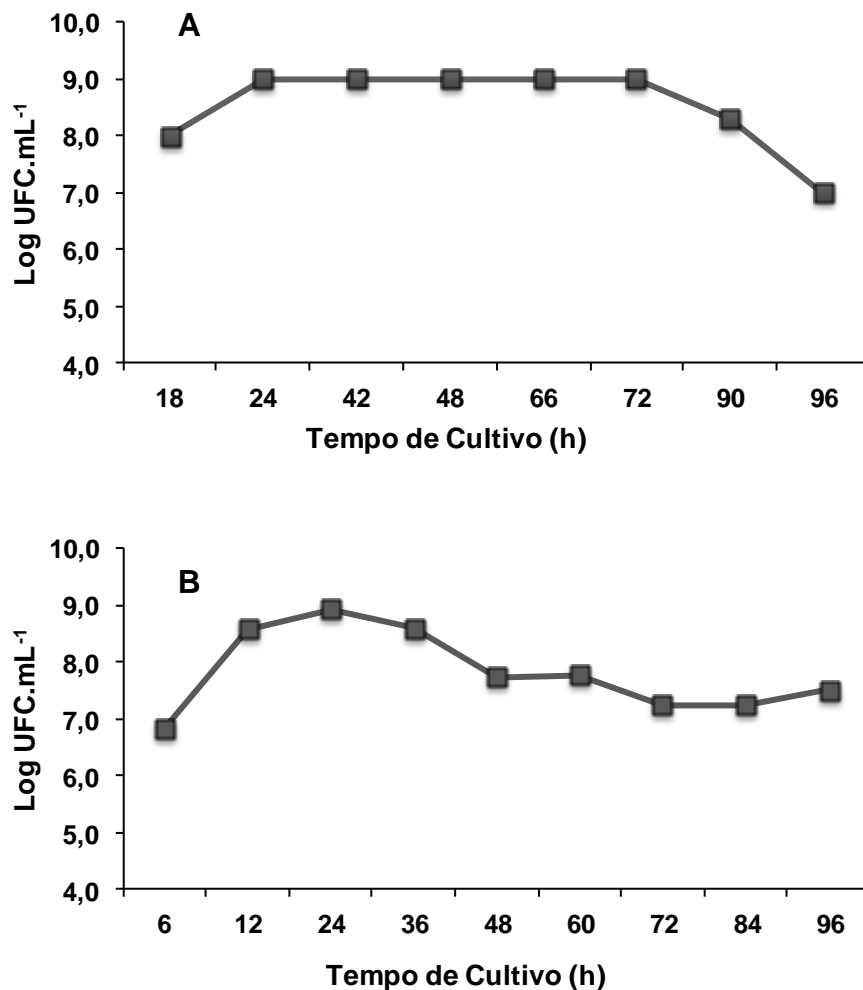
FERNANDES JÚNIOR (2006) explica que o comportamento da bactéria no inoculante pode variar no estágio inicial de armazenamento. Portanto, entender a dinâmica da bactéria nas diferentes formulações desde o início pode auxiliar nas estratégias de manuseio e armazenamento, bem como avaliar os efeitos das concentrações dos componentes utilizados para alcançar condições mais estáveis.

Os resultados encontrados neste trabalho sugerem que outros estudos devam ser realizados com relação ao tempo de armazenamento ou a utilização dos componentes presentes na formulação. Desse modo, novos estudos estão sendo conduzidos no laboratório a fim de aumentar a viabilidade de *Azospirillum brasilense* Ab-V5 nas formulações desenvolvidas.

5.3 ESCALONAMENTO DA PRODUÇÃO DE INOCULANTE CONTENDO *A. BRASILENSE* AB-V5: ESCALA SEMI-PILOTO

O experimento em fermentador permitiu avaliar a cinética de crescimento de Ab-V5 em FORM15 e comparar com o cultivo realizado em agitador orbital. Para o ensaio foi selecionado o meio FORM15 por ser a formulação utilizada como controle durante o trabalho. As avaliações compreenderam a determinação do número de UFC (Figura 20), e observações microscópicas da viabilidade celular utilizando corantes vitais (Figura 21). A partir das imagens de microscopia foi possível obter a porcentagem de células vivas durante o tempo de cultivo avaliado (Figura 22).

Figura 20 Cultivo de *A. brasilense* Ab-V5 na FORM15 em fermentador (A) e agitador orbital (B).

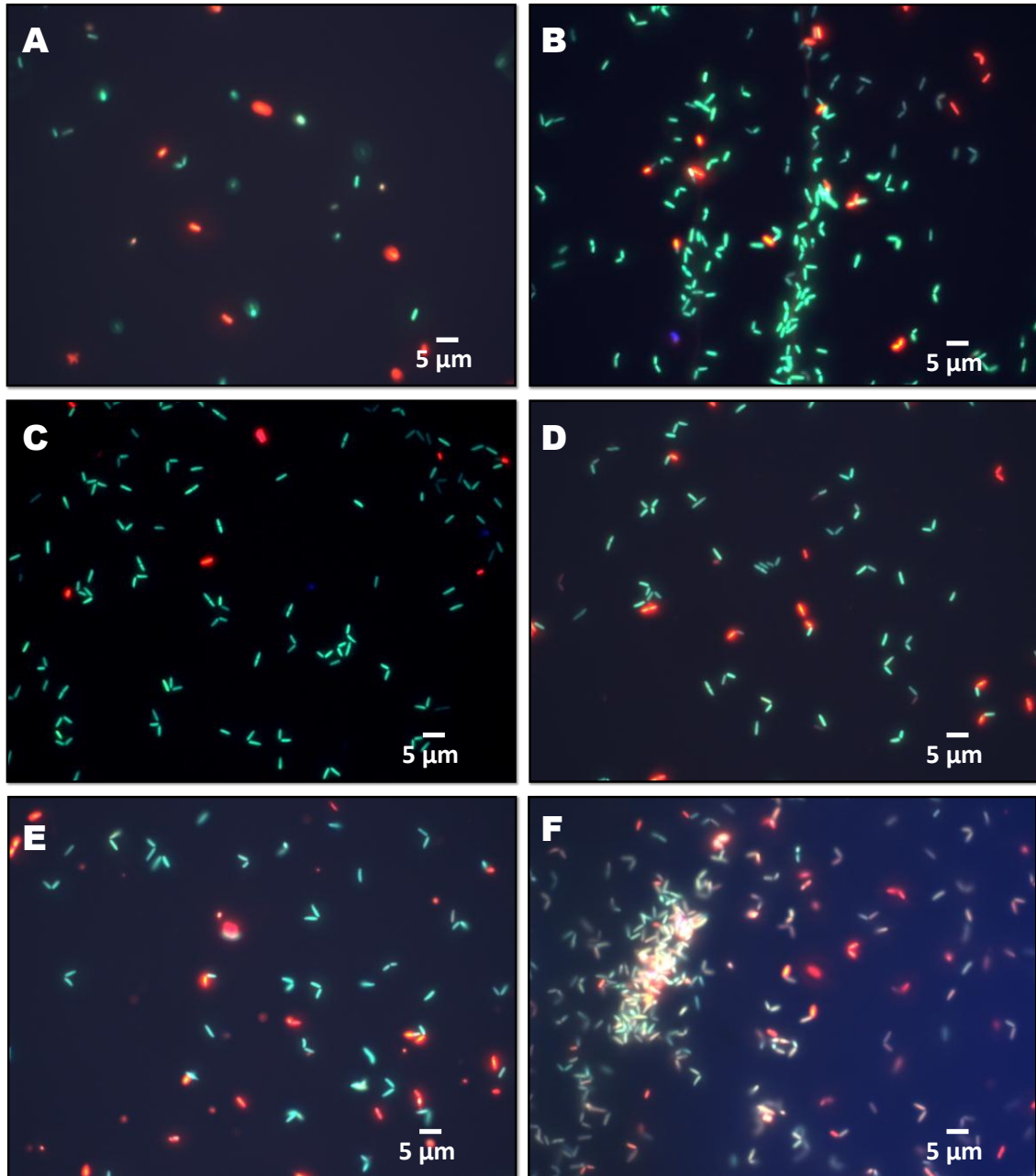


Em 24 h de cultivo o número de células viáveis encontrada em FORM15 foi $4,4 \times 10^8$ e $8,3 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹ em fermentador e agitador orbital respectivamente. A partir de 48 h foi possível observar uma queda acentuada na contagem de UFC proveniente do cultivo em agitador (6×10^7 UFC.mL⁻¹). No entanto, o experimento realizado em fermentador demonstrou a manutenção de células de 24 a 72 h de cultivo, apresentando uma fase estacionária de maior duração comparada com o cultivo em agitador.

Ao comparar a máxima densidade populacional de *A. brasilense* Ab-V5 percebe-se que o ensaio em fermentador desenvolveu-se de forma semelhante ao ensaio em agitador orbital, visto que não houve diferença na contagem de células (1×10^9 log UFC.mL⁻¹). Entretanto, observou-se uma importante diferença em relação manutenção de células viáveis, que pode ser devido a influência das condições ambientais melhor controladas no fermentador relativas à agitação, aeração, e controle de pH, que contribuíram positivamente para aumentar os parâmetros cinéticos do cultivo.

As imagens de microscopia (Figura 21) e os valores de porcentagem de células vivas (Figura 22) obtidas durante o cultivo de *A. brasilense* no fermentador demonstrou que a partir de 24 h até o final do cultivo, a porcentagem de células vivas encontradas em FORM15 manteve-se praticamente estável (maior que 70%). Esse resultado confirma a fase estacionária de longa duração observada na avaliação de UFC (Figura 20-A).

Figura 21 Avaliação microscópica da viabilidade celular de Ab-V5 durante o crescimento na FORM15 sob condições controladas (fermentador). As células foram coradas com o kit LIVE/DEAD BacLight L-13152, e avaliadas em microscópio de fluorescência. (A) 18 h de cultivo; (B) 24 h de cultivo; (C) 42 h de cultivo; (D) 48 h de cultivo; (E) 66 h de cultivo; (F) 72 h de cultivo; (G) 90 h de cultivo; (H) 96 h de cultivo.



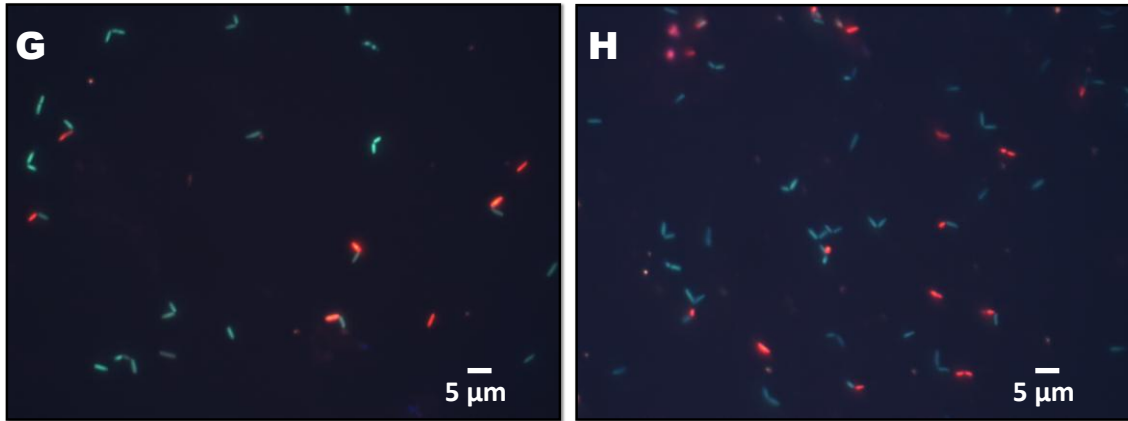
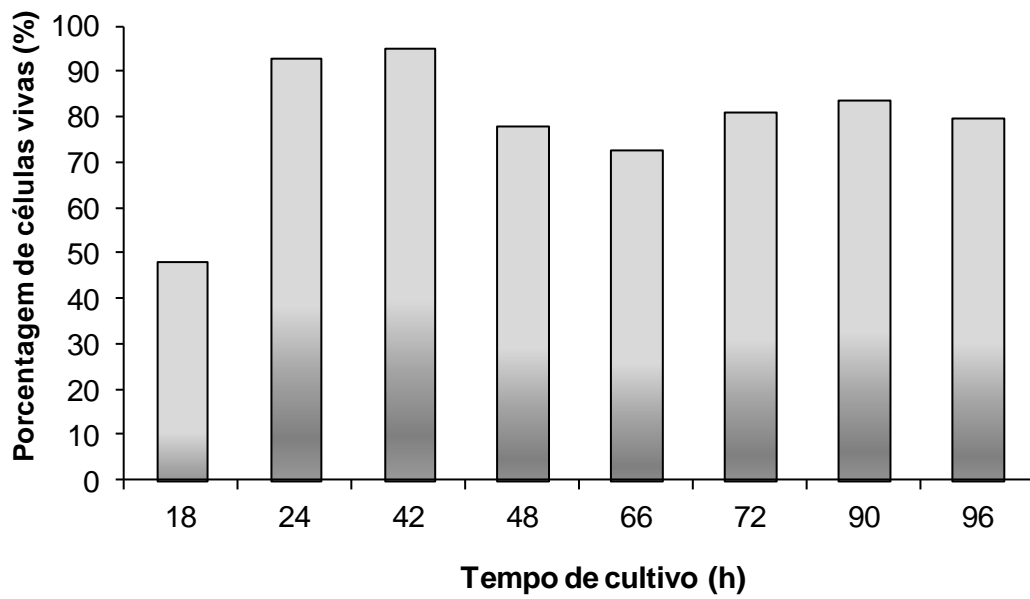


Figura 22 Porcentagem de células vivas de *A. brasilense* Ab-V5 durante o crescimento no meio FORM15 em fermentador.



6 CONCLUSÕES

- O meio de cultura MCA4 foi o que apresentou maior potencial de utilização para o desenvolvimento de uma formulação inoculante, pois resultou na maior contagem de *A. brasilense*, e alta produção dos biopolímeros EPS e PHB. A presença desses biopolímeros nas células influenciou positivamente a sobrevivência de *A. brasilense* Ab-V5 durante o armazenamento das formulações, já que células com maior acúmulo de EPS e PHB podem resistir por mais tempo a condições adversas.
- O experimento realizado em fermentador demonstrou a manutenção de células viáveis de Ab-V5 em FORM15, apresentando uma fase estacionária de maior duração comparada com o cultivo em agitador.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, S.C. **A evolução da produção de inoculantes no Brasil**. Disponível em: <http://www.anpii.org.br/?artigos/6/a_evolucao_da_producao_de_inoculantes_no_brasil/30/>. Acesso em: 6 abr. 2014.
- ANPII - **Associação Nacional de Produtores e Importadores de Inoculantes**. Disponível em: <http://www.anpii.org.br/?artigos/6/anpii_realiza_pesquisa_sobre_uso_de_inoculante_no_brasil./7/>. Acesso em: 15 jan. 2014.
- ANPII - **Associação Nacional de Produtores e Importadores de Inoculantes**. Disponível em: <<http://www.anpii.org.br/homesite/default.asp>>. Acesso em: 28 fev. 2012.
- ANDA – **Associação Nacional para Difusão de Adubos**. Disponível em <<http://www.anda.org.br/estatisticas.aspx>>. Acesso em: 19 jan. 2014.
- ALBAREDA, M.; RODRÍGUEZ-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, n. 11, p. 2771-2779, nov. 2008.
- BAHAT-SAMET, E.; CASTRO-SOWINSKI, S.; OKON, Y. Arabinose content of extracellular polysaccharide plays a role in cell aggregation of *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 237, n. 2, p. 195-203, 15 ago. 2004.
- BAIS, H.P; WEIR, T.L; PERRY, L.G; GILROY, S; VIVANCO, J.M. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annual Review of Plant Biology**, 57:234-266, 2006
- BALDANI, V. L. D.; DOBEREINER, J. HOST-PLANT SPECIFICITY IN THE INFECTION OF CEREALS WITH *AZOSPIRILLUM SPP*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 12, p. 433-439, 1980.
- BASHAN, Y.; HOLGUIM, G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 103-121, 1997.
- BASHAN, Y. INOCULANTS OF PLANT GROWTH-PROMOTING BACTERIA FOR USE IN AGRICULTURE. **Biotechnology Advances**, v. 16, n. 4, p. 729-770, 1998.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L. E. *Azospirillum*-plant relationships : physiological , molecular , agricultural , and environmental advances (1997 – 2003). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 521-577, 2004.
- BASHAN, Y.; TREJO, A.; DE-BASHAN, L. E. Development of two culture media for mass cultivation of *Azospirillum spp.* and for production of inoculants to enhance plant growth. **Biology and Fertility of Soils**, v. 47, n. 8, p. 963-969, 7 abr. 2011.

- BASHAN, Y. et al. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). **Plant and Soil**, v. 1886, 19 nov. 2013.
- BEAUREGARD, P. B. CHAI, Y.; VLAMAKIS, H.; LOSICK, R.; KOLTER, R. *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 17, p. E1621-30, 23 abr. 2013.
- BELAL, E. B. Production of Poly- β -Hydroxybutyric Acid (PHB) by *Rhizobium elti* and *Pseudomonas stutzeri*. **Journal of Biological Sciences**, v. 5, n. 6, p. 273-284, 2013.
- BERG, G. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.84, p. 11-18, 2009.
- BRAHMAPRAKASH, G. P.; SAHU, P. K. Biofertilizers for Sustainability. **Journal of the Indian Institute of Science**, v. 92, p. 26, 2012.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 13, de 24 de março de 2011. Aprova as normas sobre especificações, garantias, registro, embalagem e rotulagem dos inoculantes destinados à agricultura, bem como as relações dos micro-organismos autorizados e recomendados para produção de inoculantes no Brasil. **Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil**, 25 mar. 2011.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **XVI RELARE apresenta estudos para melhorar produção**. 2012. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/comunicacao/noticias/2012/08/xvi-relare-apresenta-estudos-para-melhorar-producao>. Acesso em: 27 out. 2012.
- BREN, A. HART, Y.; DEKEL, E.; KOSTER, D.; ALON, U. The last generation of bacterial growth in limiting nutrient. **BMC Systems Biology**, v. 7, n. 1, p. 27, jan. 2013.
- BUCHER, C. A.; REIS, V. M. **Biofertilizante Contendo Bactérias Diazotróficas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2008. 17p. (Documentos / Embrapa Agrobiologia, ISSN 1517-8498 ; 247).
- BURDMAN, S. JURKEVITCH, E.; SCHWARTSBURD, B.; HAMPEL, M.; OKON, Y. Aggregation in *Azospirillum brasilense*: effects of chemical and physical factors and involvement of extracellular components. **Microbiology (Reading, England)**, v. 144, p. 1989-99, jul. 1998.
- BURDMAN, S. JURKEVITCH, E.; SCHWARTSBURD, B.; OKON, Y. Involvement of outer-membrane proteins in the aggregation of *Azospirillum brasilense*. **Microbiology**, V. 145, p. 1145-1152, 1999.
- BURDMAN, S. JURKEVITCH, E.; SORIA-DÍAZ, M. E.; GIL SERRANO, A. M.; OKON, Y. Extracellular polysaccharide composition of *Azospirillum brasilense* and its relation with cell aggregation. **FEMS Microbiology Letters**, v. 189, n. 2, p. 259-64, 15 ago. 2000.

BURTON, J. C. **LEGUME INOCULANT PRODUCTION MANUAL**, p. 99, 1984.

CANTERI, M. G.; ALTHAUS, R. A.; VIRGENS FILHO, J. S.; GIGLIOTI, E. A.; GODOY, C. V. SASM-Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott-Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v.1, p.18-24. 2001.

CHEN, Y.-T.; WU, S.-C.; LEE, C.-M. Relationship between cell growth, hydrogen production and poly- β -hydroxybutyrate (PHB) accumulation by *Rhodospseudomonas palustris* WP3-5. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 18, p. 13887-13894, set. 2012.

DAMASCENO, R.G. **Comparação e desenvolvimento de metodologias para o controle de qualidade de inoculantes**. 2011. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2011.

DOBBELARE, S.; VANDERLEYDERN, J.; OKON, Y. Plant-growth promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, 22:107-149, 2003.

DÖBEREINER, J.; DAY, J. M. Associative symbiosis in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In: NEWTON, W. E.; NYMAN, C. T. (Ed.). **Nitrogen Fixation**. Pullman: Washington State University, V.2, p. 518-538, 1976.

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

DROGUE, B. DORÉ, H.; BORLAND, S.; WISNIEWSKI-DYÉ, F.; PRIGENT-COMBARET, C. Which specificity in cooperation between phytostimulating rhizobacteria and plants? **Research in Microbiology**, v. 163, n. 8, p. 500-10, 2012.

FALLIK, E.; OKON, Y. INOCULANTS OF *AZOSPIRILLUM BRASILENSE*: BIOMASS PRODUCTION, SURVIVAL AND GROWTH PROMOTION OF *SETARIA ITALICA* AND *ZEA MAYS*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 28, n. 1, p. 123-126, 1996.

FERNANDES JUNIOR, P. I. Composições Poliméricas a Base de Carboximetilcelulose (CMC) e Amido como Veículos de Inoculação de Rizóbio em Leguminosas. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ, 2006.

FERNANDES JUNIOR, P. I.; ROHR, T.G.; OLIVEIRA, P.J.; XAVIER, G.R.; RUMJANEK, N.G. Polymers as carrier for rhizobial inoculant formulations. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 44, n.9, p. 1184-1190, 2009.

FERRAZ, JOSÉ MARIA GUSMAN. **A insustentabilidade da revolução verde**. In: Informativo Meio Ambiente e Agricultura, Jaguariúna, ano VII, n. 26, abr/mai/jun 1999. Disponível em http://www.cnpma.embrapa.br/informativo/mostra_informativo.php3?id=105; acesso em junho de 2012.

- FERREIRA, J. S.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. Seleção de inoculantes à base de turfa contendo bactérias diazotróficas em duas variedades de arroz. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 1, p. 179-185, 2010.
- FIBACH-PALDI, S.; BURDMAN, S.; OKON, Y. Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 326, n. 2, p. 99-108, jan. 2012.
- FREIRE, J. R. J. Trabalhos em Rizobiologia no Rio Grande do Sul. IN: Reunião Latino- Americana. Inoculantes Leguminosa, 4, Porto Alegre, **Anais...**, 1968: 19-24.
- GAURI, S. S.; MANDAL, S. M.; PATI, B. R. Impact of *Azotobacter* exopolysaccharides on sustainable agriculture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 95, n. 2, p. 331-8, jul. 2012.
- GOEBEL, E. M.; KRIEG, N. R. Fructose catabolism in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. **Journal of Bacteriology**, 159, p. 86-92, 1984.
- HARDOIM, P.R.; VAN OVERBEEK, L.S.; ELSAS, J.D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, v.16, p. 463-471, 2008.
- HARTMAN, A.; BALDANI, J. I. The genus *Azospirillum*. In: DWORKIN, M.; FLAKNOW, S.; ROSEMBERG, E.; SCHLEIFER, K-H.; STACKERBRANDT, E.; (Ed.) **The Prokaryotes**. 3. ed. New York : Springer, v. 5.; p. 115-140.
- HAYAT, R.; Ali, S.; AMARA, U.; KHALID, R.; AHMED, I. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. **Annals Microbiology** 60: 579–598, 2010.
- HERMAWAN, S.; JENDROSSEK, D. Microscopical investigation of poly(3-hydroxybutyrate) granule formation in *Azotobacter vinelandii*. **FEMS Microbiology letters**, v. 266, p. 60-4, jan. 2007.
- HERRMANN, L.; LESUEUR, D. Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 20, p. 8859-73, out. 2013.
- HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, v. 65, p. 151-164, 2000.
- HUNGRIA, M.; CAMPOS, R. J.; MENDES, I. C. **FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO NA CULTURA DA SOJA**. Londrina: Embrapa Soja, 2001. 48p.
- HUNGRIA, M.; LOUREIRO, F. M.; MENDES, I. C.; CAMPO, R. J.; GRAHAM, P. H. Inoculant preparation, production and application. In: WERNER, D.; NEWTON, W. E (Ed.) **Nitrogen Fixation Agriculture, Forestry, Ecology and the Environment**. Dordrecht, Amsterdam: Springer, 2005. 347p. p. 224-253.

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, 2007. 80p. (Embrapa Soja. Documentos, 283).

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo**. Londrina: Embrapa Soja, 2011.36p. (Documentos/Embrapa Soja, ISSN 1516-781X; n.325)

JARDIM-FREIRE, J.R.; VERNETTI, F.J. A pesquisa com soja, a seleção de rizóbios e a produção de inoculantes no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v.5, p. 117-126, 1999.

JENDROSSEK, D. Fluorescence microscopical investigation of poly(3-hydroxybutyrate) granule formation in bacteria. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 2, p. 598-603, 2005.

JOE, M. M. JALEEL, C. A.; SIVAKUMAR, P. K.; ZHAO, C.; KARTHIKEYAN, B. Co-aggregation in *Azospirillum brasilense* MTCC-125 with other PGPR strains: Effect of physical and chemical factors and stress endurance ability. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 40, n. 5, p. 491-499, set. 2009.

JOE, M.; KARTHIKEYAN, M. B.; SEKAR, C. SEKAR, C.; DEIVEEKASUNDARAM, M. Optimization of biofloc production in *Azospirillum brasilense* (MTCC-125) and evaluation of its adherence with the roots of certain crops. **Indian Journal of Microbiology**, v. 50, n. Suppl 1, p. 21-5, out. 2010.

JOE, M. M. KARTHIKEYAN, B.; CHAUHAN, P. S.; SHAGOL, C.; ISLAM, M. R.; DEIVEEKASUNDARAM, M.; SA, T. Survival of *Azospirillum brasilense* flocculated cells in alginate and its inoculation effect on growth and yield of maize under water deficit conditions. **European Journal of Soil Biology**, v. 50, p. 198-206, maio. 2012.

JÚNIOR, P. I. F.; ROHR, T. G.; OLIVEIRA, P. J.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N.G. Polymers as carriers for rhizobial inoculant formulations. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 19, p. 1184-1190, 2009.

JÚNIOR, E. B. DA S. JÚNIOR, P. I. F.; OLIVEIRA, P. J.; RUMJANEK, N. G.; BODDEY, R. M.; XAVIER, G. R. Eficiência agronômica de nova formulação de inoculante rizobiano para feijão-caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 3302, n. 1, p. 138-141, 2012.

KADOURI, D.; JURKEVITCH, E.; OKON, Y. Involvement of the Reserve Material Poly- β -Hydroxybutyrate in *Azospirillum brasilense* Stress Endurance and Root Colonization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 6, p. 3244-3250, 2003.

KARR, D. B.; WATERS, J. K.; EMERICH, D. W. Analysis of Poly- β -Hydroxybutyrate in *Rhizobium japonicum* Bacteroids by Ion-Exclusion High-Pressure Liquid Chromatography and UV Detection. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 46, n. 6, p. 1339-1344, 1983.

KEFALOGIANNI, I.; AGGELIS, G. Modeling growth and biochemical activities of *Azospirillum* spp. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, n. 3, p. 352-7, mar. 2002.

KIM, J.; REES, D. C. Nitrogenase and biological nitrogen fixation. **Biochemistry**, v. 33, p.389–397, 1994

KIM, D. S.; WELLER, D. M.; COOK, R. J. Population dynamics of *Bacillus* sp. L324-92R12 and *Pseudomonas fluorescens* 2-79RN10 in the rhizosphere of wheat. **Phytopathology**, v.87, p. 559-564, 1997.

KONNOVA, S. A. BRYKOVA, O. S.; SACHKOVA, O. A.; EGORENKOVA, I. V.; IGNATOV, V. V. Protective Role of the Polysaccharide-containing Capsular Components of *Azospirillum brasilense*. **Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 436-440, 2001.

KONNOVA, S. A. FEDONENKO, Y. P.; MAKAROV, O. E.; IGNATOV, V. V. Effect of Cultivation Conditions on the Composition of Extracellular Polysaccharide-Containing Substances in the Bacterium *Azospirillum brasilense*. **Biology Bulletin**, v. 30, n. 4, p. 354-360, 2003

KUMARESAN, G.; REETHA, D. Survival of *Azospirillum brasilense* in liquid formulation amended with different chemical additives. **Journal of Phytology**, v. 3, n. 10, p. 48-51, 2011.

LAW, J. H.; SLEPECKY, R. A. Assay of poly- β -hydroxybutyric acid. **Journal of Bacteriology**, v. 82, n. 1, p. 33-36, jul. 1961.

LERNER, A.; VALVERDE, A.; CASTRO-SOWINSKI, S.; LERNER, H.; OKON, Y.; BURDMAN, S. Phenotypic variation in *Azospirillum brasilense* exposed to starvation. **Environmental Microbiology Reports**, v. 2, n. 4, p. 577-586, 3 mar. 2010.

MARCELINO, P. R. F. **Desenvolvimento de Formulações para Utilização como Veículo Inoculante de Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal**. 2012. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina-Pr, 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, n. 2, p. 83-89, ago. 2010.

MANNA, A.; PAL, S.; PAUL, A. K. Occurrence of Poly-3-hydroxybutyrate in *Azospirillum* sp. **Folia Microbiologica**, v. 42, n. 6, p. 629-634, 1997.

MC LAUGHLIN, N. B.; HIBA, A.; WALL, G. J.; KING, D. J. Comparison of energy inputs for inorganic fertilizer and manure based corn production. **Canadian Agricultural Engineering**, v. 2, n.1, p. 9-17, 2000.

MENESES, C. H. S. G.; SERRATO, R. V.; ROUWS, L. F. M.; ARAÚJO, J. L. S. de; VIDAL, M. S.; BALDANI, J. I. **Produção, extração e quantificação de exopolissacarídeos sintetizados por *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5t**

em meio de cultivo líquido. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2009. 6 p. (Embrapa Agrobiologia. Comunicado técnico, 122).

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.

MONOD, J. The Growth of Bacterial Cultures. **Annual Review Microbiology**. v. 3, p. 371-394, 1949.

MORENO-GALVÁN, A.; ROJAS-TAPIAS, D. F.; BONILLA, R. Development and evaluation of an alternative culture medium for mass cultivation of *Azospirillum brasilense* C16 using sequential statistical designs. **Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria**, v. 13, n. 2, p. 201-206, 2012.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras: UFLA, 625 p. 2002.

NOBBE, F.; HILTNER, L. (1896). U.S. Patent 570 813. Inoculation of the soil for cultivating leguminous plants.

O'CALLAGHAN, M.; GERARD, E. M.; JOHNSON, V. W. Effect of soil moisture and temperature on survival of microbial control agents. *Pasture Weeds & Pests*; N. Z. **Plant Protect.**, v. 54, p. 128-135, 2001.

OKON, Y.; ITZIGSOHN, R. Poly- β - 3-hydroxybutyrate metabolism in *Azospirillum brasilense* and the ecological role of PHB in the rhizosphere. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 103, p. 131-139, 1992.

OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants, **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v.63, n.7, p.366-370, 1997.

OLIVEIRA, A. L. M.; STOFFELS, M.; SCHMID, M.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; HARTMANN, A. Colonization of sugarcane plantlets by mixed inoculations with diazotrophic bacteria. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, n. 1, p. 106-113, jan. 2008.

PRIETO, P. SCHILIRÒ, E.; MALDONADO-GONZÁLEZ, M. M.; VALDERRAMA, R.; BARROSO-ALBARRANCÍN, J. B.; MERCADO-BLANCO, J. Root hairs play a key role in the endophytic colonization of olive roots by *Pseudomonas* spp. with biocontrol activity. **Microbiology ecology**, v. 62, n. 2, p. 435-45, ago. 2011.

PRINSEN, E.; COSTACURTA, A.; MICHIELS, K.; VANDERLEYDEN, J.; ONCKELEN, H. V. *Azospirillum brasilense* Indole-3-Acetic Acid Biosynthesis: Evidence for a Non-Tryptophan Dependent Pathway. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 6, n. 5, p. 609-615, 1993.

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, n. 3, p. 391-9, set. 2008.

REIS, V. M. Uso de Bactérias Fixadoras de Nitrogênio como Inoculante para Aplicação em Gramíneas. **Embrapa Agrobiologia**, p. 22, 2007.

REIS, V. M.; PEDRAZA, R. O.; TEIXEIRA, K. R. D. S. Diversidade e relação filogenética de espécies do gênero. **Seropédica: Embrapa Agrobiologia**, p. 20, 2010.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JÚNIOR, V.A.;VICTOR, O. Meio simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* tipo B. **Summa Phytopatologica**, Jaboticabal, v.12, p.16,1986.

SADASIVAN, L.; NEYRA, C. A. Flocculation in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*: exopolysaccharides and cyst formation. **Journal of Bacteriology**, v. 163, n. 2, p. 716-23, ago. 1985.

SADASIVAN, L.; NEYRA, C. A. Cyst production and brown pigment formation in Aging Cultures of *Azospirillum brasilense* ATCC 29145t. **Journal of Bacteriology**, v. 169, n. 4, 1987.

SAMANTARAY, S.; MALLICK, N. Production and characterization of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) polymer from *Aulosira fertilissima*. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, n. 4, p. 803-814, 27 jul. 2011.

SANTOS, A. A. **Produção de polissacarídeos visando obter insumos biológicos de interesse para a agricultura**. 2010. Dissertação (Mestrado em Agronomia Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE, 2010.

SEI, FERNANDO BONAFÉ. **Artigo: Novos produtos e tecnologias em inoculantes para cultura da soja no Brasil**. In: Associação Brasileira de Tecnologias de Sementes (ABRATES). 24, set 2013. Disponível em : <http://www.abrates.org.br/portal/noticias/722-artigo-novos-produtos-e-tecnologias-em-inoculantes-para-cultura-da-soja-no-brasil>; acesso em: jan. 2014

SCOTT, M.; HWA, T. Bacterial growth laws and their applications. **Current opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 559-65, ago. 2011.

SERRATO, R. V.; SASSAKI, G. L.; CRUZ, L. M.; PEDROSA, F. O.; GORIN, P. A. J.; LACOMINI, M. Culture conditions for the production of an acidic exopolysaccharide by the nitrogen-fixing bacterium *Burkholderia tropica*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 493, p. 489-493, 2006.

SILVA, M. F. DA. **Uso de Inoculante Polimérico contendo Bactérias Diazotróficas na Cultura da Cana-de-açúcar**. 2009. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2009.

SILVA, L. R. **Produção experimental de inoculantes agrícolas á base de *Azospirillum* spp . para Fixação Biológica de Nitrogênio em gramíneas e Forrageiras**. 2006. Dissertação (Mestrado em biotecnologia) - USP/IPT/I.BUTANTAN, 2006.

SILVA, M. F. ; ANTÔNIO, C. S.; OLIVEIRA, P. J.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G.; SOARES, L. H. B.; REIS, V. M. Survival of endophytic bacteria in polymer-based

inoculants and efficiency of their application to sugarcane. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1-2, p. 231-243, 1 maio. 2012.

SKVORTSOV, I. M.; IGNATOV, V. V. Extracellular polysaccharides and polysaccharide-containing biopolymers from *Azospirillum* species: properties and the possible role in interaction with plant roots. **FEMS Microbiology Letters**, v. 165, n. 2, p. 223-9, 15 ago. 1998.

SPAEPEN, S. VERSÉES, W.; GOCKE, D.; POHL, M.; STEYAERT, J.; VANDERLEYDEN, J. Characterization of phenylpyruvate decarboxylase, involved in auxin production of *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 21, p. 7626-33, nov. 2007.

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

STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 487-506, out. 2000.

STRIGUL, N. S.; KRAVCHENKO, L. V. Mathematical modelling of PGPR inoculation into the rhizosphere. **Environmental Modelling Software**., v.21, p. 1158-1171, 2006.

STURZ, A.V.; NOWAK, J. Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. **Applied Soil Ecology**, p. 183-190, 2000.

SUTHERLAND, I. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. **Microbiology (Reading, England)**, v. 147, n. Pt 1, p. 3-9, jan. 2001.

TARRAND, J. J.; KRIEG, N. R.; DÖBEREINER, J. A taxonomic study of the Spirillum lipoferum group, with description of a new genus, *Azospirillum* gen. nov., and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) com nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. Canadian Journal of Microbiology, v. 24, p. 967-980, 1978.

TAL, S.; SMIRNOFF, P.; OKON, Y. The regulation of poly- β -hydroxybutyrate metabolism in *Azospirillum brasilense* during balanced growth and starvation. **Journal of General Microbiology**, p. 1191-1196, 1990.

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

TEMPRANO, F.J; ALBAREDA, M; CAMACHO M; SANTAMARÍA, C; NOMBRE RODRÍGUEZ-NAVARRO, C. Survival of several *Rhizobium/Bradyrhizobium* strains on different inoculant formulations and inoculated seeds. **International Microbiology**. V. 5, p. 81-86, 2002.

- TITTABUTR, P.; PAYAKAPONG, W.; TEAUMROONG, N.; SINGLETON, P. W.; BOONKERD, N. Growth , Survival and Field Performance of Bradyrhizobial Liquid Inoculant Formulations with Polymeric Additives. **Scienceasia**, v. 33, p. 69-77, 2007.
- TRIVEDI, P.; PANDEY, A.; PALNI, L. M. S. Carrier-based Preparations of Plant Growth-promoting Bacterial Inoculants Suitable for use in Cooler Regions. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 6-7, p. 941-945, out. 2005.
- TRUJILLO-ROLDÁN, M. A.; VALDEZ-CRUZ, N. A.; GONZALEZ-MONTEERRUBIO, C. F.; ACEVEDO-SÁNCHEZ, E. V.; MARTÍNEZ-SALINAS, C.; GARCÍA-CABRERA, R. I.; GAMBOA-SUASNAVART, R. A.; MARÍN-PALACIO, L. D.; VILLEGAS, J.; BLANCAS-CABRERA, A. Scale-up from shake flasks to pilot-scale production of the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense* for preparing a liquid inoculant formulation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 6 set. 2013.
- TSAGOU, V.; AGGELIS, G. Growth dynamics of *Azospirillum lipoferum* at steady and transitory states in the presence of NH. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, n. 2, p. 286-95, fev. 2006.
- VENDAN, R. T.; THANGARAJU, M. Development and standardization of cyst based liquid formulation of *Azospirillum* bioinoculant. **Acta microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 54, n. 2, p. 167-77, jun. 2007.
- VIDEIRA, S.S.; ARAÚJO, J.K.S.; BALDANI, V.L.D. **Metodologia para Isolamento e Posicionamento Taxonômico de Bactérias Diazotróficas Oriundas de Plantas Não-leguminosas**. Rio de Janeiro: Embrapa Agrobiologia, 2007. 74p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 234).
- WESTBY, C. A; CUTSHALL, D. S.; VIGIL, G. V. Metabolism of various carbon sources by *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**, v. 156, n. 3, p. 1369-72, dez. 1983.
- YOUNG, C. ; REKHA, P. D.; LAI, W.; ARUN, A.B. Encapsulation of Plant Growth-Promoting Bacteria in Alginate Beads Enriched With Humic Acid. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 95, p. 76-83, 2006.
- YUDYT, D.-S.; RÍOS, M. D.; ALBERTO-CASAS, M.; NUÑES-CARABALLO, A.; MARTÍNEZ-MORA, M. Crecimiento de *Azospirillum brasilense* en presencia de disacáridos : sacarosa y lactosa. **ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar**, v. 47, n. 2, p. 23-30, 2013.

ANEXOS

ANEXO A – Pedido de patente



Escritório de Propriedade Intelectual

FORMULÁRIO DE DECLARAÇÃO DE INVENÇÃO

O Formulário de Declaração de Invenção (FDI) deve ser usado por professores, funcionários e alunos da UEL e pelas empresas da Intuel/Aintec para declarar a criação de uma invenção e solicitar sua propriedade intelectual.

Após o preenchimento do FDI coloque-o em envelope fechado, protocole na UEL (na ASUEL) endereçando-o para:

AINTEC/UEL

Escritório de Propriedade Intelectual – EPI

Com isto sua Declaração de Invenção fica oficialmente registrada e será enviados ao Escritório de Propriedade Intelectual (EPI) da Aintec para análise, parecer e outras providências.

Os inventores devem ler os documentos sobre a Política de Propriedade Intelectual da UEL, no endereço www.aintec.uel.br/aintec/legislação.

Havendo dúvidas no preenchimento da FDI contate o EPI da Aintec pelo e-mail: aintecepi@uel.br



Escritório de Propriedade Intelectual

1. INFORMAÇÃO PESSOAL

Nome para contato: ANDRÉ LUIZ MARTINEZ DE OLIVEIRA

Depto. na UEL./Empresa: CCE/BBTec

Tel: (43) 33714270

e-mail: almoliva@uel.br

2. TÍTULO PROPOSTO PARA A INVENÇÃO: MEIO DE CULTURA PARA A PRODUÇÃO DE BIOMASSA DA BACTÉRIA PROMOTORA DE CRESCIMENTO VEGETAL *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* COM ALTA QUANTIDADE DE EXOPOLISSACARÍDEOS E POLIHIDROXIBUTIRATO, E MÉTODO PARA A PREPARAÇÃO DO MEIO.

3. ÁREA/SUB-ÁREA/ESPECIALIDADE DA INVENÇÃO (SE SOUBER): Ciências Agrárias/Microbiologia e Bioquímica do solo

4. CAMPO DA INVENÇÃO. ESTA INVENÇÃO DIZ RESPEITO FUNDAMENTALMENTE

A: (máximo 3 linhas). Desenvolvimento de um meio de cultura para produção de biomassa de *A. brasilense* com elevada densidade de células e rizocompetência (elevada concentração de biopolímeros), promovendo maior eficiência do inoculante.

5. ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

5.1. Descreva o problema ou desafio técnico que a presente invenção se propõe a solucionar: A agricultura brasileira apresenta um alto consumo de fertilizantes, sendo o quarto maior consumidor mundial. No entanto, o país permanece dependente da disponibilidade e dos preços do mercado internacional, uma vez que a produção nacional de fertilizantes supre somente 30% do mercado (ANDA, 2014). Além dos aspectos econômicos, problemas ambientais podem ser parcialmente atribuídos ao uso indiscriminado de fertilizantes industrializados como a contaminação da água e do solo, a diminuição da biodiversidade nos agroecossistemas, o aparecimento de problemas fitossanitários, a seleção de organismos resistentes, entre outros (FERRAZ, 1999).

Neste contexto, a utilização de Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal (BPCVs) em ambientes agrícolas é uma alternativa frente ao uso de fertilizantes químicos, podendo contribuir para o desenvolvimento de uma agricultura sustentável e

Escritório de Propriedade Intelectual

de menor impacto ambiental (HERRMANN; LESUEUR, 2013). Essas bactérias se associam a diferentes espécies de plantas em ambientes naturais, e sua principal característica é favorecer o desenvolvimento do vegetal através de mecanismos como: a fixação biológica de nitrogênio (FBN), produção de fitormônios, solubilização de fosfato, o controle biológico de fitopatógenos (DOBDELARE; VANDERLEYDERN; OKON, 2003), entre outros. Incrementos de produtividade e de acúmulo de nutrientes em plantas que receberam inoculação com BPCVs são vastamente relatados pela literatura (OLIVEIRA et al., 2008; ADESEMOYE et al., 2008; MIRSHEKARI; KOUCHEBAGH, 2013; PICCININ et al., 2013).

A inoculação desses microrganismos em cultivos agrícolas é realizada pela aplicação de inoculantes, definidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), como um produto que contém microrganismos que atuam favoravelmente no desenvolvimento das plantas (BRASIL, 2011). Em comparação com os produtos químicos, os inoculantes apresentam as seguintes vantagens: aumento do crescimento e da produtividade das culturas pela disponibilidade de nutrientes; protege as plantas contra patógenos do solo; promove a melhoria na qualidade do solo; redução à poluição ambiental; são eficazes em pequenas quantidades; além de proporcionar uma maior economia ao agricultor, uma vez que os fertilizantes nitrogenados podem chegar a participar com até 40% dos custos de produção (MC LAUGHLIN et al., 2000; HUNGRIA; VARGAS, 2000). Além disso, o baixo custo dos inoculantes cria também condições para que agricultores familiares e/ou de baixa renda utilizem esta tecnologia (BERG, 2009; BRAHMAPRAKASH; SAHU, 2012).

O sucesso da tecnologia de inoculação de BPCVs depende de dois fatores: da estirpe microbiana e da formulação do inoculante (BRAHMAPRAKASH; SAHU, 2012). A determinação das estirpes recomendadas para a produção de inoculantes é complexa, pois deve considerar fatores como: a eficiência com as cultivares de interesse, capacidade de competir com os organismos nativos do solo, apresentar tolerância às limitações ambientais, apresentar fermentação adequada na indústria e, principalmente, ter a capacidade de se adaptar aos solos, sem nenhum prejuízo à comunidade microbiana natural do mesmo (HUNGRIA et al., 2005; HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007; HERRMANN; LESUEUR, 2013). O passo seguinte é a elaboração de uma formulação de inoculante para a cultura-alvo. A formulação consiste de um veículo que deve proporcionar um ambiente adequado, incorporado à proteção física, que permita

Escritório de Propriedade Intelectual

uma alta densidade de células viáveis no produto até sua utilização a campo. Além disso, qualquer formulação deve ser estável durante a produção, armazenamento e transporte até o agricultor. Para o desenvolvimento de uma formulação, deve-se levar em conta também a facilidade no manuseio e na aplicação do produto a campo, tendo em vista as limitações dos produtores agrícolas (BASHAN, 1998; BASHAN et al., 2013; HERRMANN; LESUEUR, 2013).

O maior problema enfrentado nas formulações de inoculantes se refere à sobrevivência dos microrganismos durante o processo de armazenamento e transporte do produto, quando mais de 90% das células viáveis inicialmente incorporadas ao veículo podem senescer e perder sua viabilidade. A sobrevivência da bactéria pode ser afetada por diversos fatores como a composição nutricional do meio de cultura e as condições de cultivo para o crescimento da estirpe a ser utilizada nos inoculantes, o estado fisiológico das bactérias; o tipo de veículo utilizado; a umidade e temperatura de armazenamento (BASHAN et al., 2013). A capacidade de colonização e sobrevivência de bactérias benéficas em associação aos vegetais decorrente de seu uso como insumo agrícola é denominada de rizocompetência, sendo raramente estudada. A rizocompetência envolve fatores bioquímicos que são determinantes na manutenção ou no declínio progressivo da densidade populacional dos microrganismos introduzidos no ambiente agrícola, e podem levar ao insucesso na promoção do crescimento vegetal (KIM et al., 1997; BASHAN, 1998; O'CALLAGHAN et al., 2001; STRIGUL; KRAVCHENKO, 2006). O desenvolvimento de formulações inoculantes deve necessariamente estar fundamentado em estudos sobre fisiologia de microrganismos, desenvolvimento e compatibilidade de materiais, e estratégias de veiculação de células. Os requerimentos nutricionais que levam cada estirpe de BPCV a um estado fisiológico de alta rizocompetência não apresentam uma característica universal (MALUSÁ et al., 2012). No entanto, as características celulares e fisiológicas que indicam essa rizocompetência, mesmo que pouco exploradas pela literatura, podem se apresentar comuns entre diferentes espécies microbianas (BASHAN; DE-BASHAN, 2005; MARASCO et al., 2012).

Diferentes substâncias possuem influência quanto ao comportamento e sobrevivência das células microbianas em formulações inoculantes agrícolas (KACL et al., 2005; SARMA et al., 2013; TRUJILLO-ROLDÁN et al., 2013). Além da influência dos componentes do meio de cultura sobre o crescimento e produção de biomassa por bactérias, as condições de cultivo (temperatura, aeração, tempo de cultivo) também

Escritório de Propriedade Intelectual

possuem importância sobre a qualidade do inoculante produzido. Muitas das substâncias presentes na formulação do meio de cultura serão utilizadas pelas estirpes como base para a biossíntese de biomoléculas de extrema importância para a qualidade dos inoculantes produzidos, como exopolissacarídeos (EPS), lipopolissacarídeos (LPS) e polihidroxialcanoatos (PHA) (OKON; ITZIGSOHN, 1992; BURDMAN et al., 2000; KADOURI; JURKEVITCH; OKON, 2003; BAHAT-SAMET; CASTRO-SOWINSKI; OKON, 2004). Estes polímeros possuem grande importância para desenvolvimento de formulações inoculantes de alta qualidade, atuando como fator de proteção das células microbianas contra a dissecação, facilitando sua adesão a superfícies, e melhorando a viabilidade e rizocompetência das formulações (KONNOVA et al., 2001; HUNGRIA et al., 2005; MALUSÁ et al., 2012). O tempo de cultivo é determinante para a quantidade de moléculas de reserva (polihidroxibutirato (PHB)) armazenada pelas células bacterianas (KEFALOGIANNI; AGGELIS, 2002), como também para a qualidade e concentração de moléculas de sinalização (fitormônios, lipoquito-oligossacarídeos) presentes nos meios de cultivo (DUFRENE; ROUXHET, 1996; PATTEN et al., 2013). A presença destas biomoléculas na formulação pode servir como parâmetro para a presença de biomassa celular com alta qualidade fisiológica e alta rizocompetência.

Bashan et al. (2013) relatam que a literatura científica está repleta de estirpes com alto potencial biotecnológico. No entanto, estas não aparecem no mercado comercial possivelmente devido à formulação inapropriada. Assim, um dos maiores desafios na atualidade é desenvolver uma formulação de inoculante que seja capaz de manter uma alta população do microrganismo para o uso sob condições de campo (HERRMANN; LESUEUR, 2013).

Neste contexto, o desenvolvimento de formulações inoculantes para a veiculação de BPCVs que favoreçam a sobrevivência dos microrganismos em elevada densidade sob condições de campo, e apresentem um tempo de armazenamento prolongado e proteção contra os fatores deletérios do solo, podem aumentar a eficiência desta tecnologia em cultivos comerciais (BASHAN et al., 1998).

5.2. Descreva as conhecidas soluções já existentes ao problema ou desafio, seus limites e deficiências: Historicamente, as formulações inoculantes desenvolvidas para BPCVs nunca receberam destaque nas reuniões que definem as recomendações técnicas para culturas não-leguminosas. Contudo, incrementos de produtividade e de acúmulo de nutrientes em plantas que receberam inoculação com

Escritório de Propriedade Intelectual

BPCVs são vastamente relatados pela literatura (OLIVEIRA et al., 2008; ADESEMOYE et al., 2008; MIRSHEKARI; KOUCHEBAGH, 2013; PICCININ et al., 2013). Apesar dos resultados apresentados, o comércio de inoculantes para culturas não-leguminosas no Brasil ainda é pequeno, representando menos de 5% do mercado nacional, comercializados preferencialmente na forma de inoculantes líquidos. Além do ganho econômico direto, o uso de inoculantes contendo BPCVs pode tornar-se uma alternativa viável para reduzir a poluição ambiental relacionada ao uso indiscriminado de adubos nitrogenados.

O alcance da eficiência da inoculação com BPCVs depende em grande parte da qualidade das formulações inoculantes existentes no mercado, que devem assegurar conformidade com a legislação específica do MAPA (BRASIL, 2011). Essa legislação determina um número mínimo de células viáveis de 1×10^8 (inoculantes para gramíneas) ou 1×10^9 (Inoculantes para leguminosas) células por grama ou mililitro de formulação por pelo menos 6 meses após a fabricação, além de ausência de quaisquer microrganismos contaminantes em populações superiores a 1×10^5 células por grama ou mililitro de formulação. Entretanto, a sobrevivência de bactérias em formulações inoculantes líquidas ainda é um fator limitante para a expansão do uso da tecnologia de inoculação de plantas não-leguminosas com BPCVs. A maioria dos meios de cultura e formulações inoculantes disponíveis comercialmente são de propriedade da indústria e tratadas como segredo industrial, e a disponibilidade de informação científica sobre o tema é restrita e fragmentada (XAVIER et al., 2004).

Diferentes substâncias possuem influência quanto ao comportamento e sobrevivência das células microbianas em formulações inoculantes agrícolas (KACL et al., 2005; SARMA et al., 2013; TRUJILLO-ROLDÁN et al., 2013). Além da influência dos componentes do meio de cultura sobre o crescimento e produção de biomassa por bactérias, as condições de cultivo (temperatura, aeração, tempo de cultivo) também possuem importância sobre a qualidade do inoculante produzido. Muitas das substâncias presentes na formulação do meio de cultura serão utilizadas pelas estirpes como base para a biossíntese de biomoléculas de extrema importância para a qualidade dos inoculantes produzidos, como exopolissacarídeos, lipopolissacarídeos e polihidroalcanoatos (OKON; ITZIGSOHN, 1992; BURDMAN et al., 2000; KADOURI; JURKEVITCH; OKON, 2003; BAHAT-SAMET; CASTRO-SOWINSKI; OKON, 2004). Estes polímeros possuem grande importância para desenvolvimento de formulações

Escritório de Propriedade Intelectual

inoculantes de alta qualidade, atuando como fator de proteção das células microbianas contra a dissecação, facilitando sua adesão a superfícies, e melhorando a viabilidade e rizocompetência das formulações (KONNOVA et al., 2001; HUNGRIA et al., 2005; MALUSÁ et al., 2012). O tempo de cultivo é determinante para a quantidade de moléculas de reserva (polihidroxibutirato) armazenada pelas células bacterianas (KEFALOGIANNI; AGGELIS, 2002), como também para a qualidade e concentração de moléculas de sinalização (fitormônios, lipoquitos-oligosacarídeos) presentes nos meios de cultivo (DUFRENE; ROUXHET, 1996; PATTEN et al., 2013). A presença destas biomoléculas na formulação pode servir como parâmetro para a presença de biomassa celular com alta qualidade fisiológica e alta rizocompetência.

5.3. Descreva como sua invenção supera estes limites e deficiências, destacando suas vantagens e ganhos: Diversas BPCVs utilizadas na produção de inoculante, apresentam mecanismos fisiológicos eficazes que podem auxiliar na manutenção da viabilidade celular durante condições estressantes para a bactéria, podendo aumentar a eficiência da tecnologia de inoculação. Dentre esses mecanismos estão a produção de biopolímeros como exopolissacarídeos e polihidroxibutirado, agregação celular, e a formação de cisto (BAHAT-SAMET; CASTRO-SOWINSKI; OKON, 2004; BURDMAN et al., 2000; FIBACH-PALDI; BURDMAN; OKON, 2012; JOE et al., 2009; KADOURI; JURKEVITCH; OKON, 2003; KONNOVA et al., 2001; OKON; ITZIGSOHN, 1992; SADASIVAN; NEYRA, 1985, 1987).

A capacidade de produção de exopolissacarídeos é um fenômeno bastante comum entre as bactérias que habitam o solo (PRIETO et al., 2011). Esta classe de biomoléculas compreende uma grande diversidade de biopolímeros extracelulares produzidos por microrganismos, em geral classificados como polissacarídeos capsulares (CPSs) e polissacarídeos dissociados da célula bacteriana (PSs) (SKVORTSOV; IGNATOV, 1998). Em *Azospirillum*, a produção de polissacarídeos extracelulares parece estar relacionada com a capacidade de adesão ao sistema radicular (BURDMAN et al., 2000), capacidade de agregação celular e floculação (JOE et al., 2012), e a formação de estruturas de resistência (SADASIVAN; NEYRA, 1985; TRUJILLO-ROLDÁN et al., 2013).

A produção de EPS por *A. brasilense* tem grande relevância para o desenvolvimento de novas formulações de inoculantes. Isso porque, o polímero exerce um importante papel na proteção das células microbianas contra a dessecação, e auxiliam na adesão das bactérias às sementes durante o processo de inoculação

Escritório de Propriedade Intelectual

(DROGUE et al., 2012; KONNOVA et al., 2001). Em adição, a presença de EPS pode influenciar positivamente a sobrevivência das células em condições desfavoráveis como as encontradas no ambiente de cultivo agrícola, atuar na proteção da enzima nitrogenase sob alta concentração de oxigênio e participar dos mecanismos bioquímicos envolvidos na interação planta – bactéria (BAHAT-SAMET; CASTRO-SOWINSKI; OKON, 2004; KEFALOGIANNI; AGGELIS, 2002).

O biopolímero polihidroxibutirato é conhecido como um material de armazenamento intracelular, sintetizado por muitos microrganismos, incluindo as bactérias do gênero *Azospirillum*. O acúmulo, degradação e utilização de PHB por bactérias sob condições de estresse constituem mecanismos que podem favorecer o estabelecimento, proliferação, sobrevivência e competição dos organismos, especialmente em ambientes competitivos em que fontes de carbono e de energia são limitantes, tais como os encontrados no solo (OKON; ITZIGSOHN, 1992). Diversos trabalhos já comprovaram que células ricas em PHB resistem a condições de estresse (KADOURI; JURKEVITCH; OKON, 2003; OKON; ITZIGSOHN, 1992; RATCLIFF; KADAM; DENISON, 2008; SADASIVAN; NEYRA, 1987). Kadouri, Jurkevitch e Okon (2003) observaram que células de *Azospirillum brasilense* contendo PHB apresentaram maior resistência a alta temperatura, exposição a peróxido de hidrogênio, exposição a radiação ultravioleta (UV), dessecação, e estresse osmótico. Estes mesmos autores avaliando inoculantes armazenados em condições sub-ótimas, observaram uma queda na sobrevivência da estirpe *Azospirillum basilense* phbC (deficiente na produção de PHB) comparada com a estirpe Sp7 (produtora de PHB). Os autores concluíram que a produção de PHB é criticamente importante para melhorar o tempo de prateleira, eficiência e confiabilidade de inoculantes comerciais.

A produção de exopolissacarídeo e polihidroxibutirato durante o crescimento bacteriano é influenciada por fatores como: a composição do meio de cultura, concentração dos nutrientes no meio e as condições de cultivo (BAHAT-SAMET; CASTRO-SOWINSKI; OKON, 2004; BURMAN et al., 2000; KADOURI; JURKEVITCH; OKON, 2003). O desenvolvimento de uma formulação de meio de cultura que proporcione a produção desses metabolitos por BPCVs levará ao desenvolvimento de inoculantes com elevada eficiência agrônômica, pela melhoria da sobrevivência da bactéria no produto ou após sua aplicação em condições de campo.

Escritório de Propriedade Intelectual

6. DESCRIÇÃO DETALHADA

6.1. Descreva detalhadamente a invenção de forma que um técnico ou pessoa com conhecimento técnico no assunto consiga reproduzi-la:

A formulação desenvolvida consiste de fonte de carbono, fonte de nitrogênio, aditivos poliméricos (polivinilpirrolidona e goma xantana), e suplementos minerais ($MgSO_4$, NH_4NO_3 , Fe-EDTA), conforme o Quadro 1. O microrganismo utilizado foi a estirpe Ab-V5 de *Azospirillum brasilense*, registrada no MAPA para uso como inoculante nas culturas de milho, trigo e arroz (BRASIL, 2011). Essa bactéria foi utilizada como estirpe referência, sendo que a formulação desenvolvida não se limita, entretanto a formulação se adéqua ao cultivo de diferentes estirpes de BPCVs.

Quadro 1 Composição química da formulação de meio de cultura MCA4 para produção de biomassa de *Azospirillum brasilense* com elevada densidade de células e rizocompetência (elevada concentração de biopolímeros).

REAGENTES	Quantidade por litro de meio de cultura
Sacarose	50 g
Extrato de Levedura	50 g
Glicerol	100 g
K_2HPO_4	6,0 g
NH_4NO_3	1,5 g
KH_2PO_4	4,0 g
$MgSO_4$	1,0 g
NaCl	0,1 g
Goma xantana ($C_{35}H_{49}O_{29}$)	1,0 g
Polinilpirrolidona (PVP)	1,0 g
Fe-EDTA (sol. 0,5 M)	2,0 mL
Solução de micronutrientes* (mL/L)	5,0 mL
Composição Solução de Micronutrientes	
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	1,00 g
$MnSO_4 \cdot H_2O$	1,18 g
H_3BO_3	1,40 g
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,04 g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	1,20 g

*Conforme Dobereiner et al. (1995).

Escritório de Propriedade Intelectual

Para a elaboração da formulação, inicialmente faz-se uma solução contendo goma xantana (1 g), glicerol (100 g) e água destilada (600 mL), sob agitação contínua e aquecimento a 70°C em uma placa aquecedora com agitador magnético mantendo-se a agitação por 20 min ou até a completa homogeneização das substâncias. Esta solução é adicionada do restante dos componentes (sacarose, extrato de levedura, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , NH_4NO_3 , $MgSO_4$, NaCl, Polivinilpirrolidona, Fe-EDTA, Solução de micronutrientes) previamente diluídos em 200 mL água destilada sob temperatura ambiente. Em seguida, é feito o ajuste do volume do meio de cultura para 1000 mL e do pH para 6,8. Após o ajuste do pH e volume, o meio de cultura é submetido à esterilização em autoclave durante 15 minutos, à temperatura de 121° C e pressão de 1 atm.

O cultivo do microrganismo promotor de crescimento vegetal inicia-se a partir de um pré-inóculo realizado em meio de cultura de crescimento rápido, como por exemplo, o meio líquido de Dygs (RODRIGUES NETO et al., 1986). O pré inóculo é realizado pelo período de 12 h sob temperatura de 28°C e agitação orbital de 180 rpm, ou até que a cultura alcance o estágio de crescimento exponencial. Após este período de crescimento, a densidade de células no cultivo é determinada e ajustada para uma concentração de 1×10^6 células por mililitro, sendo inoculados 10 mL do pré-inóculo por litro de meio de cultura MCA4 (densidade inicial de 1×10^4 células/mL de meio de cultura MCA4). As condições de cultivo estabelecidas foram: agitação a 180 rpm, temperatura de 28°C, e 72 h de cultivo.

A cinética de crescimento da estirpe Ab-V5 na formulação foi avaliada através da contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) pelo método da gota (MILES e MISRA, 1938). Foram coletadas alíquotas de 1,0 mL da suspensão bacteriana nas primeiras 6 e 12 h após a inoculação, e posteriormente em intervalos de 12 h até 10 dias de cultivo. Os resultados foram expressos como número de unidades formadoras de colônia por mL de cultivo ($UFC \cdot mL^{-1}$).

A concentração do biopolímero polihidroxibutirato foi determinada a partir da biomassa celular. Para obtenção de biomassa, foram coletados 10 mL do cultivo 12 h após a inoculação, e posteriormente em intervalos de 24 h até 10 dias de cultivo. Estas alíquotas foram centrifugadas a 9.956 g por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e a biomassa presente na fração precipitada foi lavada duas vezes com 5 mL de solução salina (0,85%), seguida de centrifugação e descarte do sobrenadante. Em seguida, as amostras foram secas a 80 °C por 48 h, pesadas para determinar a produção

Escritório de Propriedade Intelectual

de biomassa, e utilizadas para extração e quantificação de polihidroxibutirato. Para extração de PHB, a biomassa seca de células foi ressuspensa em 12 mL de uma solução de hipoclorito de sódio 5,25 %, e a mistura foi incubada por 2 h a 40 °C. Decorrido o período de digestão celular, a mistura foi centrifugada a 3.910 por 15 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi descartado. O PHB presente na fração precipitada foi lavado com água (10 mL, agitação manual e centrifugação a 3.910 g por 15 minutos a 4 °C), em seguida com etanol (10 mL, agitação manual e centrifugação a 3.910 g por 15 minutos a 4 °C), e posteriormente foi seco em estufa a 70 °C. O material seco contendo o biopolímero foi digerido em 1 ml de ácido sulfúrico concentrado a 90 °C durante 30 minutos. A solução foi resfriada, e a concentração de PHB foi determinada por absorvância em espectrofotômetro a 235 nm, utilizando ácido sulfúrico para calibração do aparelho (branco). Os resultados foram expressos como porcentagem de PHB por grama de biomassa celular (%).

Para determinar a concentração de exopolissacarídeos produzidos pelo microrganismo, foram tomadas alíquotas de 10 mL do cultivo após 72 h de incubação. Essas alíquotas foram centrifugadas a 9.956 g por 15 minutos a 4 °C para precipitação da biomassa celular e obtenção do extrato livre de células (ELC). Ao volume de ELC obtido como descrito (aproximadamente 10 mL) foi adicionado 30 mL de etanol absoluto gelado, agitando-se vigorosamente a mistura. Em seguida, a solução foi colocada em freezer -20 °C por um período de 24 h, seguindo-se uma nova centrifugação (9000 rpm, 4 °C por 15 min) e descarte do sobrenadante. O EPS precipitado foi solubilizado em 5 mL de água destilada e submetido à diálise exaustiva contra água destilada em um volume de 4000 mL sob temperatura de 4 °C por 3 dias consecutivos (MENESES et al., 2009). Os resultados foram expressos como massa de EPS em gramas, por litro de meio de cultura (g.L^{-1}).

7. DESENHOS E ESQUEMAS

7.1 Havendo desenhos e esquema que auxiliem na interpretação da invenção anexe-os abaixo, com comentários e explicações para cada um dele:



Escritório de Propriedade Intelectual

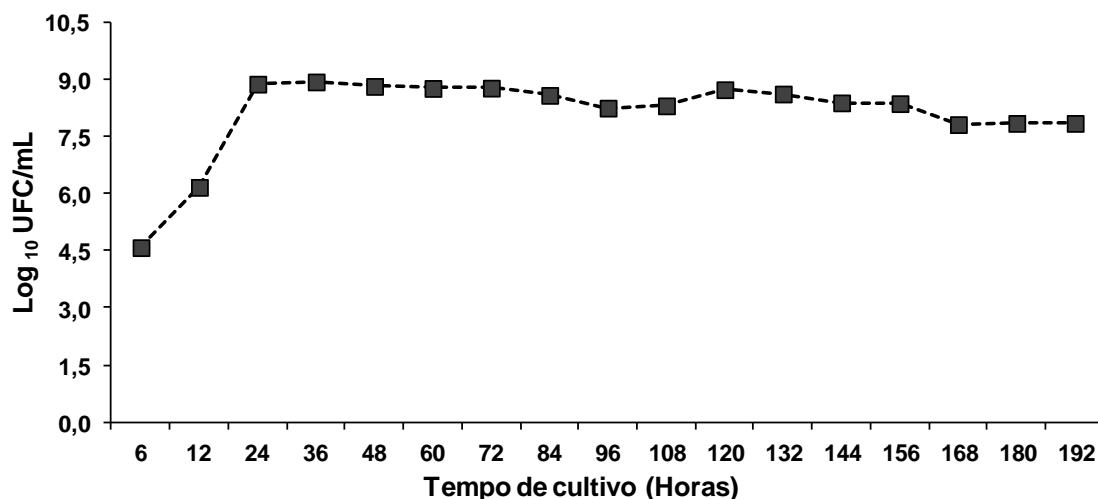


Figura 1. Cinética de crescimento de *A. brasilense* Ab-V5 em meio de cultura MCA4. Os valores de contagens de unidades formadoras de colônias obtidas foram convertidos em escala logarítmica.

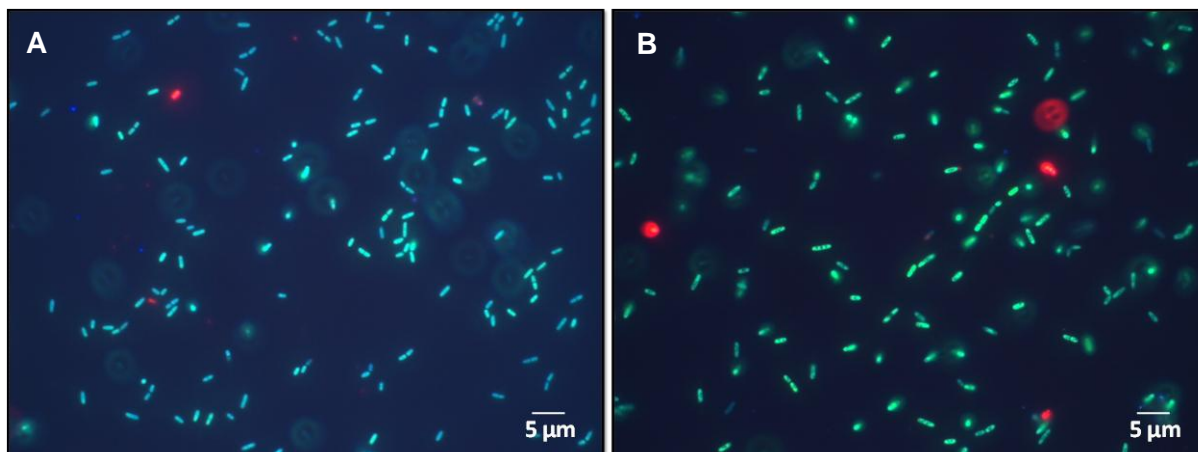


Figura 2. Micrografias ópticas de epifluorescência dos cultivos de *Azospirillum brasilense* Ab-V5 em meio de cultura MCA4. Células coradas com o kit LIVE/DEAD BacLight L-13152 para visualização de células com a membrana citoplasmática intacta (células vivas, em verde) e células com a membrana citoplasmática danificada (células mortas, em vermelho), após (A) 36 h de cultivo; (B) 72 h de cultivo.



Escritório de Propriedade Intelectual

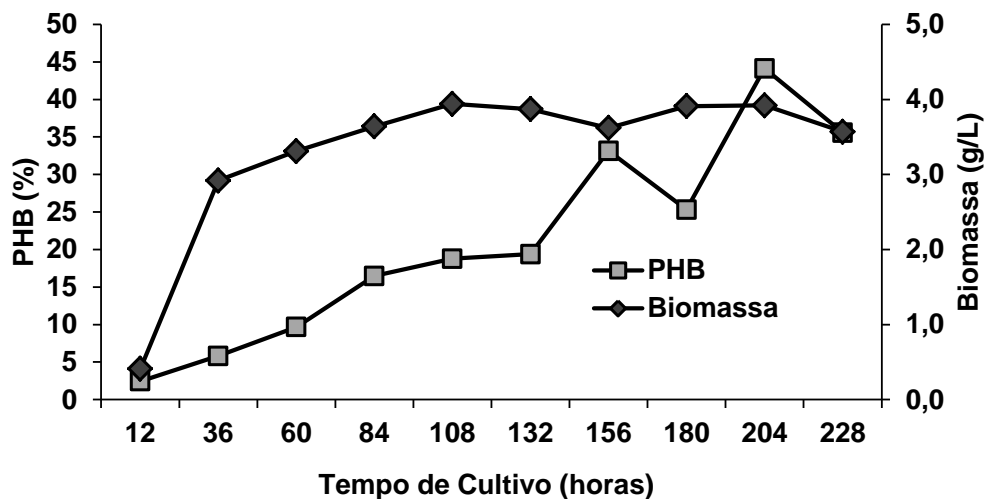


Figura 3. Cinética de produção de biomassa e acúmulo intracelular de PHB (% do peso da biomassa) por *A. brasilense* Ab-V5 em meio de cultura MCA4.

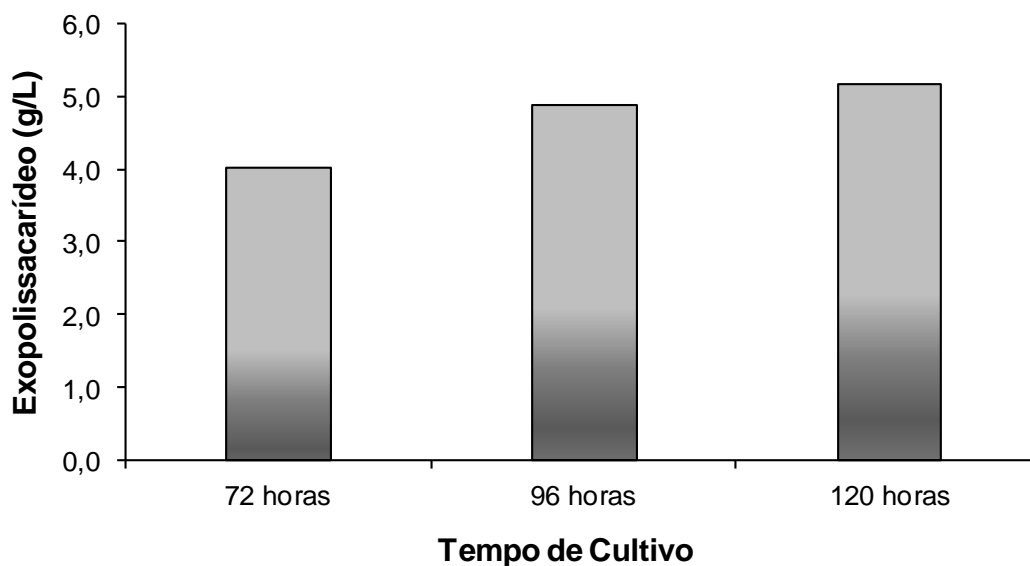


Figura 5. Produção de Exopolissacarídeos (EPS) por *A. brasilense* Ab-V5 durante o cultivo em meio de cultura MCA4.



Escritório de Propriedade Intelectual

8.1. INVENTOR 1
Nome completo: André Luiz Martinez de Oliveira
Depto. da UEL onde atua: Departamento de Bioquímica e Biotecnologia
Endereço residencial completo: Rua Caracas 377, apto. 403, Bairro Santa Rosa, CEP 86050-030, Londrina, Paraná
Tel: 43 3328 9101 e-mail: almoliva@uel.br
Atividade na UEL: Professor Adjunto
Percentual da participação na invenção: 34 Tempo de participação: 24 meses

8.2. INVENTOR 2
Nome completo: Karina Maria Lima Milani
Depto. da UEL onde atua: Departamento de Bioquímica e Biotecnologia
Endereço residencial completo: Rua Jose Santa Ella, número 123, CEP 86065-825, Jardim Delta, Londrina, Paraná.
Tel: 43 3327 6846 e-mail: milanibio@gmail.com
Atividade na UEL: Estudante de Mestrado em Biotecnologia
Percentual da participação na invenção: 33 Tempo de participação: 24 meses

8.2. INVENTOR 3
Nome completo: Odair Pais dos Santos
Depto. da UEL onde atua: Departamento de Bioquímica e Biotecnologia
Endereço residencial completo: Rua Jose Santa Ella, número 123, CEP 86065-825, Jardim Delta, Londrina, Paraná.
Tel: 43 9679 6630 e-mail: odairjap@gmail.com
Atividade na UEL: Estudante de Mestrado em Biotecnologia
Percentual da participação na invenção: 33 Tempo de participação: 24 meses

8.2. INVENTOR 4
Nome completo: Mayara Barbosa
Depto. da UEL onde atua: Departamento de Bioquímica e Biotecnologia
Endereço residencial completo: Rua Rubens Avila, número 150, bloco I, apartamento 13, CEP 860556-90, Alto da Colina, Londrina, Paraná.

Escritório de Propriedade Intelectual

Tel: 43 9987 1248	e-mail: mayarabarbosa-1@hotmail.com
Atividade na UEL: Estudante de Mestrado em Biotecnologia	
Percentual da participação na invenção: 33 Tempo de participação: 24 meses	

(anexar item 8, caso haja outros inventores)

9. CONCEPÇÃO DA INVENÇÃO	
9.1. Quando a invenção foi concebida? 2014	
9.2. Ela já foi descrita ou documentada?	Sim <input checked="" type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
9.3. Se sim, onde e de que forma (escrita, oral) foi realizada a primeira descrição? Escrita, como dissertação de mestrado em Biotecnologia.	
9.4. A invenção está finalizada e com protótipo?	Sim <input checked="" type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>

10. DIVULGAÇÃO EXTERNA DA INVENÇÃO	
10.1. Houve alguma divulgação pública da invenção?	Sim <input type="checkbox"/> Não <input checked="" type="checkbox"/>
10.2. Se sim, quando e como?	
10.3. Neste caso, foi assinado um acordo de sigilo ou de não-divulgação?	Sim <input type="checkbox"/> Não <input checked="" type="checkbox"/>
Obs: Se possível, anexe uma cópia da divulgação realizada	
11. DIVULGAÇÃO INTERNA DA INVENÇÃO	
11.1. Houve alguma divulgação interna da invenção, por exemplo, para alunos, funcionários, docentes, palestra, eventos?	Sim <input type="checkbox"/> Não <input checked="" type="checkbox"/>
11.2. Se sim, a divulgação foi tecnicamente detalhada?	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
Obs: Se possível, anexe uma cópia da divulgação realizada.	

12. PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS E TÉCNICAS	
12.1. Foram publicados artigos, no quais um dos inventores aparece como autor, contendo informações suficientes para que uma pessoa com conhecimentos na área possa reproduzir a invenção?	
	Sim <input type="checkbox"/> Não <input checked="" type="checkbox"/>
Obs: Se sim, anexe cópias dos artigos.	

Escritório de Propriedade Intelectual

13. COMUNICAÇÕES

13.1. Foram realizadas comunicações orais (palestras, aulas), no qual um dos inventores aparece com como autor, contendo informações suficientes para que uma pessoa com conhecimentos na área possa reproduzir a invenção?

Sim Não

Obs: Se sim, anexe cópias das comunicações.

13.2. Foram realizados comunicados da invenção à imprensa, ou a jornais internos da UEL, de empresas, de agências de fomento ou outro instrumento de divulgação? Não

Obs: Se sim, anexe cópias dos comunicados ou comentários sobre eles

14. TRANSFERÊNCIA DE TECNOLOGIA (APLICÁVEL ÀS INVENÇÕES DA UEL)

14.1. Se souber, faça uma lista de possíveis empresas nacionais e internacionais que poderiam vir a se interessar pela invenção, após ter sido devidamente protegida: Empresas de comércio e produção de inoculantes; as principais fazem parte da associação nacional dos produtores e importadores de inoculantes – ANPII (www.anpii.org.br).

15. DIVULGAÇÕES FORA DA EMPRESA (APLICÁVEL ÀS EMPRESAS)

15.1. Houve alguma divulgação da invenção fora da empresa, nas formas escrita, oral ou expositiva?

Sim Não

Obs.: Se sim, anexe cópias ou forneça detalhes das mesmas.

15.2. As divulgações foram realizadas sob algum instrumento legal de sigilo ou confidencialidade?

Sim Não

16. PATENTES RELACIONADAS

16.1 Se tiver disponível, liste quaisquer publicações ou patentes que descrevam invenções similares a esta, para a qual está sendo solicitada a propriedade: Processos constantes no INPI relacionados ao desenvolvimento de formulações inoculantes para uso agrícola: C10506338-8; PI 0519258-7, PI0506338-8, PI0404749-4, PI0312543-2, PI0301447-9, PI0103922-9, PI0211920-0, PI0703931-0, US006606822B2, US20020050096A1, US006855524B1, US20020035249A1, US20050136517A1, EP1176209A1, PI0501139-6, PI0405622-1, PI0501844-7.



Escritório de Propriedade Intelectual

17. Declaração

Declaro que as informações acima prestadas são verdadeiras e de minha inteira responsabilidade. Concordo que este é um pedido de proteção intelectual e industrial e isento a UEL, a AINTEC e todo seu pessoal de toda e qualquer responsabilidade, direta ou indireta, se a referida proteção não for concedida integral ou parcialmente pelo INPI ou por outro órgão a que for submetido.

INVENTOR 1

Nome: André Luiz Martinez de Oliveira
CPF: 443.517.801-00

INVENTOR 2

Nome: Karina Maria Lima Milani
CPF: 057.042.769-03

INVENTOR 3

Nome: Odair José Andrade Pais dos Santos
CPF: 007.593.129-07



Escritório de Propriedade Intelectual

INVENTOR 4

Nome: Mayara Barbosa Silva

CPF: 039.952.921-78

Londrina, de maio de 2014.

REFERÊNCIAS

ADESEMOYE, A. O.; TOBERT, H. A.; KLOEPPER, J. W. Enhanced plant nutrient use efficiency with PGPR and AMF in an integrated nutrient management system. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 54, n. 10, p. 876–886, 2008.

ANPII - **Associação Nacional de Produtores e Importadores de Inoculantes**. Disponível em: <<http://www.anpii.org.br/homesite/default.asp>>. Acesso em: 28 fev. 2012.

ANDA – **Associação Nacional para Difusão de Adubos**. Disponível em <<http://www.anda.org.br/estatisticas.aspx>>. Acesso em: 19 jan. 2014.

BAHAT-SAMET, E.; CASTRO-SOWINSKI, S.; OKON, Y. Arabinose content of extracellular polysaccharide plays a role in cell aggregation of *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 237, n. 2, p. 195-203, 15 ago. 2004.

BASHAN, Y. INOCULANTS OF PLANT GROWTH-PROMOTING BACTERIA FOR USE IN AGRICULTURE. **Biotechnology Advances**, v. 16, n. 4, p. 729-770, 1998.

BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E. Fresh-weight measurements of roots provide inaccurate estimates of the effects of plant growth-promoting bacteria on root growth: a critical examination. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 37, n. 10, p. 1795-1804, out. 2005.

BASHAN, Y. et al. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). **Plant and Soil**, v. 1886, 19 nov. 2013.

BERG, G. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.84, p. 11-18, 2009.

BRAHMAPRAKASH, G. P.; SAHU, P. K. Biofertilizers for Sustainability. **Journal of the Indian Institute of Science**, v. 92, p. 26, 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 13, de 24 de março de 2011. Aprova as normas sobre especificações, garantias, registro, embalagem e rotulagem dos inoculantes destinados à agricultura, bem como as relações dos micro-organismos autorizados e recomendados para produção de inoculantes no Brasil. **Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil**, 25 mar. 2011.

BURDMAN, S. JURKEVITCH, E.; SORIA-DÍAZ, M. E.; GIL SERRANO, A. M.; OKON, Y. Extracellular polysaccharide composition of *Azospirillum brasilense* and its relation with cell aggregation. **FEMS Microbiology Letters**, v. 189, n. 2, p. 259-64, 15 ago. 2000.

DOBDELARE, S.; VANDERLEYDERN, J.; OKON, Y. Plant-growth promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, 22:107-149, 2003.

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

DUFRENE, Y. F.; ROUXHET, P. G.; Surface composition, surface properties and adhesiveness of *Azospirillum brasilense* – variation during grow. **Canadian Journal Microbiology**, v.42, p. 548-556, 1996.

DROGUE, B. DORÉ, H.; BORLAND, S.; WISNIEWSKI-DYÉ, F.; PRIGENT-COMBARET, C. Which specificity in cooperation between phytostimulating rhizobacteria and plants? **Research in Microbiology**, v. 163, n. 8, p. 500-10, 2012.

FERRAZ, JOSÉ MARIA GUSMAN. **A insustentabilidade da revolução verde**. In: Informativo Meio Ambiente e Agricultura, Jaguariúna, ano VII, n. 26, abr/mai/jun 1999. Disponível em http://www.cnpma.embrapa.br/informativo/mostra_informativo.php3?id=105; acesso em junho de 2012.

FIBACH-PALDI, S.; BURDMAN, S.; OKON, Y. Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 326, n. 2, p. 99-108, jan. 2012.

HERRMANN, L.; LESUEUR, D. Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 20, p. 8859-73, out. 2013.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, v. 65, p. 151-164, 2000.

HUNGRIA, M.; LOUREIRO, F. M.; MENDES, I. C.; CAMPO, R. J.; GRAHAM, P. H. Inoculant preparation, production and application. In: WERNER, D.; NEWTON, W. E (Ed.) **Nitrogen Fixation Agriculture, Forestry, Ecology and the Environment**. Dordrecht, Amsterdam: Springer, 2005. 347p. p. 224-253.

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, 2007. 80p. (Embrapa Soja. Documentos, 283).

JOE, M. M. KARTHIKEYAN, B.; CHAUHAN, P. S.; SHAGOL, C.; ISLAM, M. R.; DEIVEEKASUNDARAM, M.; SA, T. Survival of *Azospirillum brasilense* flocculated cells in alginate and its inoculation effect on growth and yield of maize under water deficit conditions. **European Journal of Soil Biology**, v. 50, p. 198-206, maio. 2012.

JOE, M. M. JALEEL, C. A.; SIVAKUMAR, P. K.; ZHAO, C.; KARTHIKEYAN, B. Co-aggregation in *Azospirillum brasilense* MTCC-125 with other PGPR strains: Effect

of physical and chemical factors and stress endurance ability. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 40, n. 5, p. 491-499, set. 2009.

KADOURI, D.; JURKEVITCH, E.; OKON, Y. Involvement of the Reserve Material Poly- β -Hydroxybutyrate in *Azospirillum brasilense* Stress Endurance and Root Colonization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 6, p. 3244-3250, 2003.

KACL, Y.; HEYRAUD, A.; BARAKAT, M.; HEULIN, T. Isolation and identification of an EPS-producing Rhizobium strain from arid soil (Algeria): characterization of its EPS and the effect of inoculation on wheat rhizosphere soil structure. **Research Microbiology**, v. 156(4), p. 522-531, 2005.

KEFALOGIANNI, I.; AGGELIS, G. Modeling growth and biochemical activities of *Azospirillum* spp. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, n. 3, p. 352-7, mar. 2002.

KIM, D. S.; WELLER, D. M.; COOK, R. J. Population dynamics of *Bacillus* sp. L324-92R12 and *Pseudomonas fluorescens* 2-79RN10 in the rhizosphere of wheat. **Phytopathology**, v.87, p. 559-564, 1997.

KONNOVA, S. A. BRYKOVA, O. S.; SACHKOVA, O. A.; EGORENKOVA, I. V.; IGNATOV, V. V. Protective Role of the Polysaccharide-containing Capsular Components of *Azospirillum brasilense*. **Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 436-440, 2001.

MALUSÁ, E.; SAS-PASZT, L.; CIESIELSKA, J. Technologies for beneficial microorganisms inocula used as biofertilizers. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 491206, jan. 2012.

MARASCO, R.; ROLLI, E.; ETTOUMI, B.; VIGANI, G.; MAPELLI, F.; BORIN, S.; ABOU-HADID, A. F.; EL-BEHAIRY, U. A.; SORLINI, C.; CHERIF, A.; ZOCCHI, G.; DAFFONCHIO, D. A drought resistance-promoting microbiome is selected by root system under desert farming. **PloS one**, v. 7, n. 10, p. e48479, jan. 2012.

MC LAUGHLIN, N. B.; HIBA, A.; WALL, G. J.; KING, D. J. Comparison of energy inputs for inorganic fertilizer and manure based corn production. **Canadian Agricultural Engineering**, v. 2, n.1, p. 9-17, 2000.

MENESES, C. H. S. G.; SERRATO, R. V.; ROUWS, L. F. M.; ARAÚJO, J. L. S. de; VIDAL, M. S.; BALDANI, J. I. **Produção, extração e quantificação de exopolissacarídeos sintetizados por *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5t em meio de cultivo líquido**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2009. 6 p. (Embrapa Agrobiologia. Comunicado técnico, 122).

MIRSHEKARI, B.; KOUCHEBAGH, S. B. Sustainable production of new released wheat cultivars by using urea plus nitragin as a biofertilizer. **International Journal of Biosciences**, v. 3, n. 6, p. 38-44, 2013.

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.

O'CALLAGHAN, M.; GERARD, E. M.; JOHNSON, V. W. Effect of soil moisture and temperature on survival of microbial control agents. *Pasture Weeds & Pests; N. Z. Plant Protect.*, v. 54, p. 128-135, 2001.

OKON, Y.; ITZIGSOHN, R. Poly- β - 3-hydroxybutyrate metabolism in *Azospirillum brasilense* and the ecological role of PHB in the rhizosphere. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 103, p. 131-139, 1992.

OLIVEIRA, A. L. M.; STOFFELS, M.; SCHMID, M.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; HARTMANN, A. Colonization of sugarcane plantlets by mixed inoculations with diazotrophic bacteria. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, n. 1, p. 106-113, jan. 2008.

PATTEN, C. L.; BLAKNEY, A. J. C.; COULSON, T. J. D. Activity, distribution and function of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 39, p. 395-415, 2013.

PICCININ, G. G.; BRACCINI, A. L.; DAN, L. G. M.; SCAPIM, C. A.; RICCI, T. T.; BAZO, G. L. Efficiency of seed inoculation with *Azospirillum brasilense* on agronomic characteristics and yield of wheat. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 393-397, 2013.

PRIETO, P. SCHILIRÒ, E.; MALDONADO-GONZÁLEZ, M. M.; VALDERRAMA, R.; BARROSO-ALBARRANCÍN, J. B.; MERCADO-BLANCO, J. Root hairs play a key role in the endophytic colonization of olive roots by *Pseudomonas* spp. with biocontrol activity. **Microbiology Ecology**, v. 62, n. 2, p. 435-45, ago. 2011.

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, n. 3, p. 391-9, set. 2008.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JÚNIOR, V.A.; VICTOR, O. Meio simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* tipo B. **Summa Phytopatologica**, Jaboticabal, v.12, p.16,1986.

SADASIVAN, L.; NEYRA, C. A. Flocculation in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*: exopolysaccharides and cyst formation. **Journal of Bacteriology**, v. 163, n. 2, p. 716-23, ago. 1985.

SADASIVAN, L.; NEYRA, C. A. Cyst production and brown pigment formation in Aging Cultures of *Azospirillum brasilense* ATCC 29145t. **Journal of Bacteriology**, v. 169, n. 4, 1987.

SARMA, M. V. R. K.; GAUTAM, A.; KUMAR, LALIT.; SAHARAN, K.; KAPOOR, A.; SHRIVASTAVA, N.; SAHAI, V.; BISARIA, V.S.; Bioprocess strategies for mass multiplication of and metabolite synthesis by plant growth promoting pseudomonads for agronomical applications. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 9, p. 1418-1424, set. 2013.

SKVORTSOV, I. M.; IGNATOV, V. V. Extracellular polysaccharides and polysaccharide-containing biopolymers from *Azospirillum* species: properties and the

possible role in interaction with plant roots. **FEMS Microbiology Letters**, v. 165, n. 2, p. 223-9, 15 ago. 1998.

STRIGUL, N. S.; KRAVCHENKO, L. V. Mathematical modelling of PGPR inoculation into the rhizosphere. **Environmental Modelling Software**, v.21, p. 1158-1171, 2006.

TRUJILLO-ROLDÁN, M. A.; VALDEZ-CRUZ, N. A.; GONZALEZ-MONTEERRUBIO, C. F.; ACEVEDO-SÁNCHEZ, E. V.; MARTÍNEZ-SALINAS, C.; GARCÍA-CABRERA, R. I.; GAMBOA-SUASNAVART, R. A.; MARÍN-PALACIO, L. D.; VILLEGAS, J.; BLANCAS-CABRERA, A. Scale-up from shake flasks to pilot-scale production of the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense* for preparing a liquid inoculant formulation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 6 set. 2013.

XAVIER, I. J.; HOLLOWAY, G.; LEGGETT, M. 2004. Development of rhizobial inoculant formulations. Online. **Crop Management** doi:10.1094/CM-2004-0301-06-RV.