



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MARIANA SANCHES SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE NOVAS FORMULAÇÕES
LÍQUIDAS DE INOCULANTES PARA *Azospirillum*
brasiliense ESTIRPES Ab-V5 e Ab-V6**

Londrina
2017

MARIANA SANCHES SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE NOVAS FORMULAÇÕES
LÍQUIDAS DE INOCULANTES PARA *Azospirillum*
brasiliense ESTIRPES Ab-V5 e Ab-V6**

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

Orientador: Dra. Mariangela Hungria

Londrina
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Santos, Mariana.

Desenvolvimento de novas formulações líquidas de inoculantes para *Azospirillum* brasileiro Estirpes Ab-V5 e Ab-V6 / Mariana Santos. - Londrina, 2007.

85 f. : il.

Orientador: Mariangela Hungria.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2017.

Inclui bibliografia.

1. *Azospirillum* brasileiro - Tese. 2. Inoculante líquido - Tese. 3. biofilme - Tese. 4. PHB - Tese. I. Hungria, Mariangela. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

MARIANA SANCHES SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE NOVAS FORMULAÇÕES LÍQUIDAS DE
INOCULANTES PARA *Azospirillum brasilense* ESTIRPES Ab-V5 e
Ab-V6**

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

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Dra. Mariangela Hungria
EMBRAPA - Soja

Dr. Marco Antonio Nogueira
EMBRAPA - Soja

Dra. Dáfila dos Santos Lima Fagotti
EMBRAPA - Soja

Londrina, 18 de julho de 2017.

Aos meus pais, Luiz e Luzia,
ao meu irmão Murilo,
ao meu noivo Anderson,
dedico esse trabalho, fruto do apoio e carinho.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida, pela proteção e por me fortalecer diante de todas as barreiras.

À Universidade Estadual de Londrina, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pela oportunidade de crescimento profissional, científico e humano.

À Embrapa soja, pela oportunidade de realização do nosso trabalho. À Capes, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa de estudos.

À orientadora Dra Mariangela Hungria, sou grata por ter me recebido de braços abertos, ter confiado em mim, pela oportunidade e atenção, pelo carinho concedido, pelo exemplo profissional e pelos ensinamentos indispensáveis à minha formação.

Aos membros da banca, pela disponibilidade em avaliar e colaborar para com a melhoria do nosso trabalho. Aos professores do curso, pelos ensinamentos, e a todos os docentes que contribuíram para a minha formação acadêmica.

Aos colegas de laboratório que sempre estiveram prontos para ajudar de alguma maneira, e por tornarem o trabalho e a rotina mais divertidos. Me sinto privilegiada em participar dessa família. Vocês são demais! Aos amigos de longa data, Adeline, Tânia, Eliezer, Joyce, Tayenne e Graciela, pelo apoio e incentivo, por torcerem por mim.

Aos meus pais e irmão, que são a base de tudo, por acreditarem no meu sonho, por terem sido fonte de constante incentivo, por todo amor e união. Por tudo que me ensinaram e por nunca medirem esforços para que eu chegasse até aqui.

Ao meu noivo, Anderson, pelo carinho, amor e paciência nos momentos difíceis. Por sempre me incentivar e tranquilizar com palavras sábias.

Sintam-se parte importante dessa vitória. Muito Obrigada!

“Descobri como é bom chegar quando se tem paciência, e para chegar onde quer que seja, aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão. É preciso antes de qualquer coisa, querer.” (Amyr Klink)

SANTOS, Mariana Sanches. **Desenvolvimento de novas formulações líquidas de inoculantes para *Azospirillum brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6**. 2017. 85 f. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

Produtos biotecnológicos inovadores vêm sendo desenvolvidos e utilizados em práticas agrícolas como alternativas capazes de minimizar custos e reduzir impactos ambientais, mantendo e, em alguns casos, elevando os níveis de produtividade. A inoculação de sementes de trigo (*Triticum aestivum* L.) e de milho (*Zea mays* L.) com as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *Azospirillum brasilense* representa uma tecnologia que tem contribuído para a sustentabilidade agrícola, com aumentos na produtividade de grãos e redução da aplicação de fertilizantes químicos. Inoculantes líquidos são preferidos por agricultores, entretanto, a taxa de sobrevivência das bactérias em suporte líquido cai drasticamente nos primeiros meses de armazenamento, tornando necessária a realização de estudos a fim de se aumentar o tempo de vida celular nesse suporte. O objetivo deste trabalho foi desenvolver formulações líquidas de inoculante com *A. brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6, com altas concentrações celulares e que garantam a sobrevivência das estirpes por um período comercialmente viável, contendo células com qualidade fisiológica adequada. Como aditivos protetores, visando prolongar a viabilidade celular das estirpes, foram avaliados trealose, glicerol, amido comercial, CMC e PVP. Para a avaliação do crescimento celular, foi utilizado 1 mL do inóculo em Erlenmeyer contendo 100 mL de cada meio de cultura. A incubação ocorreu a 140 rpm e 28 °C por 26 horas. A concentração celular foi avaliada segundo a metodologia estabelecida pelo MAPA (Instrução normativa nº 30 de 2010) para contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC), com análise estatística pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$) para comparação entre as médias. Foram realizadas, ainda, a quantificação de polihidroxibutirato (PHB) e avaliação da produção de biofilme produzido pelas estirpes em cada nova formulação desenvolvida. Foi realizada a análise comparativa da taxa da sobrevivência celular em diferentes veículos de armazenamento. Como etapa final as formulações que apresentaram melhor desempenho foram cultivadas em um fermentador piloto. As quatro formulações avaliadas proporcionaram alta concentração celular de *A. brasilense* e a adição dos protetores utilizados influenciou positivamente na manutenção celular. Por apresentarem melhores resultados, as formulações FORM2 acrescida de amido e FORM4, acrescida de PVP, foram escolhidas para análise da produção de PHB e biofilme. Os valores de concentração intracelular de PHB variaram entre 11,4% e 42% do peso seco da biomassa. Essas duas formulações também foram favoráveis à produção de biofilme em ambas as estirpes, podendo atuar positivamente na manutenção da viabilidade celular. Quanto ao uso de diferentes materiais para armazenagem dos inoculantes líquidos, foi observado aumento do tempo de viabilidade das células quando armazenadas em sacos plásticos de polietileno. As formulações desenvolvidas foram capazes de promover alto crescimento celular das estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *A. Brasilense*, tanto em escala laboratorial, quanto em escala piloto, quando cultivadas em fermentador.

Palavras-chave: *Azospirillum brasilense*. Formulação. Inoculante. PHB. Biofilme.

SANTOS, Mariana Sanches. **Development of new liquid inoculant formulation for *Azospirillum brasilense* strains Ab-V5 and Ab-V6.** 2017. 85 p. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

Innovative biotechnological products have been developed and used in agricultural practices as alternatives capable of minimizing costs and reducing environmental impacts, maintaining, and in some cases increasing, productivity levels. The inoculation of wheat (*Triticum aestivum* L.) and maize (*Zea mays* L.) seeds with *Azospirillum brasilense* strains Ab-V5 and Ab-V6 represents a technology that has contributed to agricultural sustainability, resulting in increases in yield and decreases in the use of chemical fertilizers. Liquid inoculants are preferred by farmers; however, bacterial survival in liquid carriers drops drastically in the first few months of storage, necessitating studies in order to increase the cell shelf life in this carrier. The objective of this study was to develop liquid inoculant formulations with *A. brasilense* strains Ab-V5 and Ab-V6 with high cellular concentration and with guarantee of survival for a commercially viable period, maintaining cells with high physiological quality. Trehalose, glycerol, commercial starch, CMC (carboximetilcelulose) and PVP (polyvinylpyrrolidone) were evaluated as protective additives aiming at extending cell viability. For the evaluation of cell growth, 1 mL of the inoculum was transferred to Erlenmeyers containing 100 mL of each culture carrier. Incubation took place at 140 rpm and 28 °C for 26 h. Cellular concentration was evaluated according to the method established by MAPA (Normative Instruction No. 30 of 2010) for counting Colony Forming Units (CFU), and statistical analysis with the Tukey's test ($p \leq 0.05$) for comparison of means. Quantification of polyhydroxybutyrate (PHB) and evaluation of the biofilm production produced by the strains were carried out in each new formulation. A comparative analysis of the rate of cell survival under different storage vehicles was also carried out. As a final step the formulations that presented better performance were cultured tested in a pilot fermenter. The four formulations evaluated provided high cellular concentration of *A. brasilense*, and the addition of protectors positively influenced cell maintenance. FORM2 + P3 and FORM4 + P6 formulations showed the best performances and were then chosen for the analysis of PHB and biofilm production. The intracellular concentration values of PHB ranged from 11.4% to 42% of the biomass dry weight. These two formulations were also favorable to the biofilm production for both strains, and might act positively in the maintenance of cell viability. Regarding the use of different materials for the storage of liquid inoculants, an increase in cell viability with time was observed when stored in polyethylene plastic bags. The formulations developed were capable of promoting high cell growth of the Ab-V5 and Ab-V6 strains of *A. brasilense*, both at laboratory scale and on a pilot scale when grown in a fermenter.

Key words: *Azospirillum brasilense*. Formulation. Inoculant. PHB. Biofilm.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	– Concentração de <i>A. brasilense</i> Ab-V5 e Ab-V6 em diferentes meios de cultivo.....	43
Figura 2	– Crescimento de Ab-V5 e Ab-V6 nas formulações FORM2+P3 e FORM4+P6	57
Figura 3	– Produção de biomassa pelas estirpes durante 96 horas de cultivo em FORM2+P3 e FORM4+P6.....	58
Figura 4	– Concentração absoluta de PHB pelas estirpes durante 96 horas de cultivo em FORM2+P3 e FORM4+P6.....	58
Figura 5	– Concentração relativa intracelular de PHB pelas estirpes durante 96 horas de cultivo em FORM2+P3 e FORM4+P6.....	59
Figura 6	– Valores de absorvância para a produção de biofilme pelas estirpes Ab-V5 e Ab-V6 em meio NFb, FORM2+P3 e FORM4+P6.....	61
Figura 7	– Concentração celular e valores de pH das estirpes nas formulações FORM2+P3 e FORM4+P6	64
Figura 8	– Crescimento de <i>A. brasilense</i> (Ab-V5 e Ab-V6) nas formulações FORM2+P3 e FORM4+P6 em fermentador	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Composição do meio de Ágar Rojo Congo (RC)	36
Tabela 2	– Composição química das formulações utilizadas e do meio de cultivo NFb	37
Tabela 3	– Composição química da Solução de Micronutrientes	38
Tabela 4	– Concentração utilizada para cada protetor	39
Tabela 5	– Concentrações celulares de Ab-V5 obtidas nas formulações 1, 2, 3 e 4 acrescidas de diferentes protetores após 26 horas de cultivo.....	46
Tabela 6	– Concentrações celulares de Ab-V5 obtidas nas formulações 1, 2, 3 e 4 acrescidas de diferentes protetores após 14 dias de armazenamento	47
Tabela 7	– Concentrações celulares de Ab-V5 obtidas nas formulações 1, 2, 3 e 4 acrescidas de diferentes protetores após 24 dias de armazenamento	48
Tabela 8	– Concentrações celulares de Ab-V6 obtidas nas formulações 1, 2, 3 e 4 acrescidas de diferentes protetores após 26 horas de cultivo.....	50
Tabela 9	– Concentrações celulares de Ab-V6 obtidas nas formulações 1, 2, 3 e 4 acrescidas de diferentes protetores após 14 dias de armazenamento	51
Tabela 10	– Concentrações celulares de Ab-V6 obtidas nas formulações 1, 2, 3 e 4 acrescidas de diferentes protetores após 32 dias de armazenamento	52
Tabela 11	– Variação de pH na formulação 1.....	55
Tabela 12	– Variação de pH na formulação 2.....	55
Tabela 13	– Variação de pH na formulação 3.....	55
Tabela 14	– Variação de pH na formulação 4.....	56

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	12
2.1	OBJETIVO GERAL	12
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1	BIOTECNOLOGIA NA AGRICULTURA.....	13
3.2	BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS E PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL	15
3.2.1	Gênero <i>Azospirillum</i>	16
3.2.2	<i>Azospirillum brasilense</i>	20
3.3	INOCULANTES	23
3.3.1	Veículos de Inoculação	25
3.3.1.1	Inoculantes Turfosos.....	25
3.3.1.2	Inoculantes Líquidos	26
3.3.2	Produção Industrial de Inoculantes.....	27
3.4	ALTERNATIVAS PARA A MANUTENÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR NOS INOCULANTES	29
3.4.1	Uso de Protetores	29
3.4.2	Metabolismo Celular - Produção de Polihidroxibutirato e Formação de Biofilme	32
4	METODOLOGIA	35
4.1	<i>Azospirillum brasilense</i>	35
4.1.1	Preparo do Inóculo.....	35
4.1.2	Diluição Seriada e Contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC).....	35
4.2	DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES LÍQUIDAS DE INOCULANTES CONTENDO <i>Azospirillum brasilense</i>	37
4.2.1	Comparação do Crescimento Celular nas Formulações e em Meio NFb.....	38

4.2.2	Análise do Tempo de Viabilidade Celular Proporcionado pela Adição de Protetores	38
4.2.3	Caracterização do Crescimento de Ab-V5 e Ab-V6	39
4.2.4	Avaliação da Produção de Polihidroxibutirato (PHB)	39
4.2.5	Avaliação da Produção de Biofilme	40
4.3	INFLUÊNCIA DA EMBALAGEM NA VIABILIDADE CELULAR.....	41
4.4	CULTIVO DAS FORMULAÇÕES EM ESCALA SEMI-PILOTO	41
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
5.1	COMPARAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR NAS FORMULAÇÕES E EM MEIO NFb.....	43
5.2	TEMPO DE VIABILIDADE CELULAR PROPORCIONADO PELA ADIÇÃO DE PROTETORES.....	45
5.3	CARACTERIZAÇÃO DO CRESCIMENTO DE Ab-V5 E Ab-V6	56
5.4	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIBUTIRATO (PHB)	57
5.5	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOFILME	60
5.6	AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA CELULAR EM DIFERNTES VEÍCULOS DE ARMAZENAMENTO	63
5.7	CULTIVO DAS FORMULAÇÕES EM ESCALA SEMI-PILOTO	65
6	CONCLUSÃO.....	67
	REFERÊNCIAS	68

1 INTRODUÇÃO

Dentre os nutrientes essenciais ao crescimento e desenvolvimento das plantas, o nitrogênio (N) é um dos elementos mais importantes. Em práticas agrícolas, esse nutriente é aplicado em grandes quantidades durante o cultivo, a fim de suprir sua elevada demanda pelas culturas. Essa aplicação ocorre, principalmente, por meio de fertilizantes nitrogenados, que oferecem N facilmente assimilável pelas plantas. O uso de fertilizantes nitrogenados na agricultura apresenta desvantagens econômicas, pois encarece a produção e o Brasil ainda depende da sua importação, e ambientais, por contribuir significativamente com a poluição e contaminação de água e solo, além da emissão de gases de efeito estufa.

Devido a esses fatos, têm-se buscado o desenvolvimento de produtos biotecnológicos alternativos, visando a substituição total ou parcial de fertilizantes nitrogenados, através de práticas inovadoras que não prejudiquem o meio ambiente e que mantenham alto os níveis de produção das culturas. A inoculação de sementes com bactérias diazotróficas, presentes em inoculantes, representa uma alternativa barata e sustentável, pois contribui com N para as plantas através do processo de fixação biológica do nitrogênio (FBN) realizado por esse grupo de microrganismos. O gênero *Azospirillum* abrange um grupo de bactérias diazotróficas promotoras do crescimento vegetal que, além de fixarem nitrogênio, se destacam pela capacidade de produção de fitohormônios, que estimulam o crescimento das raízes de diversas espécies de plantas, promovendo maior absorção de nutrientes e água, favorecendo o desenvolvimento do vegetal.

No mercado brasileiro existem dois tipos principais de inoculantes: turfosos e líquidos. Por ser rica em matéria orgânica, a turfa oferece boas condições para a sobrevivência celular sob condições de estresses ambientais e também proporciona proteção física aos microrganismos. Contudo, a turfa é um recurso natural não-renovável escasso no Brasil, por isso seu uso torna a produção de inoculantes mais cara. Já os inoculantes líquidos são de fácil manuseio, facilitam a semeadura mecanizada no campo e podem ser aplicados tanto nas sementes quanto por pulverização foliar. Porém, proporcionam baixa proteção às células bacterianas, acarretando em mortalidade celular precoce.

A melhoria da qualidade dos inoculantes líquidos, com aumento do tempo de vida celular, pode ser alcançada utilizando-se diferentes polímeros em sua

composição, para atuarem como substâncias protetoras, pois podem apresentar características como capacidade de limitar a transferência de calor e elevada atividade de água, além de servirem como fonte de carbono. A manutenção da viabilidade celular também pode ser auxiliada pela produção de biopolímeros, como polihidroxibutirato (PHB) e da formação de biofilme pela própria bactéria no inoculante. Esses compostos atuam protegendo as células de estresses ambientais e servem como reserva energética.

Portanto, para se desenvolver novas formulações líquidas para inoculantes com elevada eficiência agrônômica, deve-se visar alta produção de PHB e formação de biofilme pelo microrganismo, além de fazer uso de polímeros que favoreçam a sobrevivência das bactérias no produto por longos períodos. O novo produto biotecnológico deve ser desenvolvido visando posterior produção industrial, e portanto, ser economicamente viável e de qualidade.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver formulações líquidas de inoculantes contendo *Azospirillum brasilense*, estirpes Ab-V5 e Ab-V6, de alta qualidade e que permitam maior tempo de viabilidade celular.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Testar diferentes polímeros protetores celulares em formulações líquidas e avaliar o tempo de viabilidade celular proporcionado por eles;
- Avaliar a manutenção do pH durante o período de armazenamento das formulações a fim de manter um efeito tampão;
- Avaliar a produção de PHB e a formação de biofilme pelas estirpes Ab-V5 e Ab-V6 nas formulações desenvolvidas;
- Avaliar a influência quanto ao tempo de vida celular de diferentes embalagens utilizadas no armazenamento das formulações.
- Testar a eficiência das melhores formulações em escala semi-piloto.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 BIOTECNOLOGIA NA AGRICULTURA

A agricultura é uma prática fundamental para a manutenção e desenvolvimento humano. Além de fornecer alimento, a partir da agricultura têm-se matérias-primas que são utilizadas na fabricação de produtos importantes para a humanidade, como tecidos, calçados, papel, entre outros. Desde o início dessa prática até os tempos atuais os modos de produção agrícola passaram por diversos estágios. A produção agrícola moderna tem-se mostrado cada vez mais dependente do uso de máquinas, agrotóxicos e fertilizantes, resultando na expansão do agronegócio, prática importante para o desenvolvimento do país, por estar intimamente relacionado à geração de empregos, renda e tributos, porém, é responsável por agressões aos solos, vegetação, hidrografia e clima (COSTA et al., 2014; GOMES; BORÉM, 2013; CARRER; BARBOSA; RAMIRO, 2010).

Estima-se que até 2050 a população mundial alcançará entre 9 e 11 bilhões de pessoas e para suprir a demanda de alimentos a produção deverá ser, no mínimo, dobrada (JAMES, 2011). Devido a esse aumento da população mundial, se tornam cada vez mais necessárias práticas que visem o aperfeiçoamento do agronegócio, sem prejudicar e esgotar os recursos naturais (GOMES; BORÉM, 2013; CARRER; BARBOSA; RAMIRO, 2010). O grande desafio da agricultura moderna está em aumentar a produção de alimentos mantendo-se as dimensões da área plantada, preservando o meio ambiente (GOMES; BORÉM, 2013).

Muitos países têm investido em pesquisas biotecnológicas visando aumento da produtividade de forma sustentável, a fim de garantir maior retorno financeiro para o agronegócio, diminuição dos custos e aumento dos lucros para o agricultor, além da conservação do ambiente e segurança alimentar (GOMES; BORÉM, 2013; COSTA et al., 2014). Segundo o Boletim Técnico de Biotecnologia Agropecuária do MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), biotecnologia é o conjunto de conhecimentos, técnicas e métodos, de base científica ou prática, que permite o uso de seres vivos como parte integrante e ativa do processo de produção industrial de bens e serviços (MAPA, 2010a). Um produto biotecnológico é resultante do uso de uma prática biotecnológica durante sua produção (RAMOS; MELO; SILVA, 2016).

Em um levantamento de dados realizado em 2012 foi constatado que 80% dos investimentos em biotecnologia provêm de universidades ou instituições públicas no Brasil, sendo o seu desenvolvimento dependente de pesquisas básicas. Esse dado revela que a parceria entre empresas e centros de pesquisa é um meio importante de acesso a um tipo de conhecimento que inexiste na maioria das empresas (ROSSI, 2012). Uma das principais preocupações das empresas, dos mais diversos segmentos, é o desenvolvimento de novos produtos, isso porque o sucesso da empresa está diretamente relacionado à inovação tecnológica (MENDES, 2008).

O Brasil vem ocupando posição de destaque mundial na produção de alimentos por meio de processos biotecnológicos (COSTA et al., 2014). Na agricultura, a biotecnologia tem sido empregada para diversos fins, entre eles, para reduzir o uso da água nas lavouras, que é realizado em duas frentes: desenvolvendo espécies tolerantes à seca (ROLLA et al., 2014; TODAKA; SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2015), e no melhoramento genético de variedades para resistência a pragas e doenças (BEZIRGANOGLU et al., 2013; SCHOONBEEK et al., 2015; ORBEGOZO et al., 2016), gerando redução do uso de produtos químicos relacionados à contaminação ambiental. A biotecnologia também pode ser empregada no aumento da produção agrícola pelo melhoramento genético de plantas cultivadas, devido à inserção de características agronômicas desejáveis na planta (CARRER; BARBOSA; RAMIRO, 2010), e no desenvolvimento de inoculantes, visando a substituição total ou parcial de fertilizantes químicos, mantendo-se a produtividade (COSTA et al., 2014).

O uso de inoculante na cultura de soja é uma das mais importantes práticas para a agricultura brasileira. Estima-se que a substituição de fertilizantes químicos por inoculantes gere uma economia de 15 bilhões de dólares por safra de soja (HUNGRIA; RUBENS; NOGUEIRA, 2012). Outras culturas, como feijão, milho e trigo, também tem sido inoculadas resultando em elevada produtividade (HUNGRIA et al., 2010; HUNGRIA, 2011; HUNGRIA; CAMPO; NOGUEIRA, 2012). Com a diminuição do uso fertilizantes nitrogenados, o meio ambiente é beneficiado com menor poluição de rios e lençóis freáticos e menor emissão de gases efeito estufa (HUNGRIA; CAMPO; NOGUEIRA, 2012).

3.2 BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS E PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL

O nitrogênio (N) é um dos elementos mais abundantes nos seres vivos (KERBAUY, 2011) e tem funções importantes como componente estrutural de macromoléculas, como proteínas e ácidos nucleicos, além de ser precursor de hormônios vegetais, como o ácido indol-3-acético (AIA) e o etileno (FAQUIN, 2005).

O N representa 78% da composição atmosférica na forma molecular de gás (N_2). Contudo, essa forma gasosa apresenta alta estabilidade química, impossibilitando sua assimilação pela maioria dos seres vivos. Desse modo, por ser requerido em grandes quantidades pelos seres vivos, se faz necessária sua transformação em um composto nitrogenado assimilável, como íon amônio (NH_4^+) ou nitrato (NO_3^-), permitindo, assim, sua absorção (FAQUIN, 2005; KERBAUY, 2011).

A redução do N_2 para a formação de amônia (NH_3) é denominada fixação de nitrogênio (FAQUIN, 2005) e, por requerer alta energia de ativação, não ocorre espontaneamente (DE MELLO, 2012). Na natureza existem alguns microrganismos procarióticos, denominados diazotróficos, pois apresentam a capacidade de reduzir o N_2 atmosférico, processo que recebe o nome de fixação biológica de N_2 (FBN) (SILVA; FELIPE; BACH, 2004). A FBN é considerada responsável por, aproximadamente, 65% do N fixado na Terra (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Outros processos naturais que disponibilizam nitrogênio para os vegetais são: a decomposição de matéria orgânica do solo e a fixação não-biológica, proveniente de descargas elétricas, combustão e vulcanismo (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2001).

Bactérias diazotróficas podem ser de vida livre, quando usam o nitrogênio fixado; podem estar associadas a vegetais, sendo classificadas como bactérias endofíticas e associativas, quando contribuem para o crescimento da planta sem a formação de estruturas diferenciadas; ou podem ser simbióticas, quando ocorre uma interação estreita entre a planta e o microrganismo onde, em alguns casos, são formados nódulos (EVANS; BURRIS, 1992; HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007; MOREIRA et al., 2010).

São consideradas como componentes importantes no suprimento de N à nutrição vegetal, principalmente as bactérias simbióticas, dentre as quais os rizóbios,

que apresentam contribuição da FBN mais significativa quando comparado às bactérias diazotróficas endofíticas e associativas (MOREIRA et al., 2010).

Bactérias diazotróficas associativas podem ser consideradas bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) porque, além de realizarem FBN (HUERGO et al., 2008), ainda são capazes de favorecer o desenvolvimento vegetal através de mecanismos diretos, como a produção de fitormônios como auxinas, citocininas e giberelinas (LIN et al., 2012; SANTI; BOGUSZ; FRANCHE, 2013), que promovem o crescimento radicular, o que resulta em maior capacidade de absorção de água e de nutrientes do solo (BARILLI, 2011); a solubilização de fosfatos (RODRIGUEZ et al., 2004); ou, ainda, por mecanismos indiretos, atuando no controle biológico de insetos e fitopatógenos (CORREA et al., 2008), e aumentando a resistência do vegetal a estresses abióticos (YANG; KLOEPPER; RYU, 2009; BULGARELLI et al., 2013). Acredita-se que seja através da combinação de todos esses mecanismos que as BPCV favorecem o crescimento vegetal (DOBDELARE; VANDERLEYDERN; OKON, 2003).

Diversas espécies e estirpes de BPCV já foram descritas, dentre elas os gêneros mais estudados são *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum* e *Pseudomonas* (FERNANDES, 2013).

Em práticas agrícolas, a adubação nitrogenada é responsável por grande parte dos custos de produção de culturas não-leguminosas. Além disso, uma parte do N que é aplicado ao solo acaba sendo perdida do sistema solo-planta, devido à lixiviação e (ou) transformações para formas gasosas, o que pode acarretar na poluição de cursos e mananciais de água, na degradação da camada de ozônio e no aquecimento global (REIS JUNIOR et al., 2011). Tais fatores têm tornado o uso de bactérias diazotróficas uma alternativa relevante para o manejo de culturas (DE MELLO, 2012). Segundo Huergo (2006), o N fornecido pela FBN é menos propenso à lixiviação e volatilização por ser utilizado *in situ*. Portanto, o fornecimento de N na agricultura comercial pelo processo de FBN representa uma alternativa barata, limpa e sustentável.

3.2.1 Gênero *Azospirillum*

As bactérias diazotróficas pertencentes ao gênero *Azospirillum* fazem parte da subclasse α das proteobactérias. Esse gênero abrange um grupo de BPCV

Gram-negativas, associativas, mas que podem viver livremente no solo na forma de cistos (MOREIRA et al., 2010). Bactérias do gênero *Azospirillum* spp. estão distribuídas em muitas partes do mundo (HUNGRIA, 2011), em condições tropicais, subtropicais e temperadas (SIVASAKTHIVELAN; SARANRAJ, 2013), em associação com plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas (STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000).

O gênero *Azospirillum* engloba 16 espécies descritas (HUNGRIA, 2011). A primeira espécie, descrita inicialmente por Beijerinck, foi nomeada originalmente como *Spirillum lipoferum*. Em 1978 *Spirillum lipoferum* foi reclassificada como *Azospirillum*, e foram descritas duas espécies: *Azospirillum lipoferum* e *Azospirillum brasilense*. A reclassificação aconteceu após a descoberta da Dra. Johanna Döbereiner (1924-2000), pesquisadora da Embrapa, sobre a capacidade desse gênero em realizar FBN quando associado a gramíneas, sendo que o prefixo “azo” foi adicionado em referência à palavra “azote,” nomenclatura dada por Lavoisier ao nitrogênio (TARRAND; KRIEG; DÖBEREINER, 1978; HUNGRIA, 2011).

Outras espécies de *Azospirillum* foram descobertas e descritas nos anos seguintes: *A. amazonense* (MAGALHÃES et al., 1983), *A. halopraeferens* (REINHOLD et al., 1987), *A. irakense* (KHAMMAS et al., 1989), *A. largimobile* (SLY; STACKEBRANDT, 1999), *A. doebereineriae* (ECKERT et al., 2001), *A. oryzae* (XIE; YOKOTA, 2005), *A. melinis* (PENG et al., 2006), *A. canadense* (MEHNAZ; WESELOWSKL; LAZAROVITS, 2007a), *A. zaeae* (MEHNAZ; WESELOWSKL; LAZAROVITS, 2007b), *A. rugosum* (YOUNG et al., 2008) e *A. fonnosense* (LIN et al., 2012).

Quanto ao cultivo dessas espécies, segundo ECKERT et al., (2001), a temperatura ótima de crescimento varia entre 28 e 41°C. Ácidos orgânicos como malato, piruvato, glicose e frutose são as fontes de carbono preferenciais do gênero, enquanto que as fontes de nitrogênio podem ser provenientes de amônia, aminoácidos, nitrato, nitrito e até mesmo do nitrogênio atmosférico (DOBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995). Espécies desse gênero apresentam características aeróbicas quando em presença de fonte de N, e microaerofílicas quando crescem em situação dependente de fixação de N (DONZELI, 2002; HUERGO, 2006). Elementos como carbono, nitrogênio e oxigênio são muito importantes na nutrição da bactéria. Quando em situação de altas concentrações de amônia, e baixas

concentrações de oxigênio e carbono, há inibição do complexo nitrogenase em *Azospirillum*, causando redução da população (KAVADIA et al. 2008).

A maioria das espécies desse gênero é pouco tolerante à acidez, tanto no solo, como nos meios de cultura, sendo o pH próximo a neutralidade considerado ótimo para o crescimento, com exceção à *A. amazonense*, que cresce em pH 6,0 (MAGALHAES et al., 1983; REIS; BANDANI; BALDANI, 2005). Para *A. brasilense* o valor de pH deve estar acima de 6,8 (FERNANDES, 2013).

Azospirillum spp. compreende bactérias diazotróficas cuja associação já foi observada em diversas plantas, tais como trigo, sorgo (*Sorghum* spp.), cevada (*Hordeum vulgare* L.), arroz (*Oryza sativa* L.) e milho; (PAREDES-CARDONA et al., 1988; RODRIGUEZ-SALAZAR et al., 2009; VENIERAKI et al., 2011; FIBACH-PALDI; BURDMAN; OKON, 2012; DARTORA et al, 2013; GALINDO, 2015; PANDOLFO et al., 2015).

A FBN realizada por bactérias desse gênero pode ser considerada de extrema importância para gramíneas. Nos últimos anos tem aumentado o número de estudos visando verificar o desenvolvimento de gramíneas inoculadas com de *Azospirillum* spp., sendo analisadas alterações fisiológicas que estão relacionadas com o aumento no rendimento do vegetal (BARILLI, 2011; DE MELLO, 2012).

Vários experimentos realizados com estirpes deste gênero mostraram seu potencial em promover crescimento de plantas, pois além da fixação de nitrogênio (JAMES, 2000), essas bactérias podem aumentar a eficiência de uso de CO₂ (BULEGON et al., 2016) e apresentar capacidade de produção de fitormônios, que são considerados por alguns pesquisadores como o principal mecanismo benéfico à planta (DOBDELARE; VANDERLEYDERN; OKON, 2003). O ácido 3-indolacético (AIA), uma auxina, é o principal fitormônio produzido por estirpes de *Azospirillum* spp. (CROZIER et al., 1988). A síntese de auxinas por *Azospirillum* é muito importante para a planta, uma vez que a divisão e o crescimento celular tornam o sistema radicular mais abundante, promovendo no vegetal maior absorção de nutrientes e água (LAMBRECHT et al., 2000).

Outra ação desses microrganismos consiste na capacidade de competição com microrganismos fitopatogênicos, o que acaba por proteger a planta de possíveis doenças (BERG, 2009). Em um trabalho conduzido por Silva, Felipe e Bach (2004), folhas de plantas de cevada e trigo foram tratadas com *Azospirillum* e submetidas à pulverização com o patógeno *Bipolaris sorokiniana*. Após uma semana, foi

observado que todas as plantas não tratadas com *Azospirillum* apresentaram lesões típicas, as quais não foram constatadas nas folhas das plantas tratadas com *Azospirillum*. Com esse resultado, os autores afirmaram que a bactéria interferiu no metabolismo da planta, induzindo à resistência ao patógeno.

Bactérias do gênero *Azospirillum* têm sido inoculadas em plantas de diversas culturas, além de gramíneas, como algodão (*Gossypium* spp. L.) e tomate (*Solanum lycopersicum* L.) aumentando a produtividade pelo estímulo ao crescimento vegetal (REIS et al., 2000). O mesmo tem ocorrido para a inoculação em trigo, cevada, aveia-branca (*Avena sativa* L.) (SANTA et al., 2004) e cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) (REIS et al., 2000). Barassi et al. (2008) observaram em várias espécies de vegetais inoculadas com *Azospirillum*, aumento da eficiência fotossintética, incremento na produção de matéria seca e maior altura. Em trabalho desenvolvido por Saikia et al. (2007), plantas inoculadas com *Azospirillum* apresentaram maior teor de nutrientes nos grãos quando comparadas a plantas não-inoculadas. Em seu estudo, Silva, Felipe e Bach (2004) observaram que em plantas de cevada e de trigo houve um aumento da superfície das raízes e do crescimento das plantas pela a inoculação. Espécies de *Azospirillum* são largamente estudadas e apresentam um potencial significativo para a aplicação comercial (KUMARESAN; REETHA, 2011).

Espécies do gênero *Azospirillum* também vêm sendo utilizadas em culturas de plantas leguminosas, como a soja (*Glycine max* (L.) Merr.) e o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), pelo uso da técnica alternativa de coinoculação, também conhecida como inoculação mista, que consiste na combinação de diferentes bactérias, simbióticas e assimbióticas, que interagem sinergicamente, resultando em aumento da produtividade (FERLINI, 2006; BÁRBARO et al., 2008). Cassán et al. (2009) observaram aumento no número de nódulos e na porcentagem de plantas noduladas em cultura de soja coinoculadas com *Bradyrhizobium japonicum* e *A. brasilense*, em relação as plantas inoculadas somente com *B. japonicum*. Burdman, Kigel e Okon (1997) observaram que a coinoculação de feijoeiro com *A. brasilense* e *Rhizobium* aumentou significativamente o número total de nódulos e a fixação de N comparados com a inoculação somente com *Rhizobium*. Em trabalho mais recente, Hungria, Nogueira e Araujo (2013) conduziram cinco experimentos com feijoeiro em Londrina e Ponta Grossa, por três estações de cultivo (2009, 2010 e 2010/11).

Houve maior produtividade com a coinoculação com *A. brasilense* e *Rhizobium tropici* em relação à inoculação de *R. tropici* e *A. brasilense* separadamente.

3.2.2 *Azospirillum brasilense*

Dentre as bactérias promotoras do crescimento vegetal, *Azospirillum brasilense* é uma das espécies mais conhecidas (HERSCHKOVITZ et al., 2005). É considerada como uma espécie com grande potencial na promoção do crescimento de plantas (KUMARESAN; REETHA, 2011). *Azospirillum brasilense* é utilizada na produção de inoculantes que são amplamente comercializados em vários países, incluindo Argentina, México, Índia, Itália, França, Coreia e Brasil (HARTMANN; BASHAN, 2009; ARAÚJO, 2013b).

Pesquisadores do estado do Paraná, da Embrapa Soja e da UFPR selecionaram e testaram estirpes de *Azospirillum brasilense* em veículo turfoso e líquido com as culturas do milho e do trigo. Estes estudos foram importantes para a recomendação pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2011) das estirpes de *A. brasilense* Ab-V4, Ab-V5, Ab-V6 e Ab-V7 para o uso em inoculantes comerciais para a cultura do milho. Foi demonstrado que essas estirpes aumentaram a produção de grãos de milho em 24% a 30% em relação ao controle não inoculado. No caso da cultura de trigo, as estirpes Ab-V1, Ab-V5, Ab-V6 e Ab-V8 foram as que apresentaram melhores resultados, aumentando a produtividade em 13% a 18% em comparação com o controle não inoculado. Atualmente, indústrias de produção de inoculantes têm optado por utilizar as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 juntas, por serem eficazes em ambas culturas (HUNGRIA, 2011).

Quadros (2009) realizou estudos com a cultura de milho inoculada com *A. brasilense* nas sementes. A inoculação com *A. brasilense* associada a 50 kg ha⁻¹ de N na base, foi equivalente ao tratamento não inoculado que recebeu 130 kg ha⁻¹ de N (subdividido em 50 kg ha⁻¹ de N na base e 80 kg ha⁻¹ de N em cobertura). Braccini et al. (2012) observaram que plantas de milho que receberam metade da dose de N e foram inoculadas com *A. brasilense* apresentaram massa seca da planta semelhante às que receberam 100% da dose de N, sem inoculação. Lana et al. (2012) observaram

que, mesmo sem a adição de N, a inoculação de *A. brasilense* proporcionou incrementos de 7 a 14% na produtividade de grãos de milho.

Três híbridos de milho [Pioneer (P 32R48), Santa Helena (SHS 5050) e Agroeste (AS 1575)] foram inoculados com uma mistura de três espécies de *Azospirillum* (*A. lipoferum*; *A. brasilense* e *A. oryzae*) por Quadros et al. (2014). Houve incremento no teor relativo de clorofila e na produção de biomassa da parte aérea nos híbridos AS 1575 e SHS 5050. O peso de 1000 grãos do híbrido P32R48 e a altura de planta do híbrido AS 1575 também foram superiores com a inoculação.

Em trabalho realizado por Araújo et al. (2014), plântulas de milho inoculadas com *A. brasilense* (com e sem adubação nitrogenada) apresentaram comprimento superior às do tratamento controle, sem N e sem inoculação, e a produção de massa seca total também foi favorecida. Resultados positivos também foram obtidos após a inoculação de sementes de milho com *A. brasilense*, em trabalho realizado por Leo Daniel et al. (2013); nesse caso, houve aumento no volume de raízes, comprimento da parte aérea, massa seca da parte aérea, massa seca de raízes e massa seca total, em comparação com outros tratamentos.

Por outro lado, não foi constatado efeito significativo da inoculação de sementes de milho com *A. brasilense* no rendimento de grãos em trabalhos desenvolvidos por Vogt et al. (2014), Repke (2013) e Pandolfo et al. (2015). Os efeitos da inoculação de sementes de milho sobre o rendimento de grãos dependem das características genéticas das plantas e das estirpes, além das condições de ambiente (HUNGRIA, 2011; PANDOLFO et al., 2015). Em trabalho desenvolvido por Quadros et al. (2014), foram observados resultados variados com a inoculação, em cada híbrido testado. Os autores sugerem que, dependendo do genótipo de milho, a inoculação pode beneficiar diferentes partes da planta, como grãos, parte aérea ou colmo.

A variabilidade dos resultados na inoculação de milho com *A. brasilense* evidencia que a sua indicação técnica precisa ser aprimorada, analisando-se, entre outros fatores, os genótipos e o nível de investimento adotados na lavoura (PANDOLFO et al., 2015), principalmente com relação às técnicas de inoculação e tipo de inoculante utilizado.

Segundo Saubidet, Fatta e Barneix (2002), em plantas de trigo, a inoculação não substitui o adubo nitrogenado, porém, promove a melhor absorção e uso do N disponível, pelo aumento do crescimento radicular.

Sala et al. (2007) verificaram incremento na matéria seca do trigo, com a inoculação com *A. brasilense*, diferindo do resultado apresentado no trabalho de Nunes et al. (2015), quando não observe efeito. Rodrigues et al. (2000) e Souza et al. (2014) verificaram que a inoculação com *Azospirillum* incrementou o teor de N nos grãos de trigo. Sala et al. (2007), porém, não verificaram diferença nos teores de N nos grãos em resposta à inoculação com a bactéria.

Veresoglou e Menexes (2010) avaliaram a contribuição de *Azospirillum* no crescimento do trigo em 59 trabalhos publicados e verificaram que o uso de biofertilizante contendo *Azospirillum* aumentou, em média, 9% a produção de grãos e em 18% o peso seco da parte aérea do trigo. Segundo estudo de Rampim et al. (2012), *A. brasilense* proporcionou incrementos no desenvolvimento inicial de plântulas de trigo.

Piccinin et al. (2013), utilizando as estirpes de *A. brasilense* Ab-V5 e Ab-V6 constataram que a aplicação de metade da dose recomendada de N, associada com o inoculante, promoveu resultados positivos no desempenho agrônomo e produtividade de trigo. Brzezinsk et al. (2015) realizaram um estudo em que sementes de trigo foram inoculadas com *A. brasilense*. Cada tratamento recebeu cinco doses de nitrogênio em cobertura (0, 30, 60, 90 e 120 kg ha⁻¹). As plantas inoculadas apresentaram melhores resultados em relação às não inoculadas quanto a germinação e resultou em plantas mais altas, sendo que as plantas inoculadas da cultivar BRS 220 apresentaram melhor qualidade fisiológica quando receberam a dose de 60 kg ha⁻¹ de N em cobertura.

No trabalho desenvolvido por Soligo et al. (2014), a inoculação de sementes de trigo de diferentes cultivares com *A. brasilense* resultou em diferenças no percentual germinativo das cultivares, sendo que em uma delas (BRS 327) a inoculação reduziu o percentual de germinação (-9,5 %). O vigor das sementes, porém, aumentou significativamente nas cultivares TBIO Pioneiro (+20,2 %) e TBIO Sinuelo (+8,75 %) com a inoculação. Os autores descrevem que o efeito da inoculação com *A. brasilense* na germinação e no vigor de sementes e no crescimento de plântulas de trigo depende do genótipo da planta inoculada. Resultado não significativo, após inoculação com *A. brasilense* na produção vegetal foi observado por Rodrigues et al. (2000) e Cantarella (2007). Os autores citaram, como possíveis causas desse resultado, questões como especificidade entre bactéria e hospedeiro e competição por espaço e nutrientes entre os vários microrganismos presentes no solo.

Como os resultados da inoculação de trigo com *A. brasilense* nem sempre seguem a mesma tendência, Nunes et al. (2015) sugerem a necessidade de serem

desenvolvidos mais estudos utilizando-se essa espécie em diferentes situações de inoculação, como em diferentes genótipos da mesma espécie vegetal, diferentes tipos de solo com variação de pH e formas de aplicação do inoculante.

3.3 INOCULANTES

O N apresenta grande importância na produção agrícola por ser um macronutriente essencial para o desenvolvimento das plantas e um fator limitante para a produção (GÓMEZ; MERCADO; PINED, 2014). A grande maioria dos solos brasileiros, porém, apresenta baixo teor de N disponível. Portanto, o manejo da adubação nitrogenada é realizado com o objetivo de maximizar a produtividade. Os fertilizantes inorgânicos representam a principal forma de adição do nutriente ao solo (DARTORA et al., 2013).

A FBN tem sido considerada como uma forma alternativa para a suplementação e, até mesmo, a substituição de fertilizantes nitrogenados. É considerada uma tecnologia ambientalmente correta e barata que tem se mostrado eficiente para o aumento da produção e a disponibilidade de N para as plantas (BERGAMASCHI, 2006). O Brasil importa 73% do N utilizado na adubação nitrogenada (HUNGRIA, 2011), portanto, o processo de FBN vem sendo estudado em pesquisas pelo país (CANTARELLA; DUARTE, 2004; CONCEIÇÃO et al., 2009).

De acordo com a definição proposta por Vessey (2003), inoculantes são produtos que contêm microrganismos vivos que, quando aplicados sobre as sementes, superfícies da planta, ou no solo, colonizam a rizosfera ou o interior da planta, e promovem crescimento, aumentando o fornecimento ou a disponibilidade de nutrientes. O termo biofertilizante também é utilizado por alguns autores (BRAHMAPRAKASH; SAHU, 2012; HERRMANN; LESUER, 2013; RAMANATHAN; RAMA; DHAMAYANTHI, 2015).

A primeira patente de inoculante contendo rizóbio – NITRAGIN – para a inoculação em leguminosas, foi registrada no ano de 1896 nos Estados Unidos, e a partir daí sua comercialização teve início (NOBBE; HILTNER, 1896 *apud* BASHAN, 1998). Desde então, a prática de aplicação de inoculantes contendo estirpes de rizóbio em plantas leguminosas tem sido disseminada por todo mundo, tornando-se uma atividade comum (BASHAN, 1998).

Na década de 1950, a partir do estudo da FBN para a cultura da soja, o Brasil começou a produzir industrialmente estes inoculantes. O crescimento da cultura da soja no país levou à abertura, a partir da década de 1970, de novas fábricas de inoculantes, com a finalidade de suprir a demanda desse insumo, uma vez que se mostrava muito eficiente para o aumento da produtividade da soja (ARAÚJO, 2013a).

Nesse período, a produção de inoculantes no Brasil ocorria sem nenhuma fiscalização ou regulamentação. A partir de 1980, foi publicada pelo Ministério da Agricultura a primeira legislação a fim de se fiscalizar empresas e garantir melhor qualidade de produtos. Essa legislação foi sendo aperfeiçoada e atualizada ao longo dos anos desde a sua criação. Em 1985, foi fundada a RELARE – Rede de Laboratórios para a Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola – quando foram traçadas políticas para a FBN (ARAÚJO, 2013a). Atualmente, Brasil e Argentina são dois dos maiores produtores de inoculantes do mundo (DAMASCENO, 2011).

O Brasil é líder mundial no uso de bactérias fixadoras de nitrogênio na agricultura, sendo a aplicação de inoculantes em leguminosas um método considerado consolidado. Estimativas de 2016 indicam que, no país, por ano, são comercializados, aproximadamente, 37 milhões de doses de inoculantes. Deste total, 34 milhões de doses são destinados à cultura da soja e outros 2,2 milhões para gramíneas, como o milho e o trigo (ANPII, 2016).

Os inoculantes representam uma biotecnologia emergente projetada para melhorar a produtividade dos sistemas agrícolas no longo prazo. Eles podem ser considerados como uma tecnologia alinhada aos princípios da agricultura sustentável, pois reduzem o uso de fertilizantes químicos industrializados (KUMARESAN; REETHA, 2011). Neste contexto, a redução do uso de fertilizantes químicos devido aos inoculantes representa uma alternativa que pode ser utilizada por agricultores a fim de se gerar menor impacto sobre o solo, a água e o meio ambiente como um todo (MALUSÁ; SAS-PASZT; CIESIELSKA, 2012). Diante disso, várias pesquisas têm sido conduzidas a fim de se verificar as potencialidades do uso gênero *Azospirillum* spp (CARDOSO, 2008).

Pesquisadores apontam que, na agricultura familiar, é possível substituir 100% do fertilizante químico nitrogenado pelo inoculante no cultivo de milho. Para rendimentos superiores, acredita-se ser possível a redução de até 50% do uso desses fertilizantes.

Calcula-se que o uso de inoculantes na cultura de milho possa gerar uma economia de US\$ 1 bilhão por safra em todo o país (ROBERTO; DA SILVA; LOBATO 2010).

3.3.1 Veículos de Inoculação

Os inoculantes estão disponíveis no mercado na forma sólida, líquida ou granular (STEPHENS; RASK, 2000). Apesar dos diferentes tipos, todos objetivam apresentar forma de aplicação facilitada, qualidade, baixo custo de produção, que possam ser utilizados em escala industrial e com garantia de sobrevivência e eficiência dos microrganismos presentes em sua composição (BEN REBAH et al., 2007; ALBAREDA et al., 2008).

3.3.1.1 Inoculantes Turfosos

A turfa, além de ser um produto não-tóxico para o microrganismo, pode ser facilmente esterilizada, apresenta capacidade de tamponamento do pH e tem grande capacidade de retenção de água (SMITH, 1992). Inoculantes turfosos utilizam como veículo de inoculação a turfa em pó ou granulada, com alto teor de matéria orgânica, sendo uma fonte importante de nutrientes para a bactéria (HUNGRIA, 2001; FERNANDES, 2013).

Devido às suas características, a turfa confere aos microrganismos proteção física contra as adversidades do solo e possibilita a sobrevivência celular quando submetidos à restrição hídrica e a altas temperaturas. Para a produção de inoculantes, a turfa não deve conter partículas de areia e precisa apresentar textura fina, bem como baixo teor de argila (HUNGRIA, 2001).

Argentina e Canadá possuem turfás cujo conteúdo de matéria orgânica varia entre 40 a 50%, sendo consideradas as melhores fontes desse material. Turfas provenientes de outros locais podem ter sua qualidade melhorada pela adição de húmus (HUNGRIA et al., 2005).

Por ser um recurso natural, é necessário um longo período geológico para a formação da turfa, o que a torna um material limitado e de provável escassez no futuro (BUCHER; REIS, 2008). No Brasil existem poucas turfeiras destinadas à produção de inoculantes, sendo necessária a sua importação, o que gera um aumento nos custos de produção (FERNANDES JÚNIOR et al., 2009). Além disso, a

exploração de turfeiras pode gerar uma série de problemas ambientais, entre eles, a destruição de habitats e emissões de dióxido de carbono (RIBEIRO et al., 2013). Devido a essas limitações, o desenvolvimento de formulações alternativas visando a substituição da turfa como suporte de inoculantes vem sendo sugerido por diversos autores (YOUNG et al., 2006; HERRMANN; LESUEUR, 2013; BASHAN et al., 2014).

Segundo Bashan et al., (2014), resíduos e subprodutos agroindustriais, como por exemplo o bagaço de cana-de-açúcar, serragem, resíduos de cervejaria ou folhas de bananeira podem apresentar resultados semelhantes ou melhores do que a turfa quando utilizados como veículos de inoculação de microrganismos diazotróficos e promotores do crescimento vegetal. Entretanto, a grande limitação para o uso dessas matérias primas é a sua composição pouco consistente.

3.3.1.2 Inoculantes Líquidos

Os inoculantes líquidos consistem em um substrato aquoso composto por bactérias diazotróficas e promotoras de crescimento vegetal (SCHUH, 2005). Apresentam a vantagem de serem de fácil esterilização, evitando a presença de contaminantes, o que possibilita a obtenção de um maior número de células (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007). Outra característica desse tipo de inoculantes é que são de fácil manuseio, além de facilitarem a semeadura mecanizada (BASHAN et al., 2014). As formulações líquidas são preferidas pelos agricultores (HUNGRIA, 2001).

A Embrapa e a empresa Total Biotecnologia lançaram, em 2010/2011, o Azototal, inoculante líquido para trigo e milho, contendo *Azospirillum* (HUNGRIA, 2011; CASSETARI, 2015). O inoculante, comercializado por cerca de R\$10,00 a dose por ha, promove o crescimento das plantas, melhora o desenvolvimento das raízes e possibilita a redução de até 50% da adubação nitrogenada dessas culturas (CASSETARI, 2015).

Além da inoculação pela aplicação nas sementes, os inoculantes líquidos permitem uma forma alternativa de aplicação na cultura, via foliar. Esse método apresenta como vantagem a redução dos efeitos tóxicos, sobre as bactérias presentes no inoculante, provenientes do tratamento das sementes com produtos como fungicidas e inseticidas (GALINDO, 2015). Porém, estudos quanto à época de aplicação via foliar que resulta em melhores benefícios nesta forma de inoculação ainda são escassos (GALINDO et al., 2015).

Martins et al. (2012) realizaram a inoculação da bactéria *A. brasilense* nas folhas e em sementes de milho. A inoculação foliar foi a mais eficiente nos diferentes híbridos de milho testados. Segundo os autores, a aplicação de *A. brasilense* por via foliar mostrou-se como uma excelente opção para utilização em gramíneas, por coincidir com a fase de aplicação de herbicida, facilitando o manejo para o agricultor. Contudo, cabe destacar que a compatibilidade de *Azospirillum* com herbicida não foi testada e que pode ser altamente deletéria. Ao também inocular *A. brasilense* nas folhas e nas sementes do milho, Costa et al. (2015) observaram que os tratamentos que receberam inoculante apresentaram, respectivamente para inoculante na semente e pulverizado na parte aérea, maior altura (9,5% e 16%) e biomassa seca da raiz (123% e 97%), além de incremento no tamanho da espiga (8%), teor de clorofila (4%), massa de 1.000 grãos (12%) e produção de grãos (29%), em comparação às plantas não inoculadas. Efeitos de doses de N foram significativos apenas para massa de 1.000 grãos e produtividade de grãos (kg ha^{-1}), em que o maior rendimento foi associado às maiores doses de nitrogênio.

A legislação brasileira estabelece que inoculantes comerciais contendo rizóbios devem conter uma concentração mínima de $1,0 \times 10^9$ células viáveis por g ou mL do produto até a data de vencimento, que deve ser igual ou superior a seis meses (MAPA, 2011). Para inoculantes à base de *Azospirillum*, a concentração celular mínima deve ser de $1,0 \times 10^8$ células viáveis por g ou mL (HUNGRIA et al., 2010). Segundo Bashan et al. (2014), toda formulação de inoculante deve permanecer estável durante a produção, distribuição, armazenamento, e transporte para o agricultor.

Quando o inoculante líquido é colocado a campo, a sobrevivência das bactérias é dificultada, devido à baixa proteção contra estresses ambientais que esse tipo de inoculante proporciona (TITTABUTR et al., 2007). O desafio está em desenvolver formulações de inoculantes que mantenham estável a população do microrganismo de interesse e que apresentem resultados equivalentes em condições laboratoriais e de campo (STEPHENS; RASK, 2000).

3.3.2 Produção Industrial de Inoculantes

As primeiras produções industriais de inoculantes no Brasil, na década de 50, eram realizadas em fermentadores de vidro com capacidade para 20 litros. Entre as décadas de 60 e 70 foi desenvolvida, pelo Instituto de Biologia e Pesquisas Tecnológicas do Paraná (IBPT), uma nova tecnologia de fermentadores, com capacidade para 250 e

400 litros. Essa técnica foi utilizada por indústrias brasileiras durante muitos anos, porém cada empresa acabava por desenvolver seus próprios fermentadores e parâmetros de fermentação. Fermentadores com capacidade para 1.500 litros acoplados a fermentadores menores, que servem de inóculos sucessivos, passaram a ser utilizados a partir de 1984, e estão presentes atualmente na maioria das indústrias do país que realizam a produção e comercialização de inoculantes, principalmente em veículo turfoso e líquido (ARAÚJO, 1997).

A produção do inoculante envolve uma série de etapas, que inicia com a identificação e validação do microrganismo e finaliza com a fabricação do produto em grande escala nas indústrias (FERREIRA, 2016). Os meios de cultivo utilizados na fermentação e produção de inoculantes são desenvolvidos pela própria indústria, sendo consideradas as necessidades nutricionais do microrganismo utilizado, bem como a síntese do produto-alvo, que pode ser biomassa ou compostos provenientes do metabolismo celular. São várias as etapas de fermentação industrial como: preparação do inóculo, fermentação em escala piloto e fermentação principal (MOAT; FOSTER; SPECTOR, 2002). Após a fermentação segue o envase, para inoculante líquido, e mistura com a turfa e empacotamento do produto, para inoculante turfoso.

O desenvolvimento do meio fermentativo requer a presença de nutrientes importantes para o crescimento celular, como fontes de carbono, nitrogênio, fósforo, enxofre e oxigênio, além de micronutrientes e vitaminas específicas para algumas espécies bacterianas e antiespumante. Além da composição, outro fator importante é o tamponamento do meio, que deve ser realizado durante o processo fermentativo (MOAT; FOSTER; SPECTOR, 2002).

A produção de inoculantes no Brasil deve seguir as normas estabelecidas pelo MAPA, nas Instruções Normativas nº 5 de 6 de agosto de 2004 e nº 13 de 24 de março de 2011, em seu Artigo 1º, onde constam as definições e normas sobre especificações, garantias, registros, embalagem e rotulagem dos inoculantes destinados à agricultura, bem como as relações dos microrganismos autorizados e recomendados para a produção de inoculantes no Brasil (MAPA, 2011).

O controle de qualidade dos inoculantes deve, por lei, ser executado, nas indústrias e por órgão competente ligado ao MAPA. Em 1975, o Centro de Pesquisa em Fixação Biológica do Nitrogênio da FEPAGRO foi credenciado para executar o controle legal. Outras instituições que também realizam o controle da qualidade de inoculantes são a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Centro Nacional de Pesquisas da

Soja, localizado em Londrina-PR e o Instituto Agrônomo, localizado em Campinas-SP (FREIRE; VERNETTI, 1999).

Para a garantia de qualidade do produto, o agricultor deve atentar-se a fatores que podem comprometer sua eficiência, como o transporte e armazenamento dos inoculantes, que devem ser realizados em temperaturas a baixo de 30 °C, o cálculo correto da dose e a maneira de se aplicar o produto, seguindo as instruções do fabricante, deve-se também observar o pH do solo, que pode inibir o crescimento de bactérias (Denardin, 2006).

3.4 ALTERNATIVAS PARA A MANUTENÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR NOS INOCULANTES

3.4.1 Uso de Protetores

Devido à mortalidade celular precoce, inoculantes líquidos apresentam dificuldade em manter alta concentração celular por longos períodos (TITTABUTR et al., 2007). Formulações líquidas, porém, permitem ao fabricante incluir substâncias protetoras em sua composição, com a função de proteger contra a dessecação as células veiculadas (TITTABUTR et al., 2007; BASHAN et al., 2014).

Diversos polímeros têm sido usados para a produção de inoculantes, pois apresentam características como: capacidade de limitar a transferência de calor, boas propriedades reológicas e atividade elevada de água (MUGNIER; JUNG, 1985), atuando no comportamento e na sobrevivência das células microbianas presentes nos inoculantes (OKON; ITZIGSOHN, 1995; TRUJILLO-ROLDÁN et al., 2013).

Dentre os aditivos mais comuns utilizados em formulações líquidas, destaca-se o glicerol. O glicerol apresenta elevada estabilidade físico-química, atua como isolante térmico e, retém uma quantidade considerável de água, protegendo as células contra dessecação (MANIKANDAN et al., 2010; BASHAN; TREJO; DE-BASHAN 2011). Além disso, pode ser usado como fonte de carbono para o crescimento microbiano (BASHAN; TREJO; DE-BASHAN, 2011).

Manikandan et al. (2010), utilizando glicerol (10 mM) em formulação líquida contendo *Pseudomonas fluorescens*, obtiveram sobrevivência celular em uma concentração superior a 1×10^8 UFC mL⁻¹ no período de 4 meses de armazenamento.

Resultado semelhante foi observado por Kumaresan e Reetha (2011), em formulação contendo *A. brasilense*, em até 11 meses de armazenamento.

A carboximetilcelulose (CMC) é um polímero aniônico derivado da celulose, solúvel em água. É produzida pelo tratamento de celulose com ácido monocloroacético em presença de excesso de hidróxido de sódio, processo conhecido como reação de Williamson. É considerada um importante produto industrial, geralmente isolado e comercializado como sal de sódio, com múltiplas aplicações industriais (FUJIMOTO, 2002). A CMC é um aditivo comum em inoculantes porque é facilmente disponível, apresenta uma qualidade de lote relativamente consistente e pode ser usada em baixas concentrações, sendo relativamente barata (BASHAN et al., 2014). Utilizando CMC a 0,1 % em formulações inoculantes líquidas, Leo Daniel et al. (2013) observaram altas concentrações celulares, após dez dias de armazenamento de *Bacillus megaterium* var. phosphaticum, *Azotobacter chroococcum* e *A. brasilense*.

Formado por monossacarídeos de glicose ligados entre si, o amido é um carboidrato de estrutura complexa. Os grânulos de amido são compostos por amilose e amilopectina, o que corresponde a 98–99% da massa seca dos grânulos. A gelatinização é uma das propriedades mais importantes do amido (TESTER; KARKALAS; QI, 2004), e acontece a partir da absorção de água com o aquecimento. Uma maior viscosidade, bem como o inchamento do grânulo podem ocorrer após um período prolongado de exposição a altas temperaturas (SCHEUER et al., 2011).

Tittabutr et al. (2007) utilizaram amido de mandioca no crescimento de *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*. Houve maior crescimento celular para todas as estirpes comparado com o meio controle, YEM (*yeast extract manito*), sem adição de polímeros. Fernandes Junior et al. (2012) observaram que a inoculação de sementes feijão com *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267) com CMC (1,54 g L⁻¹) e amido (1,02 g L⁻¹) resultou em sobrevivência das células em sementes armazenadas por até três semanas. Foi mantida uma concentração celular acima de 10⁶ por semente. Segundo Silva (2009), o uso de CMC e amido juntos também é viável para a produção de inoculantes contendo bactérias associativas diazotróficas para gramíneas, como *Herbaspirillum* sp., *Azospirillum* sp., *Burkholderia* sp. e *Gluconacetobacter* sp.

O polivinilpirrolidone (PVP) é um polímero sintético formulado a partir de formaldeído e acetileno (LITTER, 1964). É utilizado como adesivo para inoculantes, auxiliando na cobertura das sementes e protegendo as células bacterianas contra a dessecação, que resulta em aumento na sobrevivência celular (DEAKER; ROUGHLEY;

KENNEDY, 2004). Estudos indicam que o PVP possui a capacidade de formação de um filme protetor, o que impede a perda de água (BUSHBY; MARSHALL, 1977).

Tanto o PVP, quando o amido, neutralizam compostos tóxicos, como os liberados na rizosfera (TITTABUTR et al., 2007), melhoram a adesão das células microbianas às sementes e, por possuírem boa capacidade de absorção de água, atuam como agente hidratante (TEMPRANO et al., 2002).

Segundo trabalho realizado por Leo Daniel et al. (2013), o uso de PVP em inoculantes contendo *Bacillus megaterium* var. phosphaticum, *A. brasilense* e *A. chroococcum*, na concentração de 2%, ajuda a manter a concentração celular dessas espécies. O uso do PVP para a manutenção celular de *Bradyrhizobium japonicum* e *Azorhizobium caulinodans* já foi reportado por Tittabutr et al. (2007), e para a espécie *P. fluorescens* por Manikandan et al. (2010).

A trealose é um dissacarídeo não redutor (CROWE; CROWE; CHAPMAN, 1984) e tem sido utilizada com sucesso para proteger bactérias de danos induzidos por liofilização (LESLIE et al., 1995) devido aos efeitos protetores de membranas que proporciona (CROWE; REID; CROWE, 1996). Esse polímero aumenta a tolerância das células à dessecação e aos estresses osmótico e de temperatura (SINGLETON; KEYSER; SANDE, 2002) e age ainda como carboidrato de reserva que pode ser mobilizado durante o estresse (HOUNSA et al., 1988). Segundo Gómez et al. (2003), o possível efeito protetor da trealose é que ela pode induzir a síntese de metabólitos que protegem a célula contra o estresse. Diante disso, Kumaresan e Reetha (2011) sugerem que esse fato pode ser a razão de uma ocorrência maior de células de *Azospirillum* em tratamentos com trealose. Manikandan et al. (2010) utilizaram a trealose (10 mM) como protetor em inoculantes líquidos contendo *P. fluorescens*, enquanto que Kumaresan e Reetha (2011) utilizaram a trealose, na mesma concentração, em inoculantes líquidos contendo e *A. brasilense*. A concentração de *P. fluorescens* após quatro meses de armazenamento foi de $5,55 \times 10^8$ UFC mL⁻¹, enquanto que a de *A. brasilense* foi de $4,0 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ após 11 meses de armazenamento.

Cortés-Patiño e Bonilla (2015) testaram cinco polímeros como protetores de formulação de inoculante líquido contendo *A. brasilense* estirpe C16. Foram eles: alginato (1%), carragenina (1,5%), PVP (2%), trealose (10 mM) e glicerol (10 mM). Nos primeiros sete dias de avaliação, a diferença na viabilidade celular entre os tratamentos não foi significativa, porém, essa tendência passou a mudar após o décimo quinto dia, quando as concentrações celulares passaram a diferir significativamente entre os tratamentos.

Carragenina e alginato apresentaram as maiores concentrações celulares quando comparados aos outros polímeros. As concentrações celulares foram mantidas em pelo menos uma unidade logarítmica superior, significando que esses dois polímeros protegeram as células contra o calor e a dessecação e reduziram a taxa de morte celular. Trealose e glicerol também apresentaram efeito de proteção, que se mostrou superior ao proporcionado pelo PVP. O PVP foi o único polímero com resultados semelhantes ao do controle, em que nenhum protetor foi adicionado. Para os autores, a concentração do polímero e sua interação com o meio líquido podem ter afetado o seu desempenho. Com exceção do PVP, todos os polímeros apresentaram proteção significativa em altas temperaturas (45°C).

Vendan e Thangaraju (2006) desenvolveram formulações líquidas para *A. brasilense*, a partir de meio de cultura NFb, contendo protetores como trealose, glicerol e PVP. Após dez meses de armazenamento sob temperatura ambiente, a concentração final foi de 10^8 células mL⁻¹ para os três tratamentos.

O uso de inoculantes contendo polímeros representa uma alternativa viável devido ao seu melhor desempenho e sobrevivência celular em condições de campo, seu baixo impacto ambiental, baixa variabilidade, facilidade de uso e menor custo em comparação aos inoculantes à base de turfa (FERNANDES JUNIOR et al., 2012).

3.4.2 Metabolismo Celular - Produção de Polihidroxibutirato e Formação de Biofilme

O homopolímero poli-β-hidroxibutirato (PHB) foi isolado e caracterizado pela primeira vez em 1926, pela microbiologista francesa Maurice Lemoigne (LEMOIGNE, 1926 apud VERLINDEN et al., 2007). Pertencente à classe de poliésteres, o PHB é um dos polihidroxialcanoato (PHA) mais conhecidos (GUDMALWAR; KAMBLE, 2014). Além do PHB, existem mais de 140 PHAs (STEINBUCHER, 2005).

O PHB é sintetizado e armazenado por uma grande variedade de bactérias como reserva de energia (STEINBUCHER et al., 1998). O acúmulo deste polímero intracelular é estimulado sob condições de crescimento desequilibradas, como quando há um excesso de oferta de carbono, quando outros nutrientes como nitrogênio, fósforo e enxofre são limitantes e quando a concentração de oxigênio é baixa. A polimerização de intermediários solúveis em moléculas insolúveis faz com que a célula não sofra alterações em seu estado osmótico, evitando o vazamento de compostos valiosos (LEE, 1996). Como consequência, as reservas de nutrientes

permanecerão relativamente disponíveis a um baixo custo de manutenção (YAMANE, 1993). Dessa forma, o PHB é uma estrutura de reserva que permite às bactérias resistirem a condições de estresses ambientais ajudando a manter a viabilidade celular (KADOURI; JURKEVITCH; OKON, 2003; REIS, 2007; SANGKHARAK; PRASERTSAN, 2008). Kadouri, Jurkevitch e Okon (2003), observaram que a síntese e o uso de PHB como fonte de carbono e energia por *A. brasilense* favoreceram o estabelecimento desta bactéria e sua sobrevivência em ambientes competitivos sob condições de estresse ambiental. Portanto, espera-se que se possa alcançar maior longevidade celular em inoculantes aumentando o acúmulo de PHB pela estirpe utilizada.

Biofilmes microbianos são definidos como comunidades ou agregados complexos formados por microrganismos aderidos a superfícies sólidas ou semissólidas, protegidos por uma matriz de exopolissacarídeos (EPS) ou proteínas, sintetizados pelas células, compostos por água e polímeros extracelulares. Na natureza, grande parte da biomassa bacteriana sobrevive inserida nessa estrutura (DONLAN; COSTERTON, 2002, WIMPENNY; MANZ; SZEWZYK, 2000. RAMEY et al., 2004).

A constituição dos biofilmes pode ser única, quando formados por apenas uma espécie microbiana, ou então pode ser um consórcio de microrganismos como fungos, bactérias e algas. Na face interna dos biofilmes estão presentes matéria orgânica e inorgânica, que são garantia de acesso a nutrientes necessários à sobrevivência dos microrganismos (CAPPELLI et al., 2007; WIMPENNY; MANZ; SZEWZYK, 2000). Segundo Donlan e Costerton (2002), a formação de biofilme é realizada por células microbianas há bilhões de anos e faz parte de suas estratégias de sucesso para colonizar diversas áreas do planeta.

Muitos parâmetros ambientais podem influenciar na formação do biofilme. Portanto, esse processo biológico é considerado complexo e está relacionado com a adesão da bactéria ao substrato e à agregação das células (MONDS; O'TOOLE, 2009). Estudos relatam a capacidade de *A. brasilense* de produzir biofilme (BURDMAN; OKON; JURKEVITCH, 2000; DI PALMA et al. 2012). O trabalho realizado por Di Palma et al. (2012) evidenciou a capacidade de formação de biofilme por *A. brasilense* Sp245 após crescimento em meio de cultura. Faleiro (2014) observou a presença de biofilme por meio de eletromicrografia de superfície de raízes de milho inoculadas com *A. brasilense* FP2, evidenciando a formação de

biofilme sobre a superfície das células da epiderme da raiz de milho. Para algumas espécies, um ambiente rico em nutrientes pode inibir a formação de biofilme por repressão catabólica, possivelmente porque estando em modo planctônico, a área de superfície de células expostas aos nutrientes é maior (STANLEY; LAZAZZERA, 2004).

A formação de biofilme proporciona muitos benefícios à comunidade bacteriana, como melhor comunicação entre as células e a possibilidade de colonização mais eficiente da planta hospedeira, visto que a estrutura do biofilme pode aumentar a resistência bacteriana em situações ambientais desfavoráveis e estressantes (KREFT, 2004; MORRIS; MONIER, 2003).

Apesar de estudos sobre a aplicação de biofilmes em benefício da agricultura serem escassos, acredita-se que o biofilme presente no inoculante pode auxiliar no sucesso da inoculação da planta no solo, visto que essa estrutura pode proteger as células bacterianas contra a competição com outras comunidades microbianas presentes no solo (JAYASINGHEARACHCHI; SENEVIRATNE, 2004; KARIVARADHARAJAN et al., 2013). Sendo assim, espécies bacterianas produtoras de biofilmes podem potencializar a produção de inoculantes, agregando mais qualidade ao produto final (KREFT, 2004; MORRIS; MONIER, 2003).

4 METODOLOGIA

Os experimentos deste trabalho foram realizados no Laboratório de Biotecnologia de Solos da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Soja, Embrapa Soja, localizada em Londrina- PR.

4.1 *Azospirillum brasilense*

Os microrganismos utilizados para o desenvolvimento de formulações líquidas de inoculantes foram as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *Azospirillum brasilense*, que constam da lista de estirpes recomendadas pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) para as culturas do milho, do trigo e do arroz (MAPA, 2011). As estirpes são provenientes da Coleção de Culturas de Bactérias Diazotróficas e Promotoras do Crescimento de Plantas da Embrapa Soja (Coleção WFCC 1213, WDCM 1054).

4.1.1 Preparo do Inóculo

Culturas estoque das estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *A. brasilense*, criopreservadas em 30 % de glicerol a -20 °C foram utilizadas separadamente para o preparo do inóculo. O cultivo foi realizado em 100 mL do meio DYGS líquido (RODRIGUES NETO et al., 1986) com agitação de 120 rpm a 28 °C durante 24 h. A estimativa da densidade celular foi realizada em câmara de Neubauer. Para a realização dos experimentos uma parte do inóculo foi transferida para o meio de cultura na proporção de 1:100 (v/v), obtendo-se concentração celular inicial de 1×10^6 ou 1×10^4 células mL⁻¹ de meio de cultura.

4.1.2 Diluição Seriada e Contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC)

O método da diluição seriada foi realizado para todas as análises de concentração celular. Após o período de cultivo, transferiu-se 1 mL da amostra para tubo de ensaio com 9 mL de solução salina (NaCl 0,85 %) estéril, produzindo a diluição 10^{-1} . Foram realizadas diluições decimais até a diluição 10^{-7} , com transferências sucessivas de alíquotas de 1 mL entre tubos de ensaio contendo

solução salina nas mesmas condições. Cada série de diluição foi realizada em triplicata. A fim de se proporcionar uma homogeneização eficiente, em cada transferência das alíquotas realizou-se agitação do tubo de ensaio com o auxílio de um agitador orbital durante 1 minuto a 100 rpm. As diluições 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} foram utilizadas para contagem celular.

O Método da gota (*Drop Plate*) (MILES; MISRA; IRWIN, 1938) é uma técnica de inoculação de um volume conhecido, geralmente 20 μL ou 30 μL , da amostra em meio de cultura sólido, onde a gota é absorvida. A contagem de colônias é realizada após um período de incubação (MAPA, 2010b; DAMASCENO, 2011) e a estimativa da concentração de células viáveis capazes de crescer nas formulações é expressa em Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por mL.

Após a realização da diluição seriada, alíquotas de 30 μL das diluições 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} da amostra foram inoculadas em placa de Petri contendo meio de cultura sólido RC (*Rojo Congo*), tabela 1 (RODRIGUEZ-CÁCERES, 1982). Após absorção da gota as placas foram invertidas e incubadas a 28 °C durante 72 h. Após esse período, foram feitas contagens das colônias para a estimativa de UFC mL⁻¹. O número de UFC por mililitro de formulação (UFC mL⁻¹) foi calculado a partir da média dos valores obtidos, por meio da equação 1. O valor de multiplicação por 33,33 refere-se ao número que deve ser multiplicado por 30 μL (volume pipetado em placa), para extrapolação do número de células viáveis por mL de formulação.

$$(1) \quad \text{UFC mL}^{-1} = \text{Média de UFC} \times \text{Fator de diluição da amostra} \times 33,33$$

Tabela 1 – Composição do meio de Ágar Rojo Congo (RC)

Reagentes	Concentração (g L ⁻¹ ou mL L ⁻¹)
NaCl	0,01
Ácido Málico	5,0
Extrato de Levedura	0,5
K ₂ HPO ₄	0,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
KOH	4,8
EDTA-Fe	0,023
Solução de vermelho Congo (0,25%)	15
Ágar bacteriológico	15

Fonte: Adaptado de RODRIGUEZ-CÁCERES, 1982.

4.2 DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES LÍQUIDAS DE INOCULANTES CONTENDO *Azospirillum brasilense*

Em trabalhos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Biotecnologia de Solos da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, foram desenvolvidas quatro formulações líquidas denominadas FORM1, FORM2, FORM3 e FORM4 para as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *A. brasilense*. Tais formulações, cuja composição química está descrita nas Tabelas 2 e 3, foram utilizadas nesse trabalho. As quatro formulações tiveram valores de pH ajustados para 6,8 – 7,0 utilizando NaOH 3 M, e foram autoclavadas a 121 °C por 20 minutos.

Tabela 2 – Composição química das formulações utilizadas e do meio de cultivo NFb.

Reagentes	Formulações (g L ⁻¹ ou mL L ⁻¹)				
	FORM 1	FORM 2	FORM3	FORM 4	NFb
Ácido málico	5	5	-	5	5
KH ₂ PO ₄	0,4	-	0,4	-	-
K ₂ HPO ₄	0,8	0,5	0,8	0,5	0,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5	0,2	0,5	0,5	0,1
CaCl ₂ .2H ₂ O	-	0,02	-	-	0,02
Extrato de levedura	0,6	0,3	0,6	2	-
Solução de micronutrientes	2	2	2	2	2
FE-EDTA (1,64%)	4	2	4	4	4
Sacarose	-	-	5	-	-
Glicerol	5	-	5	3	-
NaCl	0,1	0,1	0,1	0,1	-
NH ₄ NO ₃	1,2	-	1,2	2	-
NH ₄ Cl	-	0,3	-	-	-

Fonte: DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995; o próprio autor.

Tabela 3 – Composição química da Solução de Micronutrientes

Reagentes	Quantidade (g L ⁻¹)
NaMoO ₄ .2H ₂ O	1
MnSO ₄ H ₂ O	1,8
H ₃ BO ₃	1,4
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,04
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,2

Fonte: DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI (1995).

4.2.1 Comparação do Crescimento Celular nas Formulações e em Meio NFb

A fim de analisar o potencial das formulações na produção de biomassa celular foram determinadas a concentração de células proporcionada em cada formulação e comparadas com a concentração celular proporcionada no meio de cultivo NFb (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995), meio tradicional para o cultivo de *Azospirillum* spp. Foi transferido 1 mL do inóculo a 10⁸ em Erlenmeyers contendo 100 mL de formulação, obtendo-se uma concentração celular inicial 1x10⁶ por mL de formulação. A incubação ocorreu a 140 rpm a 28 °C por 26 h. Após esse período, foram realizadas diluições seriadas e contagem de UFC (item 4.1.2) de cada estirpe nas respectivas formulações.

4.2.2 Análise do Tempo de Viabilidade Celular Proporcionado pela Adição de Protetores

Foram realizadas análises da concentração celular e do tempo de viabilidade celular proporcionado por seis diferentes protetores (Tabela 4) em cada uma das quatro formulações. As duas estipes foram cultivadas separadamente. Para cada formulação foram realizadas triplicatas de sete tratamentos para cada estirpe. Cada tratamento foi composto pela formulação adicionada de um protetor, além do controle sem adição de protetor. Uma alíquota do inóculo foi transferido para Erlenmeyers contendo 100 mL de formulação, obtendo-se uma concentração celular inicial de 1x10⁶ por mL. As culturas foram incubadas a 140 rpm a 28 °C por 26 h. Após esse período foi realizada contagem de UFC (item 4.1.2), determinação de pH e armazenamento de 30 mL da cultura celular em tubos em formato cônico de polipropileno (Falcon) previamente esterilizados, com capacidade para 50 mL,

mantidos a uma temperatura de, aproximadamente, 28 °C, por 32 dias. Para verificação da sobrevivência das bactérias foi realizada contagem celular após 14 e 32 dias de armazenamento. Em adição às determinações de concentração de células viáveis, foram feitas determinações de pH para os tempos de armazenamento.

Tabela 4 – Concentração utilizada para cada protetor.

Protetores	Concentração
1- Trealose	10 milimolar (mM)
2- Glicerol	10 mM
3- Amido de milho comercial	0,1%
4- Carboximetilcelulose (CMC)	0,3%
5- CMC	0,1%
6- Polivinilpirrolidone (PVP)	1%

Fonte: O Próprio autor.

4.2.3 Caracterização do Crescimento de Ab-V5 e Ab-V6

Diante dos resultados obtidos após o ensaio descrito no item 4.2.2, as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 foram cultivadas nas formulações que proporcionaram maior tempo de viabilidade celular. Uma alíquota do inóculo foi transferida para Erlenmeyers contendo 300 mL de formulação, obtendo-se uma concentração celular inicial de 1×10^4 . O cultivo ocorreu em triplicata a 28 °C, a uma agitação de 140 rpm por até 96 horas. Foram realizadas diluições seriadas e determinação de UFC mL⁻¹ (item 4.1.2) nos tempos de cultivo: 24, 48, 72 e 96 h.

4.2.4 Avaliação da Produção de Polihidroxibutirato (PHB)

Para a extração do polímero PHB foi obtida a biomassa seca. Para tal, alíquotas de 10 mL dos cultivos em triplicata de cada tratamento foram centrifugadas a 7.690 g por 15 min. 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 nova centrifugação e descarte do sobrenadante. As amostras foram secas a 70 °C por 48 horas. A biomassa seca de células foi ressuspensa em 12 mL de hipoclorito de sódio (5,25 %). Essa mistura foi incubada por 2 h a 40 °C. Após esse período, a mistura foi centrifugada a 2.370 g por 15 min. a 4 °C, e o sobrenadante descartado. A fração precipitada, que contém o PHB, foi lavada com

10 mL de água destilada e centrifugada a 2.370 g por 15 min. a 4 °C. Em seguida, foi lavada com 10 mL de etanol 96% e centrifugada a 2.370 g por 15 min. a 4 °C. Após as lavagens, o material foi seco em estufa a 70 °C. A seguir, foi realizada a digestão do material seco em 1 mL de ácido sulfúrico concentrado a 90 °C por 30 minutos, seguido do resfriamento da solução. A concentração de PHB foi determinada pelo valor da absorbância obtida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 235 nm, utilizando ácido sulfúrico P.A como “branco” (LAW; SLEPECKY, 1961). Segundo Slepecky e Law (1960), a quantidade de ácido crotônico pode ser calculada utilizando-se o valor do seu coeficiente de extinção, que é de $1,55 \times 10^4$. Dessa forma, é possível calcular a concentração de PHB, já que o conteúdo de ácido crotônico é proporcional a quantidade de PHB da amostra.

4.2.5 Avaliação da Produção de Biofilme

O estudo de formação de biofilme bacteriano foi realizado em microplacas de poliestireno com fundo em “U” (Deltalab S.L.). Para isso, 1 mL do inóculo de cada estirpe foi inoculado separadamente em 100 mL das formulações escolhidas e mantidas encubadas por 24 h a 28 °C e sob agitação de 140 rpm. Transcorrido este tempo, foi avaliada a D.O.₆₀₀ e as culturas bacterianas foram diluídas até uma D.O.₆₀₀ de 0,2. Posteriormente, foram adicionados 100 µL das diluições em cada poço da microplaca em triplicata para cada formulação, e de meio NFb como controle, que foi tampada com tampa de poliestireno e, com cuidado, invertidas e incubadas em câmara úmida a 28 °C por 14 dias. Transcorrido este tempo, foi avaliada a D.O.₆₀₀ e o meio de cultura retirado cuidadosamente. A placa foi secada a 60 °C durante 1 h, seguida de três lavagens por imersão da microplaca em NaCl 0,9%, seguida de nova secagem a 60 °C durante 1 h. A seguir, foram adicionados 100 µL de cristal violeta 0,1% (solução aquosa) por poço, e a placa foi mantida com o corante por 20 min. Foram realizadas três lavagens da placa com água destilada por submersão da placa. Após secar por mais 1 h a 60 °C, foram adicionados a cada poço da placa 100 µL de etanol 96%, e a placa foi deixada em agitação suave até que todo cristal violeta estivesse dissolvido. Por último, a D.O. foi analisada a 570 nm.

4.3 INFLUÊNCIA DA EMBALAGEM NA VIABILIDADE CELULAR

Para a produção das formulações, as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 foram inoculadas separadamente em Erlenmeyers com capacidade para 1 L, contendo 500 mL de formulação, obtendo-se uma concentração celular inicial 1×10^4 UFC mL⁻¹. O cultivo ocorreu a 28 °C, a uma agitação de 140 rpm por 96 horas.

Uma parte das formulações produzidas foi armazenada em triplicata em tubos Falcon, previamente esterilizados. A outra parte foi armazenada em triplicata em sacos plásticos estéreis, de polietileno de baixa densidade (PEBD), que permitem trocas gasosas com meio externo (NEVES et al., 2009). Esse material, gentilmente cedido pela indústria de inoculantes Microquímica, foi utilizado com a finalidade de se verificar a influência do material da embalagem no tempo de viabilidade celular das formulações. As formulações foram mantidas a uma temperatura de aproximadamente 28 °C por dois meses. Para verificação da sobrevivência das bactérias foi realizada contagem celular, em triplicata, após o cultivo e aos 14, 32 e 60 dias de armazenamento. Também foram feitas determinações de pH do meio em cada tempo.

4.4 CULTIVO DAS FORMULAÇÕES EM ESCALA SEMI-PILOTO

As formulações que apresentaram melhor desempenho foram cultivadas em biorreator - Winpact Scientific®, com 6 L de formulação. O fermentador utilizado permitia o controle de agitação (140 rpm), temperatura (28 °C), oxigênio dissolvido (v/v) e monitorava automaticamente o pH por adição de solução de HCl 0,5 M ou NaOH 1 M, mantendo-o em 6,9.

A esterilização do meio de cultura, do fermentador, dos filtros de ar e soluções para ajuste de pH foi realizada em autoclave a 121°C por 40 minutos. O volume de inóculo, preparado com as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 juntas, foi de 10% do volume da formulação (600 mL) e o tempo de cultivo dependeu da formulação, sendo de 24 ou 48 horas. Após o cultivo, as formulações produzidas tiveram a concentração celular analisada segundo o item 4.1.2. Foram armazenadas, em triplicata, em sacos plásticos estéreis, de polietileno de baixa densidade (PEBD), cedidos pela indústria

Microquímica, e mantidas a uma temperatura de ± 28 °C, e foram feitas determinações da concentração celular após 30 dias de armazenamento.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

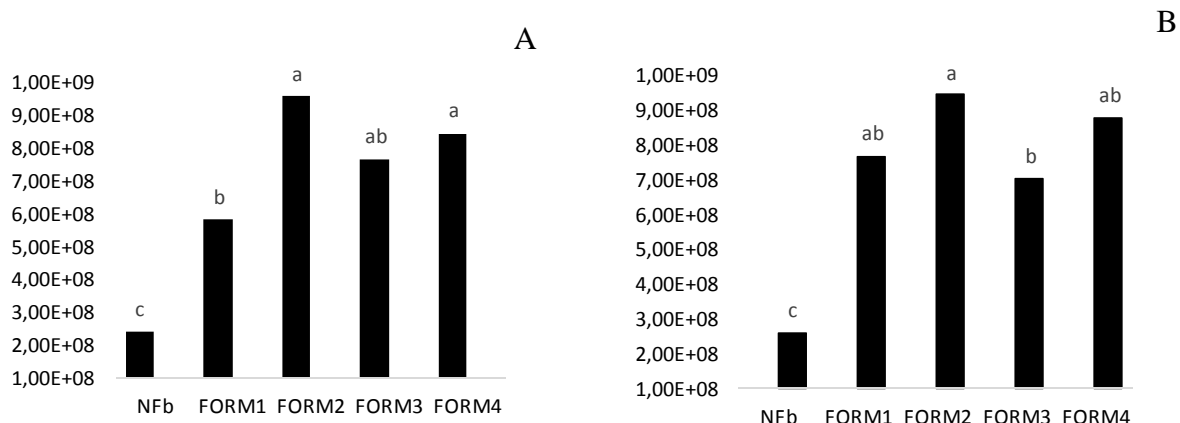
Os dados foram submetidos à análise de homogeneidade de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% ($p \leq 0,05$) de probabilidade.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 COMPARAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR NAS FORMULAÇÕES E EM MEIO NFb

No presente estudo, foram apresentadas quatro novas formulações de meio de cultura que proporcionaram maior concentração celular de *A. brasilense*, estirpes Ab-V5 e Ab-V6, quando comparadas com o meio NFb, tradicionalmente utilizado no cultivo dessa espécie e que serviu como base para a elaboração das quatro novas formulações (Figura 1). Esses resultados sugerem que a adição de diferentes componentes químicos ausentes no meio NFb, como o glicerol, nitrato de amônio, cloreto de amônio, e cloreto de sódio, bem como mudanças na concentração de constituintes presentes, favoreceu o crescimento celular. O crescimento de Ab-V5 atingiu maior concentração quando cultivada nas formulações 2 e 4, diferindo significativamente das concentrações obtidas nas outras formulações. Já a estirpe Ab-V6 apresentou maior crescimento na formulação 2.

Figura 1 – Concentração celular de *A. brasilense* Ab-V5 e Ab-V6 em diferentes meios de cultivo. As letras comparam as médias entre as formulações para a estirpe Ab-V5 e Ab-V6, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. A: Ab-V5; B: Ab-V6.



Fonte: O próprio autor.

Já foi reportado na literatura que espécies de *Azospirillum* são favorecidos na presença de ácido málico (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995); já o uso da sacarose no cultivo de *A. brasilense* pode acarretar em baixas taxas de crescimento,

devido à dificuldade da espécie em metabolizar esse composto (DÖBEREINER; PEDROSA, 1987). Entretanto, foi reportada recentemente por Marcelino (2012) a habilidade da estirpe Ab-V5 de *A. brasilense* em metabolizar sacarose. Nesse estudo a interação da sacarose com KH_2PO_4 contribuiu significativamente para o aumento do crescimento celular. Além da sacarose, o meio de cultivo utilizado por Marcelino (2012) também continha glicerol como fonte de carbono. O glicerol é um dos poucos substratos capazes de atravessar a membrana celular de procariotos por difusão facilitada (ROSSI, 2011). Após a passagem do glicerol através da membrana, *Azospirillum* spp. é capaz de catabolizá-lo e utilizá-lo como fonte de carbono (SILVA, 2006; FERNANDES, 2013). O glicerol estava presente na composição das formulações 1, 3 e 4 e a sacarose na formulação 3, demonstrando a capacidade das estirpes em utilizar essas fontes de carbono em seu metabolismo energético.

A maior concentração celular obtida nas quatro formulações, em comparação com o meio NFb, pode estar relacionada à presença de cloreto de amônio e nitrato de amônio como fontes de nitrogênio alternativas ao extrato de levedura. Silva (2006) observou bom desempenho na produção de *A. brasilense* quando empregou sais de amônio como fonte de nitrogênio. Segundo o autor, esse nutriente conduz a maiores fatores de conversão e velocidades específicas de crescimento. Outro fator que pode ter favorecido o aumento da concentração celular nas quatro novas formulações foi a presença de cloreto de sódio, ausente no meio NFb, uma vez que essa substância ajuda a manter o equilíbrio osmótico da célula.

Íons de magnésio podem ter função de cofator de enzimas, auxiliando na catálise de uma reação. Segundo Tortora et al., (2012) o magnésio (Mg^{2+}) é requerido por muitas enzimas fosforilativas, exercendo importante atuação no metabolismo celular. A concentração de magnésio na formulação 2 foi intermediária em relação às outras formulações e ao meio NFb. Essa característica pode ter influenciado positivamente no crescimento celular, visto que, sob condições de deficiência ou excesso, o magnésio pode prejudicar a divisão celular (WEBB, 1949).

Apesar de a FORM4 apresentar elevada concentração de extrato de levedura em sua composição (2 g/L), o maior crescimento celular ocorreu na FORM2, com a menor concentração desse constituinte (0,3 g/L). Essa característica é importante economicamente, já que não foram necessárias grandes quantidades desse substrato para se atingir alta taxa de crescimento. A concentração de ferro na

FORM2 também foi inferior à concentração nas outras formulações. Essa diferença pode ter influenciado no maior crescimento celular de ambas as estirpes nessa formulação.

5.2 TEMPO DE VIABILIDADE CELULAR PROPORCIONADO PELA ADIÇÃO DE PROTETORES

Os protetores influenciaram positivamente na manutenção celular das estirpes Ab-V5 e Ab-V6 para as quatro formulações. Resultados como esses já foram reportados anteriormente por vários autores para *A. brasilense* (KUMARESAN; REETHA, 2011; LEO DANIEL et al., 2013; MANIKANDAN et al., 2010).

Para a formulação 1, estirpe Ab-V5, a adição de protetores gerou aumento significativo da concentração celular, ao final das 26 horas de cultivo, quando comparado ao controle (Tabela 5). Porém apenas o uso do protetor 6 garantiu aumento do tempo de viabilidade celular até 14 dias de armazenamento (Tabela 6). Após esse período as concentrações de todos os tratamentos ficaram abaixo de 1×10^7 UFC mL⁻¹.

Na formulação 2, os protetores que garantiram maior tempo de viabilidade celular para a estirpe Ab-V5 foram trealose, amido de milho comercial e PVP, não havendo diferença significativa das concentrações celulares aos 14 dias de armazenamento (Tabela 6). Já aos 32 dias de armazenamento, o uso de amido de milho comercial garantiu alta concentração celular, diferindo significativamente dos outros protetores (Tabela 7). Essa mesma estirpe, quando cultivada na formulação 3, teve seu tempo de vida aumentado pelo uso de amido de milho comercial, CMC (0,1%) e PVP, até 14 dias de armazenamento (Tabela 6). Após esse período a concentração celular caiu para menos de 10^7 UFC mL⁻¹ (Tabela 7).

A formulação 4 proporcionou elevada concentração celular nos três momentos de contagem. Para Ab-V5 o protetor PVP garantiu concentração celular significativamente maior do que os outros protetores após 32 dias de armazenamento (Tabela 7).

Tabela 5 - Concentrações celulares de Ab-V5 obtidas nas formulações 1, 2, 3 e 4 (Tabela 2) acrescidas de diferentes protetores: trealose (10 mM); glicerol (10 mM); amido de milho comercial (0,1%); CMC (0,3%); CMC (0,1%); PVP (1%), após 26 horas de cultivo.

	Ab-V5 (UFC mL ⁻¹)			
	FORM1	FORM2	FORM3	FORM4
CONTROLE	5,81 x10 ⁸ ± 1,40 x10 ⁸ Ba	9,62 x10 ⁸ ± 3,57 x10 ⁷ Aba	7,66 x10 ⁸ ± 1,39 x10 ⁸ ABa	8,44 x10 ⁸ ± 6,19 x10 ⁷ ABa
1 - Trealose (10 mM)	6,70 x10 ⁸ ± 1,34 x10 ⁸ ABa	3,85 x10 ⁸ ± 1,30 x10 ⁸ Cb	7,66 x10 ⁸ ± 7,78 x10 ⁷ ABa	8,78 x10 ⁸ ± 2,23 x10 ⁷ ABa
2 - Glicerol (10 mM)	7,52 x10 ⁸ ± 1,76 x10 ⁸ ABa	7,28 x10 ⁸ ± 3,90 x10 ⁷ Aba	9,61 x10 ⁸ ± 5,67 x10 ⁶ Aa	8,81 x10 ⁸ ± 3,21 x10 ⁷ ABa
3 - Amido de milho (0,1%)	7,59 x10 ⁸ ± 9,05 x10 ⁷ ABab	6,92 x10 ⁸ ± 9,44 x10 ⁷ ABab	5,55 x10 ⁸ ± 5,55 x10 ⁷ Bb	9,00 x10 ⁸ ± 4,45 x10 ⁷ ABa
4 - CMC (0,3%)	7,28 x10 ⁸ ± 2,79 x10 ⁷ ABa	8,22 x10 ⁸ ± 1,00 x10 ⁸ Aba	7,85 x10 ⁸ ± 9,25 x10 ⁷ ABa	7,66 x10 ⁸ ± 7,78 x10 ⁷ ABa
5 - CMC (0,1%)	9,40 x10 ⁸ ± 4,63 x10 ⁷ Aa	6,00 x10 ⁸ ± 7,78 x10 ⁷ BCb	4,96 x10 ⁸ ± 1,67 x10 ⁷ Bb	6,41 x10 ⁸ ± 2,07 x10 ⁸ Bb
6 - PVP (1%)	6,44 x10 ⁸ ± 1,35 x10 ⁸ ABb	9,74 x10 ⁸ ± 1,44 x10 ⁸ Aa	7,29 x10 ⁸ ± 6,32 x10 ⁷ ABab	9,52 x10 ⁸ ± 6,51 x10 ⁷ Aa

Fonte: O próprio autor. *Desvio padrão não determinado devido à ausência na contagem de UFC nas diluições plaqueadas (10⁶ à 10⁸). As letras maiúsculas comparam as médias entre os protetores dentro de cada formulação (coluna), e minúsculas comparam as médias de cada protetor entre as formulação (linha) pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 6 - Concentrações celulares de Ab-V5 obtidas nas formulações 1, 2, 3 e 4 (Tabela 2) acrescidas de diferentes protetores: trealose (10 mM); glicerol (10 mM); amido de milho comercial (0,1%); CMC (0,3%); CMC (0,1%); PVP (1%), após 14 dias de armazenamento.

	Ab-V5 (UFC mL ⁻¹)			
	FORM1	FORM2	FORM3	FORM4
CONTROLE	<10 ⁷ * Bc	5,94 x10 ⁷ ±7,23 x10 ⁶ Bb	<10 ⁷ * Bc	2,37 x10 ⁸ ± 8,35 x10 ⁷ Ba
1 - Trealose (10 mM)	<10 ⁷ * Bb	1,50 x10 ⁸ ±4,45 x10 ⁶ Aa	<10 ⁷ * Bb	3,44 x10 ⁷ ± 4,00 x10 ⁶ Db
2 - Glicerol (10 mM)	<10 ⁷ * Bb	4,93 x10 ⁷ ±2,12 x10 ⁷ Bab	<10 ⁷ * Bb	9,00 x10 ⁷ ± 1,90 x10 ⁷ CDa
3 - Amido de milho (0,1%)	<10 ⁷ * Bc	1,30 x10 ⁸ ±1,79 x10 ⁷ Aa	3,89 x10 ⁷ ± 8,82 x10 ⁶ ABab	7,55 x10 ⁷ ±1,18 CDb
4 - CMC (0,3%)	<10 ⁷ * Bb	4,89 x10 ⁷ ±1,35 x10 ⁷ Bab	<10 ⁷ * Bb	8,07 x10 ⁷ ± 1,65 x10 ⁷ CDa
5 - CMC (0,1%)	<10 ⁷ * Bb	4,50 x10 ⁷ ±9,45 x10 ⁶ Bb	4,78 x10 ⁷ ± 4,43 x10 ⁶ ABab	1,01 x10 ⁸ ± 2,32 x10 ⁶ Ca
6 - PVP (1%)	3,00 x10 ⁸ ± 3,33 x10 ⁷ Aa	1,55 x10 ⁸ ±6,36 x10 ⁶ Ab	8,40 x10 ⁷ ± 2,21 x10 ⁶ Ac	3,30 x10 ⁸ ± 2,28 x10 ⁷ Aa

Fonte: O próprio autor. *Desvio padrão não determinado devido à ausência na contagem de UFC nas diluições plaqueadas (10⁶ à 10⁸). As letras maiúsculas comparam as médias entre os protetores dentro de cada formulação (coluna), e minúsculas comparam as médias de cada protetor entre as formulação (linha) pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 7 - Concentrações celulares de Ab-V5 obtidas nas formulações 1, 2, 3 e 4 (Tabela 2) acrescidas de diferentes protetores: trealose (10 mM); glicerol (10 mM); amido de milho comercial (0,1%); CMC (0,3%); CMC (0,1%); PVP (1%), após 32 dias de armazenamento.

	Ab-V5 (UFC mL ⁻¹)			
	FORM1	FORM2	FORM3	FORM4
CONTROLE	<10 ^{7*} Ab	<10 ^{7*} Cb	<10 ^{7*} Ab	5,15 x10 ⁷ ± 8,33x10 ⁶ ABa
1 - Trealose (10 mM)	<10 ^{7*} Ab	4,59 x10 ⁷ ±7,40 x10 ⁶ Ba	<10 ^{7*} Ab	4,59 x10 ⁷ ± 9,71x10 ⁶ BCa
2 - Glicerol (10 mM)	<10 ^{7*} Ab	<10 ^{7*} Cb	<10 ^{7*} Ab	3,93 x10 ⁷ ± 5,59x10 ⁶ BCa
3 - Amido de milho (0,1%)	<10 ^{7*} Ac	7,74 x10 ⁷ ±1,57 x10 ⁷ Aa	<10 ^{7*} Ac	5,04 x10 ⁷ ±1,22 x10 ⁷ ABCb
4 - CMC (0,3%)	<10 ^{7*} Ab	<10 ^{7*} Cb	<10 ^{7*} Ab	4,78 x10 ⁷ ± 1,07x10 ⁷ ABCa
5 - CMC (0,1%)	<10 ^{7*} Ab	<10 ^{7*} Cb	<10 ^{7*} Ab	3,66 x10 ⁷ ± 1,07x10 ⁷ Ca
6 - PVP (1%)	<10 ^{7*} Ac	3,30 x10 ⁷ ±1,70 x10 ⁶ Bb	<10 ^{7*} Ac	6,22 x10 ⁷ ± 9,55x10 ⁶ Aa

Fonte: O próprio autor. *Desvio padrão não determinado devido à ausência na contagem de UFC nas diluições plaqueadas (10⁶ à 10⁸). As letras maiúsculas comparam as médias entre os protetores dentro de cada formulação (coluna), e minúsculas comparam as médias de cada protetor entre as formulação (linha) pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para a estirpe Ab-V6, na formulação 1, os protetores 3 e 6, amido de milho comercial e PVP, respectivamente, foram destaque por aumentar significativamente o tempo de viabilidade das células até os 32 dias de armazenamento (Tabela 10). Aos 14 dias de armazenamento, a concentração de Ab-V6 nas formulações 2 e 3 acrescidas de CMC (0,3%) ficou abaixo de 10^7 UFC/mL, enquanto que nas mesmas formulações acrescidas de CMC (0,1%) a concentração celular se manteve elevada nesse período (Tabela 9).

Quando cultivada na formulação 2 os protetores amido de milho comercial, glicerol e PVP geraram maior tempo de viabilidade de Ab-V6 (Tabela 10). A estirpe Ab-V6 apresentou concentração celular a cima de 10^7 , após 32 dias de armazenamento, na formulação 3 acrescida de trealose, glicerol e amido de milho comercial (Tabela 10). Já na formulação 4 não houve diferença significativa da concentração de Ab-V6 tanto na ausência, quanto na presença de protetores, após o mesmo período de armazenamento (Tabela 10).

Tabela 8 - Concentrações celulares de Ab-V6 obtidas nas formulações 1, 2, 3 e 4 (Tabela 2) acrescidas de diferentes protetores: trealose (10 mM); glicerol (10 mM); amido de milho comercial (0,1%); CMC (0,3%); CMC (0,1%); PVP (1%), após 26 horas de cultivo.

	Ab-V6 (UFC mL ⁻¹)			
	FORM1	FORM2	FORM3	FORM4
CONTROLE	7,66 x10 ⁸ ± 4,02 x10 ⁷ ABab	9,47 x10 ⁸ ± 9,45 x10 ⁷ Ba	7,00 x10 ⁸ ± 5,89 x10 ⁷ Ac	8,77 x10 ⁸ ± 9,68 x10 ⁷ Aab
1 - Trealose (10 mM)	7,37 x10 ⁸ ± 1,20 x10 ⁸ ABCab	5,58 x10 ⁸ ± 1,27 x10 ⁸ Cb	9,22 x10 ⁸ ± 9,88 x10 ⁷ Aa	9,18 x10 ⁸ ± 1,03 x10 ⁸ Aa
2 - Glicerol (10 mM)	6,15 x10 ⁸ ± 6,12 x10 ⁷ BCDBb	1,04 x10 ⁹ ± 1,76 x10 ⁸ Ba	8,44 x10 ⁸ ± 1,10 x10 ⁷ Aab	1,01 x10 ⁹ ± 9,31 x10 ⁷ Aa
3 - Amido de milho (0,1%)	4,48 x10 ⁸ ± 4,50x10 ⁷ Dc	1,36 x10 ⁹ ± 1,58 x10 ⁸ Aa	9,11 x10 ⁸ ± 6,19 x10 ⁷ Ab	9,59 x10 ⁸ ± 1,01 x10 ⁸ Ab
4 - CMC (0,3%)	4,92 x10 ⁸ ± 1,22x10 ⁸ BCDBb	9,11 x10 ⁸ ± 1,35 x10 ⁸ Ba	8,52 x10 ⁸ ± 1,12 x10 ⁸ Aa	9,29 x10 ⁸ ± 1,07 x10 ⁸ Aa
5 - CMC (0,1%)	4,57 x10 ⁸ ± 4,92x10 ⁷ CDb	1,02 x10 ⁹ ± 1,77 x10 ⁸ Ba	9,44 x10 ⁸ ± 1,74 x10 ⁸ Aa	9,03 x10 ⁸ ± 1,41 x10 ⁸ Aa
6 - PVP (1%)	9,00 x10 ⁸ ± 1,0 x10 ⁸ Ab	1,16 x10 ⁹ ± 7,81 x10 ⁷ ABa	8,37 x10 ⁸ ± 1,61 x10 ⁸ Ab	1,06 x10 ⁹ ± 1,32 x10 ⁸ Aab

Fonte: O próprio autor. *Desvio padrão não determinado devido à ausência na contagem de UFC nas diluições plaqueadas (10⁶ à 10⁸). As letras maiúsculas comparam as médias entre os protetores dentro de cada formulação (coluna), e minúsculas comparam as médias de cada protetor entre as formulação (linha) pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 9 - Concentrações celulares de Ab-V6 obtidas nas formulações 1, 2, 3 e 4 (Tabela 2) acrescidas de diferentes protetores: trealose (10 mM); glicerol (10 mM); amido de milho comercial (0,1%); CMC (0,3%); CMC (0,1%); PVP (1%), após 14 dias de armazenamento.

	Ab-V6 (UFC mL ⁻¹)			
	FORM1	FORM2	FORM3	FORM4
CONTROLE	1,70 x10 ⁷ ±2,60 x10 ⁶ Dab	5,37 x10 ⁷ ±1,30 x10 ⁷ Da	<10 ⁷ * Bb	3,78 x10 ⁷ ± 4,00 x10 ⁶ Bab
1 - Trealose (10 mM)	2,04 x10 ⁷ ±9,45 x10 ⁶ Db	5,61 x10 ⁸ ±4,66 x10 ⁷ Ba	3,85 x10 ⁷ ± 8,20 x10 ⁶ Bb	4,33 x10 ⁷ ± 8,67 x10 ⁶ Bb
2 - Glicerol (10 mM)	1,63 x10 ⁷ ± 3,23 x10 ⁶ Dc	1,15 x10 ⁸ ±1,61 x10 ⁷ Cb	3,63 x10 ⁷ ± 1,19 x10 ⁷ Bc	4,70 x10 ⁸ ± 7,15 x10 ⁷ Aa
3 - Amido de milho (0,1%)	2,05 x10 ⁸ ±5,51 x10 ⁶ Bb	7,05 x10 ⁸ ±3,88 x10 ⁷ Aa	3,89 x10 ⁷ ± 1,09 x10 ⁷ Bc	5,85 x10 ⁷ ± 5,14 x10 ⁶ Bc
4 - CMC (0,3%)	3,33 x10 ⁸ ±3,35 x10 ⁶ Aa	<10 ⁷ * Ec	<10 ⁷ * Bc	6,11 x10 ⁷ ±1,06 x10 ⁷ Bb
5 - CMC (0,1%)	2,22 x10 ⁷ ±9,87 x10 ⁶ Db	9,37 x10 ⁷ ±2,69 x10 ⁷ CDa	3,70 x10 ⁷ ± 1,37 x10 ⁷ Bb	3,96 x10 ⁷ ± 6,11 x10 ⁶ Bb
6 - PVP (1%)	1,01 x10 ⁸ ±4,85 x10 ⁶ Ca	1,09 x10 ⁸ ±2,36 x10 ⁷ Ca	1,10 x10 ⁸ ± 7,46 x10 ⁶ Aa	4,44 x10 ⁷ ± 1,77 x10 ⁷ Bb

Fonte: O próprio autor. *Desvio padrão não determinado devido à ausência na contagem de UFC nas diluições plaqueadas (10⁶ à 10⁸). As letras maiúsculas comparam as médias entre os protetores dentro de cada formulação (coluna), e minúsculas comparam as médias de cada protetor entre as formulações (linha) pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 10 - Concentrações celulares de Ab-V6 obtidas nas formulações 1, 2, 3 e 4 (Tabela 2) acrescidas de diferentes protetores: trealose (10 mM); glicerol (10 mM); amido de milho comercial (0,1%); CMC (0,3%); CMC (0,1%); PVP (1%), após 32 dias de armazenamento.

	Ab-V6 (UFC mL ⁻¹)			
	FORM1	FORM2	FORM3	FORM4
CONTROLE	<10 ⁷ * Bb	<10 ⁷ * Bb	<10 ⁷ * Ab	5,15 x10 ⁷ ±4,48 x10 ⁶ Aa
1 - Trealose (10 mM)	<10 ⁷ * Bb	<10 ⁷ * Bb	1,07 x10 ⁷ ±1,27 x10 ⁶ Ab	5,33 x10 ⁷ ±1,47 x10 ⁷ Aa
2 - Glicerol (10 mM)	<10 ⁷ * Bd	3,92 x10 ⁷ ±1,22 x10 ⁷ Ab	1,52 x10 ⁷ ± 3,39 x10 ⁶ Ac	5,59 x10 ⁷ ± 1,18x10 ⁷ Aa
3 - Amido de milho (0,1%)	1,70 x10 ⁷ ± 4,63 x10 ⁶ Ab	5,55 x10 ⁷ ±1,28 x10 ⁷ Aa	1,29 x10 ⁷ ± 2,31 x10 ⁶ Ab	4,78 x10 ⁷ ± 1,57x10 ⁷ Aa
4 - CMC (0,3%)	<10 ⁷ * Bb	<10 ⁷ * Bb	<10 ⁷ * Ab	4,85 x10 ⁷ ± 1,22x10 ⁷ Aa
5 - CMC (0,1%)	<10 ⁷ * Bb	<10 ⁷ * Bb	<10 ⁷ * Ab	5,15 x10 ⁷ ± 8,04x10 ⁶ Aa
6 - PVP (1%)	3,48 x10 ⁷ ± 5,60 x10 ⁶ Aa	4,07 x10 ⁷ ±6,12 x10 ⁶ Aa	<10 ⁷ * Ab	4,59 x10 ⁷ ± 1,11x10 ⁷ Aa

Fonte: O próprio autor. *Desvio padrão não determinado devido à ausência na contagem de UFC nas diluições plaqueadas (10⁶ à 10⁸). As letras maiúsculas comparam as médias entre os protetores dentro de cada formulação (coluna), e minúsculas comparam as médias de cada protetor entre as formulação (linha) pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O uso do glicerol, visando o aumento do tempo da viabilidade celular de *A. brasilense*, já foi relatado por Kumaresan e Reetha (2011), que, ao utilizarem esse polímero em uma concentração de 10 mM em formulação líquida de inoculante obtiveram concentração celular de $2,33 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ em até 11 meses de armazenamento em temperatura ambiente. O glicerol faz parte da composição das formulações 1, 3 e 4 como fonte de carbono e pode ter influenciado no crescimento das estirpes. Porém, para as formulações testadas, o uso do glicerol como um aditivo protetor acarretou em poucas mudanças na viabilidade celular, apresentando diferença significativa em relação ao controle, aos 32 dias de armazenamento somente para a estirpe Ab-V6 na formulação 2 (Tabela 10), única formulação onde o glicerol não fazia parte de sua composição inicial. Sendo assim a presença do glicerol em formulações líquidas é importante para o crescimento e manutenção celular de *A. brasilense*.

O amido de mandioca já foi utilizado para o cultivo de estirpes dos gêneros *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* com resultados superiores de crescimento celular em meio de cultivo com ausência do polímero (TITTABUTR et al., 2007). O uso de amido, juntamente com CMC, auxiliou na manutenção celular de *Bradyrhizobium* sp. inoculado em sementes, armazenadas por três semanas (Fernandes Junior et al., 2012). Nesse estudo, o uso de amido de milho auxiliou na manutenção celular de *Azospirillum brasilense* após 32 dias de armazenamento, da estirpe Ab-V6 quando adicionado à formulação 1, e de ambas as estirpes na formulação 2 (Tabelas 7 e 10).

Utilizando CMC (0,1% e 0,3%), a concentração celular ficou abaixo de 10^7 após 32 dias de armazenamento nas formulações, com exceção da formulação 4, porém, sem diferença significativa dos valores obtidos pelos outros protetores em Ab-V6 (Tabelas 7 e 10). O uso de uma concentração mais elevada do polímero (0,3%) não favoreceu significativamente no tempo de manutenção celular em relação à menor concentração, com exceção à formulação 1, estirpe Ab-V6, cuja concentração celular permaneceu em $3,33 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ após 14 dias armazenada (Tabela 9).

Em trabalho realizado por Leo Daniel et al. (2013), o uso de PVP (2%) em inoculantes contendo *A. brasilense* apresentou alta sobrevivência celular nos primeiros dez dias de armazenamento, mantendo a concentração celular em 10^{10} UFC mL⁻¹. Utilizando-se PVP nessa mesma concentração, Kumaresan e Reetha

(2011) observaram que a concentração de *A. brasilense* permaneceu em $1,33 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ em 11 meses de armazenamento. Apesar de neste estudo ter sido utilizada uma concentração de PVP inferior (1%) à encontrada na literatura, esse polímero influenciou positivamente na manutenção celular de Ab-V6 nas formulações 1 e 2 (tabela 10), e resultou em diferença de concentração significativa de Ab-V5 na formulação 4 após 32 dias de armazenamento, evidenciando sua importância na produção de inoculantes líquidos (Tabela 7).

Kumaresan e Reetha (2011) também utilizaram a trealose (10 mM) como protetor em inoculantes líquidos contendo *A. brasilense* e a concentração observada após 11 meses de armazenamento foi de $4,0 \times 10^8$ UFC mL⁻¹. Entretanto, o melhor resultado obtido neste estudo, utilizando a trealose, foi na formulação 2, com a estirpe Ab-V5, mantendo $4,59 \times 10^7$ UFC mL⁻¹, após 32 dias de armazenamento (Tabela 7).

Nesse contexto, observa-se que a adição de biopolímeros pode auxiliar na manutenção celular de *A. brasilense*, porém, a estirpe e a composição do meio de cultivo utilizado estão intimamente relacionadas à variabilidade dos resultados gerados por cada protetor.

Apesar dos resultados positivos obtidos pelo uso de protetores, a concentração celular caiu para 10^7 em 32 dias de armazenamento, ficando abaixo da concentração exigida para a comercialização de inoculantes à base de *A. brasilense* no Brasil, de $2,0 \times 10^8$ UFC mL⁻¹. Fatores como pH, temperatura de armazenamento, umidade e trocas gasosas podem ter afetado a viabilidade celular no decorrer do experimento. Nas tabelas 11, 12, 13 e 14 pode-se observar a variação de pH nas formulações durante os 32 dias de armazenamento. Essa mudança ocorre devido à presença de compostos resultantes do metabolismo e à produção de ácidos orgânicos, como ácido acético, láctico, glioxálico, málico, 2-oxoglutárico e β-hidroxibutírico (GOEBEL; KRIEG, 1984).

Nota-se que na formulação 3 (Tabela 13) o pH baixou em relação ao pH inicial do meio de cultura com ambas as estirpes, evidenciando uma grande produção de ácidos, provavelmente decorrentes da hidrólise da sacarose. As formulações 1, 2 e 4 (Tabelas 11, 12 e 14, respectivamente) apresentaram elevação do pH logo após o início do cultivo e no T2. Houve variações de pH no experimento, seguindo uma tendência de estabilização. Trujillo-Roldán et al. (2013) associaram o aumento do pH durante o armazenamento de uma formulação líquida de inoculante

contendo *A. brasilense* com a liberação de material intracelular ocorrido em função de lise celular e/ou a formação de subprodutos provenientes do consumo de PHB. As maiores alterações de pH durante o cultivo ocorreram nas formulações 1 e 4, chegando a atingir valor de ΔpH de 1,1. Já as formulações 2 e 3 apresentaram boa capacidade de tamponamento, com menores variações de pH.

Tabela 11 – Variação de pH na formulação 1 (Tabela 2). T1: pH logo após o cultivo; T2: pH após 14 dias de armazenamento; T3: pH após 32 dias de armazenamento

FORMULAÇÕES	Ab-V5					Ab-V6				
	T1	T2	ΔpH	T3	ΔpH	T1	T2	ΔpH	T3	ΔpH
F1 (controle)	6,9	7,3	0,4	7,4	0,5	7	7,2	0,2	7,4	0,4
F1+P1	6,8	7,1	0,3	7,4	0,6	6,9	7,4	0,5	7,4	0,5
F1+P2	6,8	7,1	0,3	7,4	0,6	6,8	7,2	0,4	7,4	0,6
F1+P3	6,8	7,2	0,4	7,5	0,7	6,9	7,7	0,8	7,5	0,6
F1+P4	6,8	7,2	0,4	7,4	0,6	6,8	7,6	0,8	7,4	0,6
F1+P5	6,8	7,9	1,1	7,4	0,6	6,9	7,5	0,6	7,4	0,5
F1+P6	6,8	7,6	0,8	7,4	0,6	6,9	8,0	1,1	7,4	0,5

Fonte: O próprio autor.

Tabela 12 – Variação de pH na formulação 2 (Tabela 2). T1: pH logo após o cultivo; T2: pH após 14 dias de armazenamento; T3: pH após 32 dias de armazenamento

FORMULAÇÕES	Ab-V5					Ab-V6				
	T1	T2	ΔpH	T3	ΔpH	T1	T2	ΔpH	T3	ΔpH
F2 (controle)	7,2	7,4	0,2	7,6	0,4	7,4	7,3	0,1	7,3	0,1
F2+P1	7,2	7,3	0,1	7,7	0,5	7,2	7,2	0	7,4	0,2
F2+P2	7,0	7,2	0,2	7,6	0,6	7,0	7,1	0,1	7,4	0,4
F2+P3	7,1	7,4	0,3	7,6	0,5	7,2	7,2	0	7,4	0,2
F2+P4	7,2	7,3	0,1	7,6	0,4	7,2	7,2	0	7,4	0,2
F2+P5	7,2	7,4	0,2	7,6	0,4	7,2	7,4	0,2	7,4	0,2
F2+P6	7,1	7,6	0,5	7,4	0,3	7,1	7,6	0,5	7,7	0,6

Fonte: O próprio autor.

Tabela 13 – Variação de pH na formulação 3 (Tabela 2). T1: pH logo após o cultivo; T2: pH após 14 dias de armazenamento; T3: pH após 32 dias de armazenamento.

FORMULAÇÕES	Ab-V5					Ab-V6				
	T1	T2	ΔpH	T3	ΔpH	T1	T2	ΔpH	T3	ΔpH
F3 (controle)	6,3	6,5	0,2	6,6	0,3	6,2	6,4	0,2	6,5	0,3
F3+P1	6,3	6,6	0,3	6,5	0,2	6,2	6,5	0,3	6,5	0,3
F3+P2	6,3	6,4	0,1	6,5	0,2	6,2	6,4	0,2	6,8	0,6
F3+P3	6,4	6,5	0,1	6,8	0,4	6,2	6,4	0,2	6,5	0,3
F3+P4	6,3	6,4	0,1	6,5	0,2	6,2	6,5	0,3	6,5	0,3
F3+P5	6,5	6,5	0	6,5	0	6,2	6,6	0,4	6,6	0,4
F3+P6	6,4	6,7	0,3	6,7	0,3	6,5	6,7	0,2	6,7	0,2

Fonte: O próprio autor.

Tabela 14 – Variação de pH na formulação 4 (Tabela 2). T1: pH logo após o cultivo; T2: pH após 14 dias de armazenamento; T3: pH após 32 dias de armazenamento.

FORMULAÇÕES	Ab-V5					Ab-V6				
	T1	T2	Δ pH	T3	Δ pH	T1	T2	Δ pH	T3	Δ pH
F4 (controle)	6,7	7,7	1,0	7,6	0,9	6,8	7,9	1,1	7,6	0,8
F4+P1	6,8	7,7	0,9	7,5	0,7	6,9	7,9	1,0	7,6	0,7
F4+P2	6,7	7,8	1,1	7,6	0,9	6,9	7,8	0,9	7,7	0,8
F4+P3	6,8	7,7	0,9	7,5	0,7	6,9	7,8	0,9	7,6	0,7
F4+P4	6,7	7,6	0,9	7,5	0,8	6,8	7,8	1,0	7,5	0,7
F4+P5	6,8	7,7	0,9	7,5	0,7	6,8	7,8	1,0	7,6	0,8
F4+P6	6,8	7,7	0,8	7,3	0,5	6,9	7,5	0,6	7,4	0,5

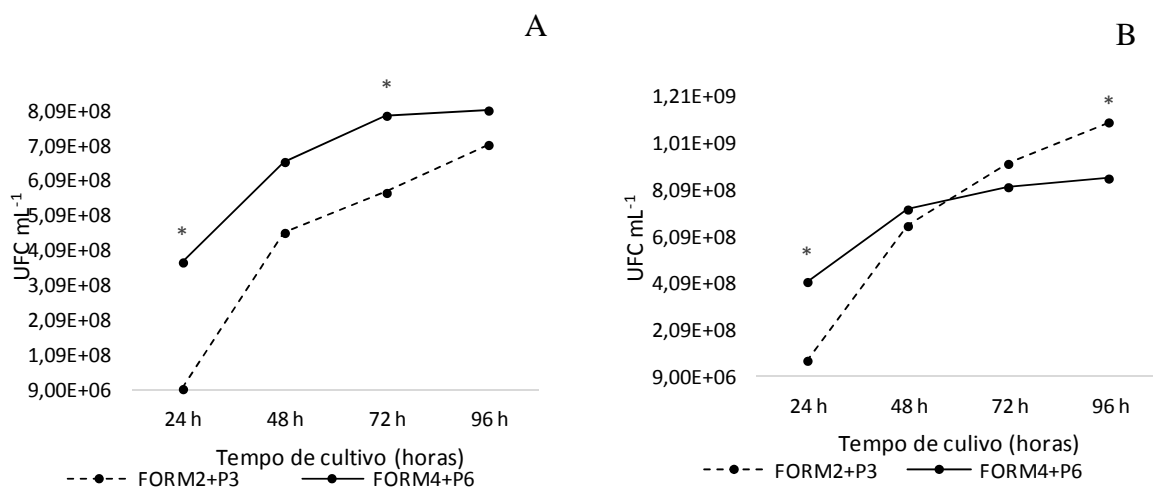
Fonte: O próprio autor.

Com base nos resultados obtidos, a formulação, 2 acrescida de amido de milho (FORM2+P3) e a formulação 4 acrescida de PVP (FORM4+P6) foram escolhidas para dar continuidade ao estudo.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DO CRESCIMENTO DE Ab-V5 E Ab-V6

Objetivando-se uma melhor avaliação do comportamento das estirpes Ab-V5 e Ab-V6, de *Azospirillum brasilense*, durante o cultivo nas formulações FORM2+P3 e FORM4+P6, foi realizado um estudo do crescimento celular durante 96 horas de cultivo (Figuras 2 e 3). A concentração celular obtida revelou diferenças no comportamento das estirpes nas diferentes formulações. No primeiro tempo de cultivo, 24 horas, houve diferença significativa da concentração celular de ambas as estirpes nas duas formulações. O crescimento da estirpe Ab-V5 foi semelhante nas duas formulações e ao final das 96 horas de cultivo as concentrações celulares obtidas não diferiram significativamente. A estirpe Ab-V6 apresentou crescimento diferenciado quando cultivada na formulações FORM2+P3 e FORM4+P6, atingindo maior concentração celular ($1,01 \times 10^9$ UFC mL⁻¹) após 96 horas de cultivo na FORM2+P3, diferindo significativamente da concentração alcançada na FORM4+P6, nesse mesmo período de cultivo. Portanto, a FORM2+P3 proporciona ótimas condições de crescimento da estirpe Ab-V6, atingindo elevada concentração celular ao final do cultivo.

Figura 2 – Crescimento de Ab-V5 e Ab-V6 nas formulações FORM2+P3 e na FORM4+P6. A: Ab-V5; B: Ab-V6.

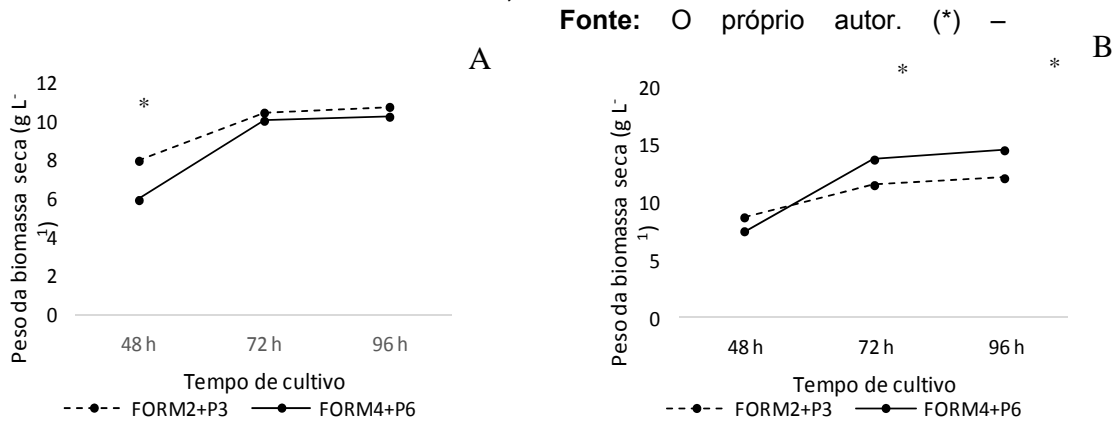


Fonte: o próprio autor. (*) – concentrações que diferiram significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

5.4 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIBUTIRATO (PHB)

O acúmulo de polímeros de reserva, como o PHB, realizado por células bacterianas, é uma forma de armazenamento de carbono e energia, quando há um desequilíbrio no suprimento de nutrientes. Essa atividade pode aumentar a sobrevivência bacteriana em condições ambientais adversas (KADOURI et al., 2005, BHAT; SUBIN, 2015). Nas figuras 4, 5 e 6 estão apresentados os resultados de produção de biomassa e PHB, obtidos durante o cultivo das estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *A. brasilense* nas formulações FORM2+P3 e FORM4+P6.

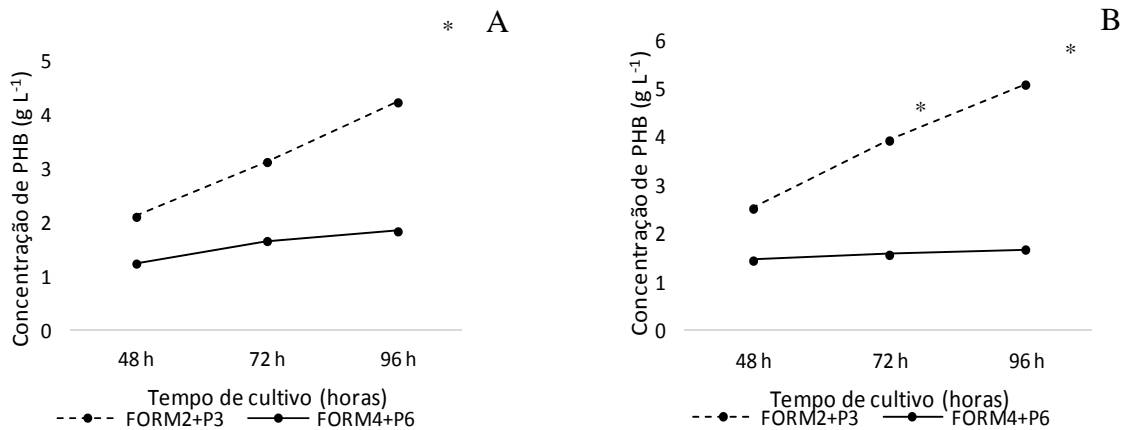
Figura 3 - Produção de biomassa pelas estirpes durante 96 horas de cultivo em FORM2+P3 e FORM4+P6. A: Ab-V5; B: Ab-V6.



concentrações que diferiram significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

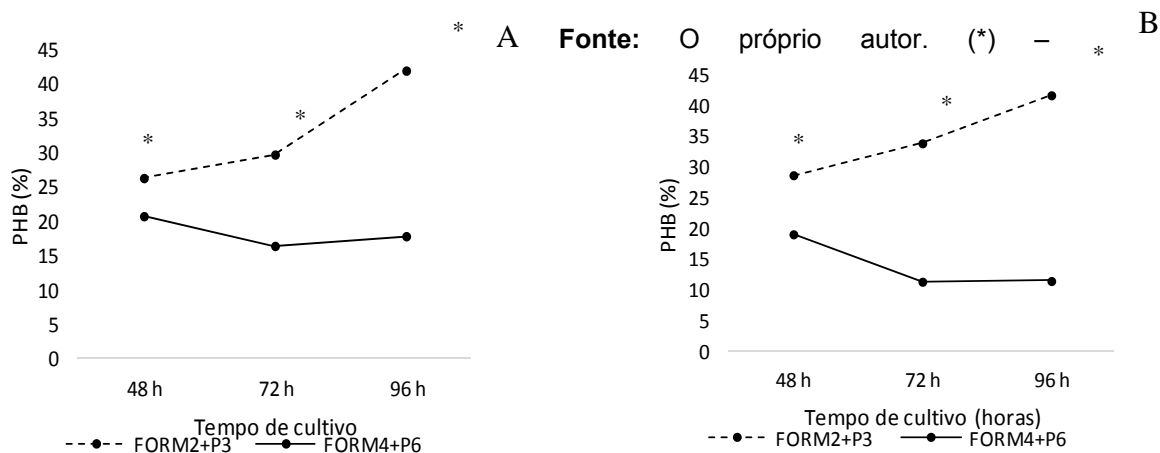
concentrações que diferiram significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Figura 4 - Concentração absoluta de PHB pelas estirpes durante 96 horas de cultivo em FORM2+P3 e FORM4+P6. A: Ab-V5; B: Ab-V6.



Fonte: O próprio autor. (*) – concentrações que diferiram significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Figura 5 – Concentração relativa intracelular de PHB pelas estirpes durante 96 horas de cultivo em FORM2+P3 e FORM4+P6. A: Ab-V5; B: Ab-V6.



concentrações que diferiram significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Pode-se observar um aumento gradual da biomassa seca, bem como da produção de PHB durante o tempo de cultivo em todos os tratamentos. A concentração de PHB variou de 2,11 a 5,10 g L⁻¹ na FORM2+P3 e de 1,24 à 1,68 g L⁻¹ na FORM4+P6, evidenciando que a FORM2+P3 foi capaz de proporcionar maior produção de PHB por ambas as estirpes. Essa variação da produção de PHB está relacionada à composição das formulações e às características individuais do metabolismo cada estirpe. Um estudo da produção de PHB pela estirpe de *Azospirillum* MTCC – 125 resultou em 0,13 g L⁻¹ de PHB (JOE et al., 2009). Já a estirpe *A. lipoferum* Az-204 foi capaz de produzir 3,8 mg de PHB por grama de peso seco da bactéria (VENDAN; THANGARAJU, 2007). Kamnev et al. (2012) observaram indução de síntese e acúmulo de PHB pela estirpe Sp7 de *A. brasilense* ao adicionarem cobre ao meio tradicionalmente utilizado para cultivo dessas estirpes, corroborando a hipótese de que a produção de PHB está intimamente relacionada à composição meio de cultivo.

A relação entre a massa de biomassa seca e a concentração absoluta de PHB possibilitou a obtenção de valores referentes a concentração relativa intracelular de PHB (%), que variaram entre 11,36% e 42,06% da massa seca das bactérias. No estudo de Kamnev et al. (2012), após dois dias de cultivo em meio com deficiência de N e ausência de malato, os valores de PHB obtidos pelas estirpes Sp7 e Sp245 foram de 24% e 32% da massa seca celular, respectivamente. Valores próximos foram obtidos no trabalho de Fallik e Okon (1996), cuja porcentagem de PHB intracelular de *A. brasilense* chegou a 40%.

Para a FORM2+P3, a maior concentração absoluta e relativa intracelular de PHB (%) para ambas as estirpes ocorreram às 96 h de cultivo. Na FORM4+P6, a maior concentração absoluta de PHB também aconteceu às 96 h de cultivo, porém, a maior concentração relativa intracelular de PHB (%) aconteceu ainda no início do cultivo, às 48 h, durante a fase de crescimento exponencial, valores estes que diminuiram durante as horas seguintes. Essa variação de PHB intracelular pode estar relacionada ao consumo desse biopolímero pela célula. A variação da quantidade de PHB acumulada já foi relatada por Ratcliff; Kadam e Denison (2008), quando a bactéria *Sinorhizobium meliloti* foi cultivada em condições de escassez de nutrientes.

Segundo Tal e Okon (1985), a síntese de PHB é favorecida sob limitação de oxigênio e pela relação carbono/nitrogênio (C/N) do meio de cultura. Em estudo realizado por Belal (2013) a melhor proporção C/N para a produção de PHB por *Rhizobium elti* E1 e *Pseudomonas stutzeri* E114 foi de 20:1. Essa mesma proporção foi responsável pela maior produção de PHB por *Bacillus cereus* (BELAL; FARID, 2016). Esse fato pode estar relacionado à alta produção de PHB na FORM2+P3, cuja relação C/N é 15:1 enquanto que na FORM4+P6 essa relação é de 6:1.

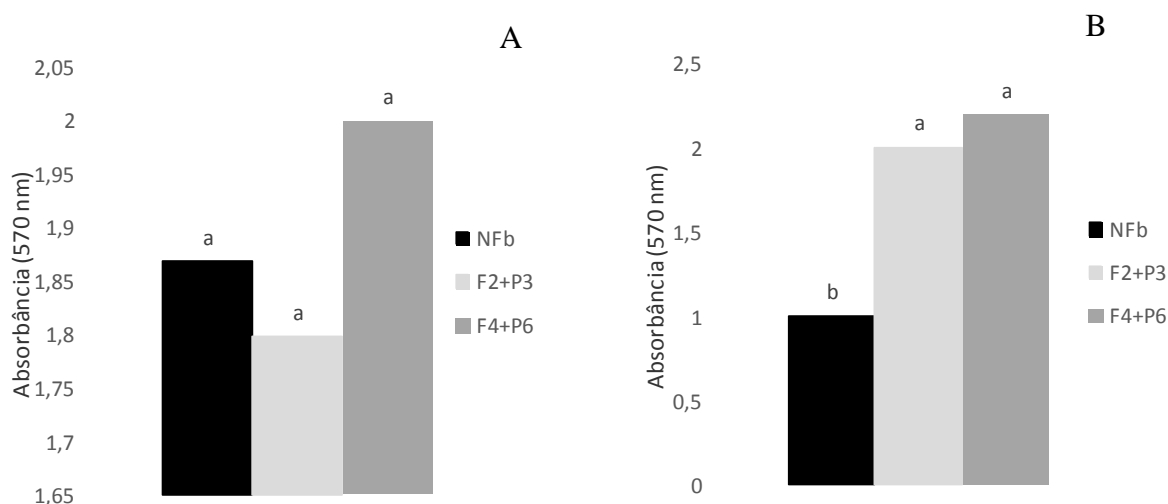
Esses resultados sugerem que as formulações desenvolvidas são favoráveis à produção de PHB pelas estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *A. brasilense*, podendo atuar positivamente na manutenção da viabilidade celular dessas estirpes. Quando comparadas, a formulação FORM2+P3 mostra-se mais propícia para a produção de PHB pelas estirpes Ab-V5 e Ab-V6.

5.5 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOFILME

O termo biofilme é utilizado para definir uma comunidade microbiana cujas células estão ligadas a um substrato ou entre si, embutidas em uma matriz de substâncias poliméricas. A estrutura do biofilme pode conferir ao microrganismo características de um organismo multicelular, garantindo vantagens para a população bacteriana como resistência em condições ambientais desfavoráveis e agentes antimicrobianos, aumentando sua sobrevivência (DONLAN; COSTERTON, 2002; STANLEY; LAZAZZERA, 2004). Outra possível vantagem relacionada à produção de biofilmes é a capacidade dessa estrutura em conferir às bactérias tolerância à radiação UV (ELASRI; MILER, 1999).

A avaliação da produção de biofilme por Ab-V5 e Ab-V6, quando cultivadas nas formulações FORM2+P3 e FORM4+P6, foi realizada em comparação à produção de biofilme pelas estirpes em meio NFb. Os valores de absorvância obtidos estão representados na figura 6. A estirpe Ab-V5 apresentou produção de biofilme semelhante nos três meios de cultivo avaliados, enquanto que a produção de biofilme pela estirpe Ab-V6 foi menor em meio NFb e alcançou elevada produtividade quando cultivada nas formulações FORM2+P3 e FORM4+P6. Esses resultados indicam que a composição das novas formulações é mais adequada para a síntese de biofilme pela estirpe Ab-V6.

Figura 6 - Valores de absorvância a 570 nm para a produção de biofilme pelas estirpes Ab-V5 e Ab-V6 em meio NFb, FORM2+P3 e FORM4+P6. As letras comparam as médias entre as formulações pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. A: Ab-V5; B: Ab-V6.



Fonte: O próprio autor.

Segundo Donlan e Costerton (2002) e Recouvreux (2004), alguns parâmetros podem influenciar a produção de biofilme, como a composição do meio, disponibilidade de nutrientes, temperatura de cultivo, espécie microbiana e número de células. A composição do meio NFb, relativamente mais pobre em nutrientes com relação às formulações testadas, proporcionou menor produção de biofilme pela estirpe Ab-V6. Esse resultado corrobora à ideia proposta por O'Toole, Kaplan, Kolter, (2000), de que quando há disponibilidade adequada de nutrientes, as bactérias promovem constante desenvolvimento de biofilme.

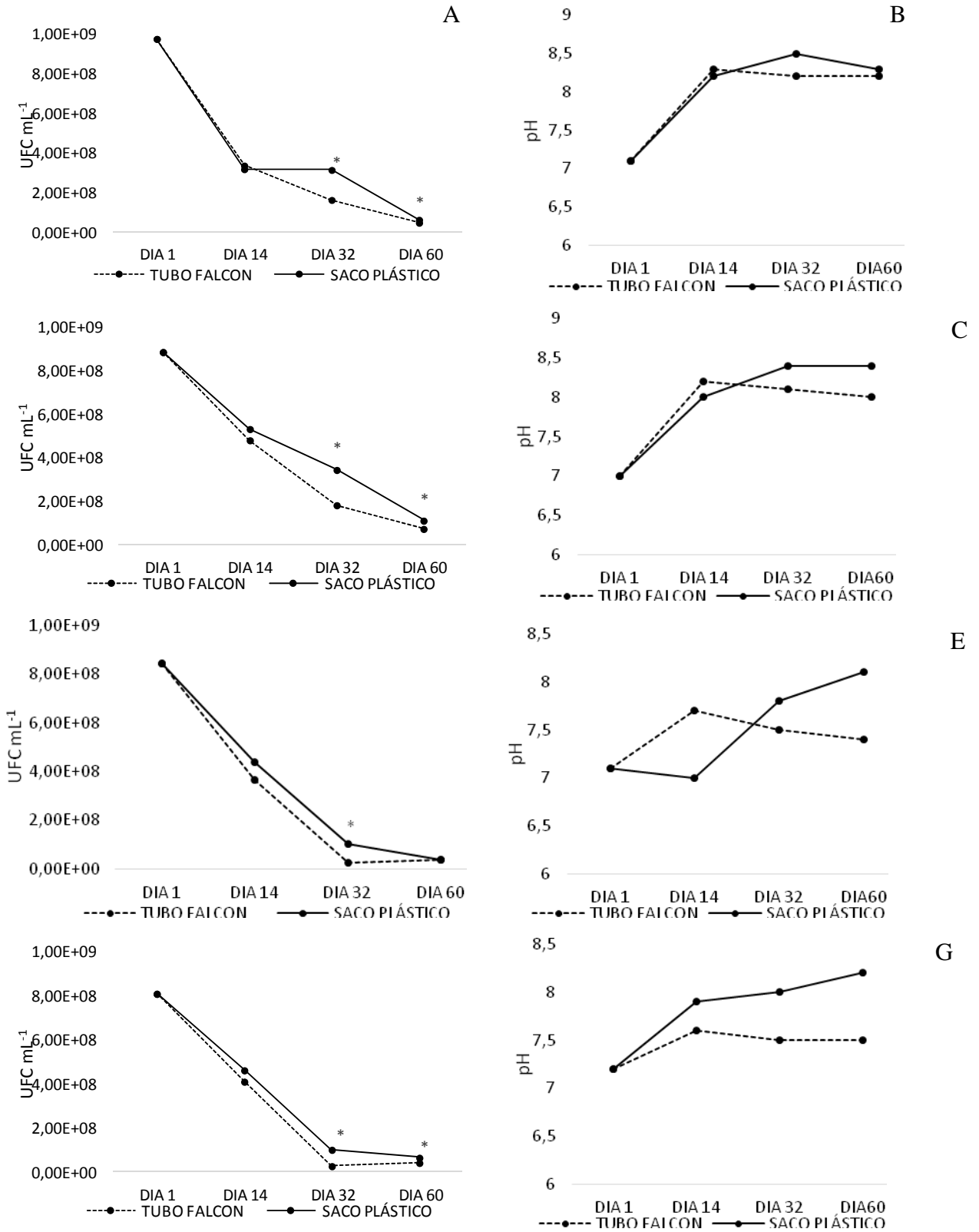
Recouvreur (2004) sugere que microrganismos formadores de biofilme, quando em condições ricas em nutrientes, podem retornar ao modo de vida móvel quando a disponibilidade de nutrientes se torna escassa, uma provável resposta à busca por novas fontes de nutrientes. Por outro lado, já foi observado em outras espécies bacterianas, como *Myxococcus xanthus* e *Escherichia coli* O517, que a formação de biofilme é induzida por baixa concentração de nutrientes; nesses estudos, as estirpes deixaram o modo de vida móvel em resposta à escassez de nutrientes no meio (O'TOOLE; KAPLAN; KOLTER 2000). Sendo assim, a transição entre o modo de vida móvel e não móvel está relacionada com a disponibilidade de nutrientes, sendo a formação de biofilme regulada por diferentes sinais moleculares entre espécies bacterianas (STANLEY; LAZZERA, 2004).

Em bactérias associativas, como *Azospirillum brasilense*, a formação de biofilme, bem como a produção de polissacarídeos de superfície, exopolissacarídeos e lipopolissacarídeos é fundamental para que ocorra o processo de colonização da superfície da raiz da planta hospedeira (RINAUDI; GIORDANO, 2010; SANTI, BOGUSZ, FRANCHE, 2013). A colonização das plantas por esse tipo de microrganismo ocorre pela migração das bactérias em direção à raiz por quimiotaxia, seguida de adsorção e ancoragem ao sistema radicular, ocorrendo proliferação microbiana e formação de micro colônias, as quais se fixam às raízes mediante a formação de biofilme (SANTI, BOGUSZ, FRANCHE, 2013). Nesse contexto, um bom inoculante deve apresentar mecanismos que facilitem a colonização da planta hospedeira pelo microrganismo, portanto, a produção de biofilme nesse suporte pode ser importante para a eficácia do produto. Porém, deve-se considerar que a formação de biofilme ainda no cultivo é apenas uma análise do potencial de produção dessa estrutura pelas estirpes em determinadas condições, sendo necessária a realização de ensaios a campo fim de se observar a real capacidade de formação do biofilme na associação com a planta hospedeira fim de comprovar sua importância na produção de inoculante.

5.6 AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA CELULAR EM DIFERNTES VEÍCULOS DE ARMAZENAMENTO

Objetivando-se aumentar o tempo de sobrevivência celular, as formulações passaram a ser armazenadas em sacos plásticos utilizados pela indústria de inoculantes. Após 32 dias de armazenamento, a concentração celular de Ab-V5 e Ab-V6, apresentou diferença significativa com relação ao material utilizado como embalagem, nas duas formulações. Após 60 dias, a diferença significativa manteve-se para ambas as estirpes na FORM2+P3 e para Ab-V6 na FORM4+P6. A figura 7 representa a concentração celular e o pH do meio das estirpe Ab-V5 e Ab-V6 nas formulações FORM2+P3 e FORM4+P6 em diferentes embalagens de armazenamento, durante 60 dias.

Figura 7 - Concentração celular e valores de pH. A e B: Ab-V5 na FORM 2+P3; C e D: Ab-V6 na FORM 2+P3; E e F: Ab-V5 na FORM4+P6; G e H: Ab-V6 na FORM4+P6.



Fonte: o próprio autor. (*) - tratamentos que diferiram significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

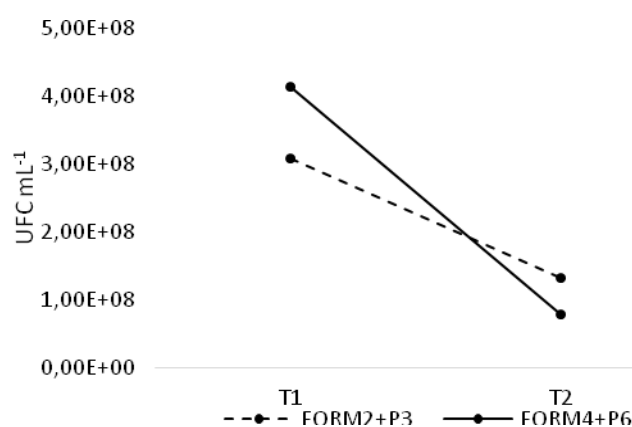
Foi observado aumento de viabilidade das células quando armazenadas em sacos plásticos. Esse resultado está relacionado ao fato de que o plástico do saco utilizado permite trocas gasosas com o meio externo, proporcionando à cultura maior contato com oxigênio atmosférico, favorecendo sua sobrevivência nesse suporte. Em contrapartida, autores relatam que a sobrevivência celular utilizando-se esse meio de armazenamento pode ser prejudicada pela ocorrência de perda de água, resultando em desidratação, seguida da morte celular (FENG; ROUGHLEY; COPELAND, 2002). Em nosso estudo, a desidratação foi amenizada através do uso de glicerol na composição inicial das formulações e dos polímeros amido e PVP como protetores. Por apresentarem boa capacidade de absorção de água, amido, PVP e glicerol atuam como agente hidratante, impedindo a perda de água pelas células (BUSHBY; MARSHALL, 1977; TEMPRANO et al., 2002).

Os valores de pH ao final do cultivo e após 14, 32 e 60 dias de armazenamento estão presentes na figura 7 B, D, F e H. Observa-se que o pH se manteve mais elevado, após 32 dias de armazenamento, nas formulações mantidas em saco plástico. A maior concentração de células nesses tratamentos pode ter influenciado no maior aumento de pH, devido à maior presença de compostos resultantes do metabolismo celular.

5.7 CULTIVO DAS FORMULAÇÕES EM ESCALA SEMI-PILOTO

O cultivo das estirpes AbV5 e AbV6 na FORM2+P3, em fermentador, ocorreu por 24 horas. Após esse período, a formulação atingiu uma concentração celular de $3,07 \times 10^8$ UFC mL⁻¹, porém, após 30 dias de armazenamento a concentração caiu para $1,33 \times 10^8$ UFC mL⁻¹. O cultivo da FORM4+P6 teve duração de 48 horas, atingindo concentração celular de $4,15 \times 10^8$ UFC mL⁻¹, logo após o cultivo e de $7,81 \times 10^7$ UFC mL⁻¹ após 30 dias armazenada em sacos plásticos de polietileno de baixa densidade em temperatura ambiente (Figura 8).

Figura 8 – Crescimento de *A. brasilense* (Ab-V5 e Ab-V6) nas formulações FORM2+P3 e FORM4+P6 em fermentador. T1- Concentração celular ao final do cultivo; T2- Concentração celular após 30 dias de armazenamento.



Fonte: O Próprio autor.

A diferença no tempo de cultivo das formulações aconteceu devido à floculação no meio, sendo a fermentação interrompida após o início da floculação. Segundo Bahat-Samet, Castro-Sowinski e Okon, (2004), a agregação bacteriana e floculação, é de grande interesse na produção, armazenamento e sobrevivência bacteriana de inoculantes. *A. brasilense* apresenta a capacidade de agregar e flocular, e estas propriedades podem afetar positivamente sua sobrevivência no solo, tornando seus inoculantes propícios para aplicação na agricultura (BURDMAN; OKON; JURKEVITCH, 2000). Apesar da floculação ser uma boa característica do inoculante, ela impediria que a contagem celular ocorresse de forma precisa, uma vez que aglomeradas as células, sua separação é dificultada, podendo gerar resultados de contagem de UFC mL⁻¹ incorretos. Portanto, optou-se por interromper a fermentação após 24 horas de cultivo para a FORM2+P3 e 48 horas para a FORM4+P6.

As duas formulações desenvolvidas apresentaram bons resultados quanto a produção em escala semi-piloto, atingindo alta concentração celular ao final do cultivo, e presença de floculação. A concentração celular na FORM2+P3 permaneceu acima de 1×10^8 UFC mL⁻¹ após 30 dias armazenadas. Como sugestão para próximos estudos, há a necessidade de avaliação do desempenho dessas formulações no campo e em períodos maiores de armazenamento (6 meses).

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos nesse trabalho pode-se concluir que:

- As quatro formulações apresentadas neste trabalho são capazes de promover maior crescimento celular das estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *Azospirillum brasilense*, em relação ao meio NFb.
- O uso de amido de milho comercial e PVP como aditivos incrementa o tempo de viabilidade celular de ambas as estirpes nas novas formulações.
- Ambas as estirpes de *A. brasilense* apresentam capacidade de produção de PHB e de biofilme quando cultivadas em duas das formulações acrescidas de protetores, FORM2 mais amido e FORM4 mais PVP. As estirpes foram capazes de produzir mais PHB quando cultivadas na FORM2+P3.
- Para um maior tempo de viabilidade celular, o inoculante deve ser acondicionado em material que permita trocas gasosas com o ambiente. Nesses casos o uso de protetores na formulação pode ajudar a prevenir a dessecação celular.
- As formulações FORM2+P3 e FORM4+P6 se mostraram capazes de serem produzidas em escala semi-piloto, proporcionando agregação e floculação das células. A FORM2+P3 manteve o nível celular em 10^8 UFC mL⁻¹ por pelo menos 30 dias.

REFERÊNCIAS

ALBAREDA, M.; RODRIGUEZ-NAVARRO, D. N.; CAMACHO, M.; TEMPRANO, F. J. Alternatives to peat as a carrier for rhizobia inoculants: solid and liquid formulations. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 2771-1779, 2008.

ANPII - Associação Nacional dos Produtores e Importadores de Inoculantes. Disponível em: < <http://www.anpii.org.br/congresso-debate-microrganismos-no-futuro-da-lavoura>>. Acesso em 30 dez. 2016.

ARAÚJO, E. DE O.; VITORINO, A. C. T.; MERCANTE, F. M.; DANIELI, P.; NUNES, D. P.; SCALON, S. DE P. Qualidade de sementes de milho em resposta à adubação nitrogenada e à inoculação com bactérias diazotróficas. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias (Agraria)**, v. 9, n. 2, p. 159-165, 2014.

ARAÚJO, S. C. A inoculação de leguminosas - aumento da produtividade com a fixação biológica de nitrogênio. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.1, n. 3, p. 8-10, 1997.

ARAÚJO, S. C. **A evolução da produção de inoculantes no Brasil**. 2013a. Disponível em: <<http://www.anpii.org.br/site/conteudo/artigo/1,0,33+A-evolucao-da-producao-de-inoculantes-no-Brasil.html>>. Acesso em: 15 nov. 2015.

ARAÚJO, S. C. **Aumento do uso de inoculante no Brasil**. 2013b. Disponível em: <<http://www.anpii.org.br/site/conteudo/artigo/1,0,35+Aumento-no-uso-de-inoculante-no-Brasil.html>>. Acesso em: 15 nov. 2015.

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, 2004.

BARASSI, C. A.; SUELDO, R. J.; CREUS, C. M.; CARROZZI, L. E.; CASANOVAS, W. M.; PEREYRA, M. A. Potencialidad de *Azospirillum* en optimizer el crecimiento vegetal bajo condiciones adversas. In: CASSÁN, F.D.; GARCIA DE SALAMONE, I. (Ed.) ***Azospirillum sp.*: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina**. Buenos Aires: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p.49-59.

BÁRBARO, I. M.; BRANCALIÃO, S. R.; TICELLI, M.; MIGUEL, F. B.; SILVA, J. A. A. Técnica alternativa: co-inoculação de soja com *Azospirillum* e *Bradyrhizobium* visando incremento de produtividade. 2008. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2008_4/coinoculacao/index.htm>. Acesso em: 29 dez. 2016.

BARILLI, D. R. Eficiência na inoculação do milho com *Azospirillum brasilense* em diferentes períodos antes da semeadura. In: VII CONGRESSO BRASILEIRO DE AGROECOLOGIA, 2011, Fortaleza-CE. **Anais Cadernos de Agroecologia**, 2011. p. 1-5.

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.; PRABHU, S. R.; HERNANDEZ, J. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). **Plant and Soil**, v. 378, p. 1–33, 2014.
- BASHAN, Y; 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, p. 963-969, 2011.
- 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.
- BELAL, E. B.; FARID, M. A. Production of poly- β -hydroxybutyric acid (PHB) by *Bacillus cereus*. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 5, n. 7, p. 442-460, 2016.
- BEN REBAH, F.; PRÉVOST, D.; YEZZA, A.; TYAGI, R. D. Agro-industrial waste materials and wastewater sludge for rhizobial inoculant production: a review. **Bioresource Technology**, New York, v. 98, n. 18, p. 3535-3546, 2007.
- BERG, G. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, n. 1, p. 11-18, 2009.
- BERGAMASCHI, C. **Ocorrência de bactérias diazotróficas associadas a raízes e colmos de cultivares de sorgo**. 2006. 71 fls. Dissertação (Mestrado em Microbiologia agrícola e do ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Porto Alegre- RS, 2006.
- BEZIRGANOGLU, I.; HWANG, S.; FANG, T. J.; SHAW, J. Transgenic lines of melon (*Cucumis melo* L. var. *makuwa* cv. 'Silver Light') expressing antifungal protein and chitinase genes exhibit enhanced resistance to fungal pathogens. **Plant Cell Tissue and Organic Culture**, v.112, p. 227–237, 2013.
- BHAT, S. G.; SUBIN, R. S.; Bacterial polyhydroxyalkanoates production and its applications. In: BHAT, S. G.; NAMBIAN, P. **Microbial bioproducts**. 1. ed. Kerala, India: Directorate of Public Relation and Publication, 2015. p. 70-96.
- BHATTACHARJEE, R; DEY, U. Biofertilizer, a way towards organic agriculture: A review. **African Journal of Microbiology Research**, v. 2, n. 24, p. 2332-2342, 2014.
- BRACCINI, A. L.; DAN, L. G. M.; PICCININ, G. G.; ALBRECHT, L. P.; BARBOSA, M. C.; ORTIZ, A. H. T. Seed inoculation with *Azospirillum brasilense*, associated with the use of bioregulators in maize. **Revista Caatinga**, v. 25, n. 2, p. 58-64, 2012.
- BRAHMAPRAKASH, G. P.; SAHU, P. K. Biofertilizers for sustainability. **Journal of the Indian Institute of Science**, v. 92, p. 26, 2012.
- BRZEZINSKI, C. R.; ZUCARELI, C.; HENNING, F. A.; PRANDO, A. M.; GASPARETTO, C. A. S.; ABATI, J.; HENNING, A. A. **Doses de nitrogênio e inoculação com *Azospirillum* na qualidade fisiológica e sanitária de sementes de trigo**. 2015. Disponível em:
<<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1003896/1/Dosesdenitrogenioeino>

culacaocomazospirillumnaqualidadefisiologicaesanitariadesementesdetrigo.PDF>. Acesso em: 25 nov. 2015.

BUCHER, C. A.; REIS, V. M. **Biofertilizante contendo bactérias diazotróficas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2008. 17 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 247).

BULEGON, L. G.; GUIMARÃES, V. F.; EGEWARTH, V. A.; SANTOS, M. G.; HELING, A. L.; FERREIRA, S. D.; WENGRAT, A. P. DA S.; BATTISTUS, A. G. Crescimento e trocas gasosas no período vegetativo da soja inoculada com bactérias diazotróficas. **Nativa**, v. 4, n. 5, p. 277-286, 2016.

BULGARELLI, D.; SCHLAEPPI, K.; SPAEPEN, S.; VAN THEMAAT, E. V. L.; SCHULZE-LEFERT, P. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, p. 807-838, 2013.

BURDMAN, S.; KIGEL, J.; OKON, Y. Effects of *Azospirillum brasilense* on nodulation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Soil Biology Biochemistry**, Elmsford, v. 29, n. 6, p. 923-929, 1997.

BURDMAN, S.; JURKEVITCH, E.; SHWARTSBURD, B.; HAMPEL, M.; OKON, Y. Aggregation in *Azospirillum brasilense*: effects of chemical and physical factors and involvement of extracellular components. **Microbiology**, v. 144, p. 1989-1999, 1998.

BURDMAN, S.; OKON, Y.; JURKEVITCH, E. Surface characteristics of *Azospirillum brasilense* in relation to cell aggregation and attachment to plant roots. **Critical Review in Microbiology**, v. 26, p. 91 –110, 2000.

BURDMAN, S.; JURKEVITCH, E.; SORIA-DÍAZ, M. E.; SERRANO, A. M. G.; OKON, Y. Extracellular polysaccharide composition of *Azospirillum brasilense* and its relation with cell aggregation. **FEMS Microbiology Letters**, v.189, p. 259-264, 2000.

BUSHBY, H. V. A.; MARSHALL, K. C. Some factors affecting the survival of root nodule bacteria on dissection. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 9, p. 143-147, 1977.

CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ V., V. H.; BARROS, R. L. F. F.; CANTARUTTI, R. B.; NEVES, J. C. L. (ed.). **Fertilidade do solo**. Viçosa: SBCS, 2007. p. 376-470.

CANTARELLA, H.; DUARTE, A. P. Manejo da fertilidade do solo para a cultura do milho. In: GAL VÃO, J.C.C.; MIRANDA, G.V. (eds.) **Tecnologias de produção do milho**. Viçosa: UFV, 2004. p. 139-182.

CAPPELLI, G.; RICARDI, M.; RAVERA, F.; LIGABUE, G.; BALLESTRI, M.; BONUCCHI, D.; BONDI, M. Biofilm on artificial surfaces. **Contributions for Nephrology**, v. 154, p. 61-71. 2007.

CARDOSO, I. C. M. **Ocorrência e diversidade de bactérias endofíticas do gênero *Azospirillum* na cultura do arroz irrigado em Santa Catarina**. 2008. 75 fls. Dissertação (Mestrado em Manejo de Solo) - Universidade Estadual de Santa Catarina, Lages, SC. 2008.

CARRER, H.; BARBOSA, A. L.; RAMIRO, D. A. Biotechnology in agriculture. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 70, p. 149-164, 2010.

CASSÁN, F.; PERRIG, D.; SGROY, V.; MASCIARELLI, O.; PENNA, C.; LUNA, V. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). **European Journal of Soil Biology**, Braunschweig, v. 45, n. 1, p. 28–35, 2009.

CASSETARI, A. DE S. **Fixação biológica de nitrogênio em cana-de-açúcar inocula com bactérias diazotróficas**. 2015. 161 fls. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo- Escola Superior de agricultura “Luiz de Queiróz”. Piracicaba, 2015.

CONCEIÇÃO, P. M.; VIEIRA, H. D.; CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L.; CONCEIÇÃO, P. S. Efeito dos ácidos húmicos na inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em sementes de milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, p. 1880-1883, 2009.

CORREA, O. S.; ROMERO, A. M.; SORIA, M. A.; DE ESTRADA, M. *Azospirillum brasilense*-plant genotype interactions modify tomato response to bacterial diseases, and root and foliar microbial communities. In: CASSÁN, F. D.; GARCIA, I. S. (eds). ***Azospirillum sp.*: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina**. Buenos Aires: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p. 85-94.

CORTÉS-PATIÑO, S.; BONILLA, R. R. Polymers selection for a liquid inoculant of *Azospirillum brasilense* based on the Arrhenius thermodynamic model. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 33, p. 2547-2553, 2015.

COSTA, R. R. G. F.; QUIRINO, G. S. F.; NAVES, D. C. F.; SANTOS, C. B.; ROCHA, A. F. S. Efficiency of inoculant with *Azospirillum brasilense* on the growth and yield of second-harvest maize. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 45, n. 3, p. 304-311, set. 2015.

COSTA, S. S.; RODRIGUES, A. DE J.; SILVA, J. A. B.; FONTANA, R. L. M. Uma abordagem da agricultura sobre os modos de produção. **Cadernos de Graduação**, v. 2, n. 2, p. 231-242, 2014.

CROZIER, A.; ARRUDA, P.; JASMIM, J. M.; MONTEIRO, A. M.; SANDBERG, G. Analysis of indole-3-acetic acid and related indóis in culture medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 2833-2837, 1988.

CROWE, J. H.; CROWE, L. M.; CHAPMAN, D. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. **Science**, v. 223, p. 701–703, 1984.

CROWE, L. M.; REID, D. S.; CROWE, J. H. Is trehalose special for preserving dry biomaterials? **Biophysical Journal**, v. 71, p. 2087-2093, out. 1996.

DAMASCENO, R. G. **Comparação e desenvolvimento de metodologias para o controle de qualidade de inoculantes**. 2011. 65 fls. Dissertação (Mestrado em

Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2011.

DARTORA, J.; GUIMARÃES, V. F.; MARINI, D.; SANDER, G. Adubação nitrogenada associada à inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* na cultura do milho. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 17, n. 10, p. 1023–1029, 2013.

DE MELLO, N. **Inoculação de *Azospirillum brasilense* nas culturas de milho e trigo**. 2012. 90 fls. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade de Passo Fundo - Faculdade De Agronomia e Medicina Veterinária, Passo Fundo, 2012.

DEAKER, R., ROUGHLEY, J. D.; KENNEDY, I. Legume seed inoculation technology: a review. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, n. 8, p. 1275–1288, 2004.

DEAKER, R.; ROUGHLEY, J. D.; KENNEDY, I. Desiccation tolerance of rhizobia when protected by synthetic polymers. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, n. 2, p. 573– 580, 2007.

DENARDIN, N. D. Aplicação de inoculantes define sucesso da nodulação. **Visão Agrícola**, n. 5, p. 35-37, 2006.

DI PALMA, A. A ; PEREYRA, C. M.; MORENO RAMIREZ, L.; XIQUI VÁZQUEZ, M. L.; BACA, B. E.; PEREYRA, M. A.; LAMATTINA, L.; CREUS, C. M. Denitrification-derived nitric oxide modulates biofilm formation in *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiololy Letters**, v. 338, p. 77–85, 2012.

DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F.O. **Nitrogen-fixing bacteria in nonleguminous crop plants**. 1ed. Madison: Science Tech Publishers, 1987, 155 p.

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

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

DONLAN, R. M; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, p. 167-193, 2002.

DONZELI, V. P. **Atividade de alguns componentes da comunidade microbiana do solo e microrganismos diazotróficos endofíticos sob influência do nitrogênio na cultura do milho**. 2002. 84 fls Dissertação (Mestrado Pós-Graduação Instituto de Biologia) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, SP, 2002.

ECKERT, B.; WEBWE, O. B.; KIRCHHOF, G.; HALBRITTER, A.; STOFFELS, M.; HARTMANN, A. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-erass *Miscanthus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 17-26, 2001.

ELASRI, M. O.; MILLER, R. V. Study of the response of a biofilm bacterial community to UV radiation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 2025 – 2031, 1999.

EVANS, H. J.; BURRIS, R. H. Highlights in biological nitrogen fixation during the last 50 years. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H. J. (Eds.). **Biological nitrogen fixation**. New York: Chapman and Hall, 1992. p. 1-42.

FALEIRO, A. C. **Análise da Interação de *Azospirillum brasilense* FP2 com raízes de milho (*Zea mays*) por qPCR, microscopia eletrônica e proteômica**. 107p. Tese de doutorado em Ciências. Universidade Federal de Santa Catarina, 2014.

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.

FAQUIN, V. **Nutrição mineral de plantas**. 2005. 186 fls. Especialização (Solos e Meio Ambiente) - Universidade Federal de Lavras – UFLA, 2005.

FENG, L.; ROUGHLEY, R. J.; COPELAND, L. Morphological changes of rhizobia in peat cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 3, p. 1064-70, 2002.

FERLINI, H. A. Co-Inoculación en soja (*Glycine max*) con *Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum brasilense*. 2006. Disponível em: <http://www.engormix.com/co_inoculacion_soja_glycine_s_articulos_800_AGR.htm> . Acesso: 29 dez. 2016.

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

FERNANDES JÚNIOR, P. I.; SILVA JÚNIOR, E. B.; JÚNIOR, S.; SANTOS, C. E. R. DA S.; OLIVEIRA, P. J.; RUMJANEK, N. G.; MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R. Performance of polymer compositions as carrier to cowpea rhizobial inoculant formulations: Survival of rhizobia in pre-inoculated seeds and field efficiency. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 12, p. 2945-2951, 2012.

FERNANDES, V.H. **Otimização dos parâmetros de produção de biomassa de *Azospirillum amazonense* (BR-11145) para incorporação em inoculantes agrícolas**. 2013. 93 fls. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - Instituto de Tecnologia, Seropédica, RJ, 2013.

FERREIRA, A. L. **Pesquisa viabiliza produção de biofertilizantes para cana e milho**. 2016. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/12265163/pesquisa-viabiliza-producao-de-biofertilizantes-para-cana-e-milho>>. Acesso em: 09 jan. 2017.

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, p. 99-108, 2012.

FORNASIERI FILHO, D. **Manual da cultura do trigo**. Jaboticabal: Fundação de Apoio à Pesquisa, Ensino e Extensão (FUNEP), 2008. 338p.

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

FUJIMOTO, J. Formação de multicamadas de polissacarídeos e proteína. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 5, p. 757-761, 2002.

GALINDO, F. S. **Desempenho agrônômico do milho e do trigo em função da inoculação com *Azospirillum brasilense* e doses e fontes de nitrogênio**. 2015. 150fls. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista – Unesp - Faculdade de Engenharia, Ilha Solteira, 2015.

GALINDO, F. S.; LUDKIEWICZ, M. G. Z.; BELLOTE, J. L. M.; SANTINI, J. M. K.; ALVES, C. J.; TEIXEIRA FILHO, M. C. M. Efeito de épocas de aplicação foliar de *Azospirillum brasilense* nos teores de nutrientes do trigo irrigado. **Tecnologia & Ciências Agropecuária**, João Pessoa, v.9, n.2, p.37-42, 2015.

GOEBEL, E. M.; KRIEG, N. R. Fructose catabolism in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. **Journal of Bacteriology**, v. 159, p. 86-92, 1984.

GOMES, W. S.; BORÉM, A. Biotecnologia: novo paradigma do agronegócio brasileiro. **Revista de Economia e Agronegócio**, v. 11, n. 1, p. 116-136, 2013.

GÓMEZ, M. M.; MERCADO, E. C.; PINED, E. G. *Azospirillum* una rizobacteria con uso potencial en la agricultura. **Biológicas**, v. 16, n. 1, p. 11-18, jul. 2014.

GÓMEZ, Z. A.; TYMERZYSYN, E. DE.; ANTONI, G.; ANIBAL, D. E. Action of trehalose on the preservation of *Lactobacillus delbrueckii* sp. bulgaricus by heat and osmotic dehydration. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 1315-1320, 2003.

GUDMALWAR, R. M.; KAMBLE, L. H. Microbial production of poly-3-hydroxyl butyrate. **International Journal of Advanced Biotechnology and Research**, v. 5, p. 717-724, dez. 2014.

HARTMANN, A.; BASHAN, Y. Ecology and application of *Azospirillum* and other plant growth-promoting bacteria (PGPB) - Special Issue. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, n. 1, p. 1–2, 2009.

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, set. 2013.

HERSCHKOVITZ, Y.; LERNER, A.; DAVIDOV, Y.; ROTHBALLER, M.; HARTMANN, A.; OKON, Y.; JURKEVITCH, E. Inoculation with the plant-growth-promoting rhizobacterium *Azospirillum brasilense* causes little disturbance in the rhizosphere and rhizoplane of maize (*Zea mays*). **Microbial Ecology**, v. 50, p. 277–288, out. 2005.

HOUNSA, C. G.; BRANDT, E. V.; THEVELEIN, J.; HOHMANN, S.; PRIOR, B. A.; Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. **Microbiology**, v. 144, p. 671-680, 1988.

HUERGO, L. F. **Regulação do metabolismo do nitrogênio em *Azospirillum brasilense***. 2006. 170 fls. Tese (Doutorado em Ciências Bioquímica) - Ciências Bioquímica, Universidade federal do Paraná, Curitiba, 2006.

HUERGO, L. F.; MONTEIRO, R. A.; BONATTO, A. C.; RIGO, L. U.; STEFFENS, M. B. R.; CRUZ, L. M.; CHUBATSU, L. S.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. In: CASSÁN, F.D.; GARCIA DE SALAMONE, I. ***Azospirillum sp.*: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina**. Buenos Aires: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p. 17-35.

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo**. Londrina: Embrapa Soja, 2011. 37 p. (Embrapa Soja. Documentos, 325).

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

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2001. 48 p. (Embrapa Soja. Circular Técnica, n.35; Embrapa Cerrados. Circular Técnica, n.13).

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, p. 413-425, 2010.

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, p. 224-253, 2005.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. **Biology Fertility of Soils**, Firenze, v. 49, n. 7, p. 791-801, 2013.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; NOGUEIRA, M. A. A pesquisa em fixação biológica do nitrogênio na Embrapa Soja: passado, presente e perspectivas futuras. In: Reunião da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola. 2012. Londrina. **Anais da XVI Relare**. Londrina-PR, 2012. p. 54-59.

IKEDA, A. C. **Bioprospecção e identificação de bactérias isoladas de raízes de milho (*Zea mays* L.) para promoção de crescimento vegetal e controle biológico**. 2014. 94 fls. Tese (Doutorado em Genética) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

JAMES, C. Global status of commercialized biotech/GM Crops: 2011. Disponível em: <<http://www.isaaa.org>>. Acesso em: 05 jan. 2017.

JAMES, E. K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. **Field Crops Research**, v. 65, p. 197–209, 2000.

JAYASINGHEARACHCHI, H. S.; SENEVIRATNE, G. A bradyrhizobial-*Penicillium* spp. biofilm with nitrogenase activity improves N₂ fixing symbiosis of soybean. **Biology and Fertility of Soils**, v. 40, p. 432–434, 2004.

JOE, M. M. JALEEL, C. A.; SIVAKUMAR, P. K.; ZHAO, C.; KARTHIKEYAN, B. Coaggregation 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.

KADOURI, D.; JURKEVITCH, E.; OKON, Y.; CASTRO, S. Ecological and agricultural significance of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 31, p. 55–67, 2005.

KAMNEV, A. A.; TUGAROVA, A. V.; TARANTILIS, P. A.; GARDINER, P. H. E. Comparing poly-3-hydroxybutyrate accumulation in *Azospirillum brasilense* strains Sp7 and Sp245: The effect of copper (II). **Applied Soil Ecology**, v. 61, p. 213-216, 2012.

KARIVARADHARAJAN, S.; PRASANNA, R.; KUMAR, A.; PATTNAIK, S.; CHAKRAVARTY, K.; SHIVAY, Y. S.; SINGH, R.; SAXENA, A. K. Evaluating the influence of novel cyanobacterial biofilmed biofertilizers on soil fertility and plant nutrition in wheat. **European Journal of Soil Biology**, v. 55, p. 107–116, 2013.

KAVADIA, A.; VAYENAS, D. V.; PAVLOU, S.; AGGELIS, G. Dynamics of free-living nitrogen-fixing bacterial populations and nitrogen fixation in a two-prey–one-predator system. **Ecological Modelling**, v. 218, p. 323-338, 2008.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. 2^a ed. Rio de Janeiro, Guanabara: Koogan, 2011.

KHAMMAS, K. M. AGERON, E.; GRIMONT, P. A. D.; KAISER, P. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. **Research in Microbiology**, Paris, v. 140, n. 9, p. 679-693, 1989.

KREFT, J. U. Biofilms promote altruism. **Microbiology**, v. 150, p. 2751-2760, 2004.

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.

LAMBRECHT, M. OKON, Y.; BROEK, A. V.; VANDERLEYDEN, J. Indole 3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. **Trends in Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 298-300, 2000.

LANA, M. DO C.; DARTORA, J.; MARINI, D.; HANN, J. E. H. Inoculation with *Azospirillum*, associated with nitrogen fertilization in maize. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 59, p. 399-405, jun. 2012.

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

LEE, S. Y. Bacterial polyhydroxyalkanoates. **Biotechnology and Bioengineering**, v.49, p. 1-14, 1996.

LEO DANIEL, A. E.; VENKATESWARLU, B.; SUSEELENDRA, D.; PRAVEEN, K. G.; MIR H. A. S. K.; MEENAKSHI, T.; UZMA, S.; SRAVANI, P.; LAKSHMI, N. M. Effect of polymeric additives, adjuvants, surfactants on survival, stability and plant growth promoting ability of liquid bioinoculants. **Journal of Plant Physiology & Pathology**, v. 1, p. 1-5, 2013.

LESLIE, S. B.; ISRAELI, E.; LIGHTHART, B.; CROWE, J. H.; CROWE, L. M. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 3592-3597, 1995.

LIN, S. Y.; CHEN, F. T.; YOUNG, L. S.; ZHU, Z. L.; CHEN, W. M.; YOUNG, C. C. *Azospirillum formosense* sp. nov., a novel diazotrophic bacterium isolated from agricultural soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, p. 1185–1190, 2012.

LIN, L.; LI, Z.; HU, C.; ZHANG, X.; CHANG, S.; YANG, L.; LI, Y.; AN, Q. Plant growth-promoting nitrogen-fixing enterobacteria are in association with sugarcane plants growing in Guangxi, China. **Microbes and Environments**, v.27, p.391-398, 2012.

LITTER, M. **Farmacologia**, 3^a ed. Buenos Aires: El Ateneo, 1964. p. 1495.

MAGALHÃES, F. M. M.; BALDANI, J. I.; SOUTO, S. M.; KUYKENDALL, J. R.; DOBEREINER, J. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 55, p. 417-430, 1983.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2. ed. Piracicaba: Potafos. 1997. 390p.

MALUSÁ, E.; SAS-PASZT, L.; CIESIELSKA, J. Technologies for beneficial microorganisms inocula used as biofertilizers. **The Scientific World Journal**, p. 1-12, 2012.

MANIKANDAN, R.; SARAVANAKUMAR, D.; RAJENDRAN, L.; RAGUCHANDER, T.; SAMIYAPPAN, R. Standardization of liquid formulation of *Pseudomonas fluorescens* Pf1 for its efficacy against *Fusarium* wilt of tomato. **Biological Control**, v. 54, p. 83–89, 2010.

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO). **Instrução Normativa Nº 13**, de 24 de março de 2011. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil.

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO). **Boletim Técnico Biotecnologia Agropecuária**, 2010. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/Qualidade%20dos%20alimentos/biotecnologia_F.pdf>. Acesso em: 05 jan. 2017.

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO). **Instrução Normativa Nº 30**, “Métodos Oficiais para Contagem, Identificação e Análise de Pureza de Inoculantes” de 12/11/2010b. Disponível em: <<http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/servlet/INPDFViewer?jornal=1&pagina=4&data=01/10/2009&captchafield=firistAccess>>. Acesso em 22 nov. 2016.

MARCELINO, P. R. F. **Desenvolvimento de meios de cultivo e formulações inoculantes para *Azospirillum brasilense* AbV5**. 2012. 116 fls. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2012.

MARTINS, F. A. D.; ANDRADE, A. T.; CONDÉ, A. B. T.; GODINHO, D. B.; CAIXETA, C. G.; COSTA, R. L.; POMELA, A. W. V.; SOARES, C. M. S. Avaliação de híbridos de milho inoculados com *Azospirillum brasilense*. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, Porto Alegre, v. 18, n. 2, p. 103-110, 2012.

MEHNAZ, S.; WESELOWSKI B.; LAZAROVITS, G. *Azospirillum canadense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from rhizosphere. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 620-624, 2007a.

MEHNAZ, S.; WESELOWSKI B.; LAZAROVITS, G. *Azospirillum zeae* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from rhizosphere soil of *Zea mays*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 2805-2809, 2007b.

MENDES, G. H. S. **O processo de desenvolvimento de produtos de empresas de base tecnológica: caracterização da gestão e proposta de modelo de referência**. 2008. 294 fls Tese (Doutorado em Engenharia de Produção) - Universidade Federal de São Carlos - SP, 2008.

MILES, A. A.; MISRA, S. S.; IRWIN, J. O. The estimation of the bactericidal power of the blood. **The Journal of Hygiene**, v. 38, n. 6, p. 732-749, 1938.

MOAT, A. G.; FOSTER, J. W.; SPECTOR, M. P. **Microbial Physiology**. 4 ed. Nova York: John Wiley and Sons, 2002. 714 p.

MONDS, R. D.; O'TOOLE, G. A. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. **Trends in Microbiology**, v. 17, n. 2, p. 73-87, 2009.

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

MOREIRA, F. M. DE S.; SILVA, K.; NÓBREGA, R. S.; CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, n. 1, v. 2, p. 74-99, 2010.

MORRIS, C. E.; MONIER, J. M. The ecology significance of biofilm formation by plant-associated bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v. 41, p. 429-453, 2003.

MUGNIER, J.; JUNG, G. Survival of bacteria and fungi in relation to water activity and the solvent properties of water in biopolymer. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, p. 108-14, 1985.

NEVES, L. C.; DA SILVA, V. X.; FERRAZ, L. R.; PRILL, M. A. S.; ROBERTO, S. R. Utilização de diferentes embalagens plásticas para a conservação de produto minimamente processado de mangas 'tommy atkins'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 3, p. 856-864, 2009.

NUNES, P. H. M. P.; AQUINO, L. A.; SANTOS, L. P.; XAVIER, F. O.; DEZORDI, L. R.; ASSUNÇÃO, N. S. Produtividade do trigo irrigado submetido à aplicação de nitrogênio e à inoculação com *Azospirillum brasilense*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 39, p. 174-182, 2015.

OKON, Y.; ITZIGSOHN, R. The development of *Azospirillum* as a commercial inoculant for improving crop yields. **Biotechnology Advances**, v. 13, p. 415-424, 1995.

ORBEGOZO, J.; ROMAN, M. L.; RIVERA, C.; GAMBOA, S.; TOVAR, J. C.; FORBES, G. A.; LINDQVIST-KREUZE, H.; KREUZE, J. F.; GHISLAIN, M. *Rpi-blb2* gene from *Solanum bulbocastanum* confers extreme resistance to late blight disease in potato. **Plant Cell Tissue and Organic Culture**, v. 125, p. 269-281, 2016.

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annual Review of Microbiology**, v. 54, p. 49-79, 2000.

PANDOLFO, C. M.; VOGT, G. A.; BALBINOT JUNIOR, A. A.; GALLOTTI, G. J. M.; ZOLDAN, S. R. Desempenho de milho inoculado com *Azospirillum brasilense* associado a doses de nitrogênio em cobertura. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 27, n. 3, p. 94-99, fev. 2015.

PAREDES-CARDONA, E.; CARCANO-MONTIEL, M.; MASCARUA-ESPARZA, M. A.; CABALLERO-MELLADO, J. Response of maize to inoculation with *Azospirillum brasilense*. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, v. 30, p. 351-355, 1988.

PENG, G.; WANG, H.; ZHANG, G.; HOU, W.; WANG, Q. T.; TAN, Z. *Azospirillum melinis* sp. nov., a group of diazotrophs isolated from tropical molasses grass. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 1263-1271, 2006.

PICCININ, G. G.; BRACCINI, A. L.; DAN, L. G.; 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.

QUADROS, P. D. **Inoculação de *Azospirillum* spp. em sementes de genótipos de milho cultivados no Rio Grande do Sul.** 2009. 74 fls. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2009.

QUADROS, P. D.; ROESCH, L. F. W.; DA SILVA, P. R. F.; VIEIRA, V. M.; ROEHRS, D. D; CAMARGO, F. A. O. Desempenho agrônômico a campo de híbridos de milho inoculados com *Azospirillum*. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 61, n. 2, p. 209-218, 2014.

RAMANATHAN, G. RAMA, R. DHAMAYANTHI, P. Studies on the response of bacterial biofertilizers on growth characteristics of *Jatropha curcas*. **International Journal of Agriculture Innovations and Research**, v. 3, p. 1252-1254, 2015.

RAMEY, B. E.; KOUTSOUDIS, M.; VON BODMAN S. B.; FUQUA, C. Biofilm formation in plant-microbe associations. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, p. 602-609, 2004.

RAMOS, M. V.; MELO, D. F.; SILVA, A. L. C. **Biotecnologia: a ciência, o bacharelado, a demanda socioeconômica.** 1 ed. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2016. 114 p.

RAMPIM, L.; RODRIGUES-COSTA, A. C. P.; NACKE, H.; KLEIN, J.; GUIMARÃES, V. F. Qualidade fisiológica de sementes de três cultivares de trigo submetidas à inoculação e diferentes tratamentos. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, n. 4, p. 678-685, 2012.

RATCLIFF, W. C.; KADAM, S. V.; DENISON, R. F. Poly-3-hydroxybutyrate (PHB) supports survival and reproduction in starving rhizobia. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 65, n. 3, p. 391-9, 2008.

RECOUVREUX, D. O. S. **Produção de celulose bacteriana: identificação do operon *bcs* e produção de biofilme celulósico por *Chromobacterium violaceum*.** Florianópolis, Santa Catarina, Dissertação Mestrado em Engenharia Química, 2004. Universidade Federal de Santa Catarina, 124f.

REINHOLD, B.; HUREK, T.; FENDRIK, I.; POT, B.; GILLIS, M.; KERSTERN, K.; THIELEMANS S.; DE LEY, J. *Azospirillum halopraeferens* sp. nov, a nitrogen fixing organism associated with roots of kallar grass [*Leptochloa fusca* (L) Kunth]. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 37, p. 43-51, 1987.

REIS, V. M. **Uso de bactérias fixadoras de nitrogênio como inoculante para aplicação e gramíneas.** Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2007. 22 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 232).

REIS, V. M; BALDINI, J. I; BALDINI, V. L. D; DÖBEREINER, J. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. **Critical Reviews in Plant Sciences**, n. 3, v. 19, p. 227-247, 2000.

REIS; V. M.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. Ecologia, Isolamento e Identificação de Bactérias Diazotróficas. In: AQUINO, A. M.; ASSIS, R. L. **Processos biológicos no sistema solo-planta – ferramentas para uma agricultura sustentável.** Brasília: Embrapa Agrobiologia, 2005. p. 258-279.

REIS JUNIOR, F. B.; MENDES I. DE C.; REIS, V. M. HUNGRIA, M. Fixação biológica de nitrogênio: uma revolução na agricultura. In: FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M. **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2011. p. 247-282.

REPKE, R. A. **Eficiência de *Azospirillum brasilense* na fixação de nitrogênio em milho**. 2013. 53 fls. Dissertação (Agronomia) - Universidade Estadual Paulista "Júlio De Mesquita Filho"- Faculdade De Ciências Agrônômicas, Botucatu, SP, 2013.

RIBEIRO, H.; FREIRE, C.; CABRAL, F.; VASCONCELOS, E.; BRITO, L. Production of lettuce seedlings in coconut coir amended with compost and vermicompost. **Acta Horticulturae**, v.1013, p. 417-422, 2013.

RINAUDI, L. V., GIORDANO, W. An integrated view of biofilm formation in rhizobia. **FEMS Microbiology Letters**, v. 304, p. 1-11, 2010.

ROBERTO, V. M. O.; DA SILVA, C. D.; LOBATO, P. N. Resposta da cultura do milho a aplicação de diferentes doses de inoculante (*Azospirillum brasilense*) via semente. In: XXVIII CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 2010. Goiânia. **Anais Associação Brasileira de Milho e Sorgo**, Goiânia, 2010. p. 2429 - 2434.

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

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JÚNIOR, V. A.; VICTOR, O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. citri tipo B. **Summa Phytopathologica**, v. 12, n. 1-2, p. 16, 1986.

RODRIGUEZ, H.; GONZALEZ, T.; GOIRE, I.; BASHAN, Y. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. **Naturwissenschaften**, v. 91, p. 552–555, out. 2004.

RODRIGUEZ-CACERES, E. A. Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 990-991, 1982.

RODRIGUEZ-SALAZAR, J.; SUAREZ, R.; CABALLERO-MELLADO, J.; ITURRIAGA, G. Trehalose accumulation in *Azospirillum brasilense* improves drought tolerance and biomass in maize plants. **FEMS Microbiology Letters**, v. 296, n. 1, p. 52–59, 2009.

ROLLA, A. A. DE P.; CARVALHO, J. DE F. C.; PAGLIARINI, R. F.; ENGELS, C.; RIO, A.; MARIN, S. R.; OLIVEIRA, M. C. N.; BENEVENTI, M. A.; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C.; FRIAS, J. R. B.; NEUMAIER, N.; NAKASHIMA, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; NEPOMUCENO, A. L. Phenotyping soybean plants transformed with rd29A:AtDREB1A for drought tolerance in the greenhouse and field. **Transgenic Research**, v. 23, p. 75–87, 2014.

ROSSI, D. M.; COSTA, J. B.; SOUZA, E. A.; PERALBA, M. C.; SAMIOS, D.; AYUB, M. A. Comparison of different pretreatment methods for hydrogen production using

environmental microbial consortia on residual glycerol from biodiesel. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.36, p. 4814 - 4819.

ROSSI, G. M. **Biotecnologia no Brasil: uma análise empírica a partir dos dados da PINTEC**. 2012. 145 fls. Dissertação (Mestrado em Economia) – Universidade Federal de Uberlândia – MG, 2012.

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, 1985.

SAIKIA, S. P.; JAIN, V.; KHETARPAL, S.; ARAVIND, S. Dinitrogen fixation activity of *Azospirillum brasilense* in maize (*Zea mays*). **Current Science**, v. 93, n. 9, p. 1296-1300, nov. 2007.

SALA, V.M.R.; CARDOSO, E.J.B.N.; FREITAS, J.G.; SILVEIRA, A.P.D. Resposta de genótipos de trigo à inoculação de bactérias diazotróficas em condições de campo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.6, p.833-842, jun. 2007.

SANGKHARAK, K.; PRASERTSAN, P. Nutrient optimization for production of polyhydroxybutyrate from halotolerant photosynthetic bacteria cultivated under aerobic-dark condition. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 3, p. 1-12, jul. 2008.

SANTA, O. R. D.; HERNÁNDEZ, R. F.; ALVAREZ, G. L. M.; RONZELLI JUNIOR, P.; SOCCO, C. R. *Azospirillum* sp. inoculation in wheat, barley and oats seeds greenhouse experiments. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 6, p. 843-850, 2004.

SANTI, C.; BOGUSZ, D.; FRANCHE, C. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. **Annals of Botany**, v. 111, n. 5, p. 743-767, 2013.

SAUBIDET, M. I.; FATTA, N.; BARNEIX, A. J. The effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* on growth and nitrogen utilization by wheat plants. **Plant and Soil**, v. 245, p. 215-222, 2002.

SCHEUER, P. M.; DE FRANCISCO A.; DE MIRANDA, M. Z.; LIMBERGER, V. M. Trigo: características e utilização na panificação. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 13, n. 2, p. 211-222, 2011.

SCHOONBEEK, H.; WANG, H.; STEFANATO, F. L.; CRAZE, M.; BOWDEN, S.; WALLINGTON, E.; ZIPFEL, C.; RIDOUT, C. J. Arabidopsis EF-Tu receptor enhances bacterial disease resistance in transgenic wheat. **New Phytologist**, v. 206, p. 606–613, 2015.

SCHUH, C. A. **Biopolímeros como suporte para inoculantes**. 2005. 81 fls. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Faculdade de Agronomia, Porto Alegre, RS, 2005.

SILVA, A. A. O.; FELIPE, T. A.; BACH, E. E. Ação do *Azospirillum brasilense* no desenvolvimento das plantas de trigo (variedade IAC24) e cevada (variedade CEV 95033). **Consciência e Saúde**, São Paulo, v. 3, p. 29-35, 2004.

- SILVA, L. R. **Produção experimental de inoculantes agrícolas a base de *Azospirillum* spp. para fixação biológica de nitrogênio em gramíneas e forrageiras.** 2006. 137 fls. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- SILVA, M. F. DA. **Uso de inoculante polimérico contendo bactérias diazotróficas na cultura da cana-de-açúcar.** 2009. 80 fls. Tese (Doutorado em Agronomia Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.
- SINGLETON, P.; KEYSER, H.; SANDE, E. Development and evaluation of liquid inoculants. In: HERRIDGE, D. **Inoculants and nitrogen fixation of legumes in Vietnam.** **Canberra: ACIAR, 2002.** p. 52-66, 2002.
- SIVASAKTHIVELAN, P.; SARANRAJ, P. *Azospirillum* and its formulations: a review. **International Journal of Microbiological Research**, v. 4, n. 3, p. 275-287, 2013.
- SLEPECKY, R. A.; LAW, A. J. H. A rapid spectrophotometric assay of α - β -unsaturated acids and β -hydroxy acids. **Analytical Chemistry**. v. 32, p. 1697-1699, 1960.
- SLY, L. I.; STACKEBRANDT, E. Description of *Skermanella parooensis* gen. nov., sp. nov. to accommodate *Conglomeromonas largomobilis* subsp. parooensis following the transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. largomobilis to the genus *Azospirillum*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, p. 541-544, 1999.
- SMITH, R. S. Legume inoculant formulation and application. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 38, p. 485-492, 1992.
- SOLIGO, S. C.; UBERT, I.; ÚRIO, E. A.; CASTRO, R. L. **Germinação e vigor de sementes de trigo inoculadas com *Azospirillum brasilense*.** 2014. Disponível em: <http://mostra.ideau.com.br/2014/mostra_ideau_2014_anais/trabalhos/2014025024.pdf>. Acesso em: 25 nov.2015.
- SOUZA, T. M.; PRANDO, A. M.; TAKABAYASHI, C. R.; SANTOS, J. S.; ISHIKAWA, A. T.; FELÍCIO, A. L. S. M. Composição química e desoxinivalenol em trigo da região Centro - Sul do Paraná: Adubação nitrogenada em cobertura associada com *Azospirillum brasilense*. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n. 1, p. 327-341, fev. 2014.
- STANLEY, N. R.; LAZAZZERA, B. A. Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. **Molecular Microbiology**, v. 54, n. 4, p. 917-924, 2004.
- 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, p. 487-506, 2000.
- STEINBUCHER, A. Non-biodegradable biopolymers from renewable resources: perspectives and impacts. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, p. 607-613, 2005.

STEINBUCHER, A.; FUCHTENBUSH, B.; GORENFLO, V.; HEIN, S.; JOSSEK, R.; LANGENBACH, S. Biosynthesis of polyesters in bacteria and recombinant organisms. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, p. 177-82, 1998.

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

SUTHERLAND, I. W. Bacterial surface polysaccharides structure and function, **International Review of Cytology**, v. 113, p. 187-231, 1988.

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

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

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.

TESTER, R. F.; KARKALAS, J.; QI, X. Starch-composition, fine structure and architecture. **Journal of Cereal Science**, v. 39, n. 2, p.151–165, 2004.

TITTABUTR, P.; PAYAKAPONG, W.; TEAUMROONGA, N.; SINGLETONB, P. W.; BOONKERDA, N. Growth, survival and field performance of *bradyrhizobial* liquid inoculants formulations with polymeric additives. **Science Asia**, v. 33, p. 69-77, 2007.

TODAKA, D.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Recent advances in the dissection of drought-stress regulatory networks and strategies for development of drought-tolerant transgenic rice plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. 8, p. 1-20, 2015.

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

TRUJILLO-ROLDÁN, M. A.; VALDEZ-CRUZ, N. A.; GONZALEZ-MONTEERRUBIO, C. F.; ACEVEDOSÁNCHEZ, 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**, v. 97, p. 9665-9674, set. 2013.

VENDAN, R. T.; THANGARAJU, M. Development and standardization of liquid formulation for *Azospirillum* bioinoculant. **Indian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 379-387, 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, 2007.
- VENIERAKI, A.; DIMOU, M.; VEZYRI, E.; KEFALOGIANNI, I.; ARGYRIS, N.; LIARA, G.; PERGALIS, P.; CHATZIPAVLIDIS, I.; KATINAKIS, P.; Characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from field-grown barley, oat, and wheat. **Journal of Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 525–534, 2011.
- VERESOGLOU, S. D.; MENEXES, G. Impact of inoculation with *Azospirillum* spp. on growth properties and seed yield of wheat: a meta-analysis of studies in the ISI Web of Science from 1981 to 2008. **Plant and Soil**, v. 337, p. 469-80. set. 2010.
- VERLINDEN, R. A. J.; HILL, D. J.; KENWARD, M. A.; WILLIAMS, C. D.; REDECKA, I. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, p. 1437–1449, 2007.
- VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, v. 255, n. 2, p. 571–586, 2003.
- VOGT, G. A.; BALBINOT JUNIOR, A. A.; GALLOTTI, G. J. M.; PANDOLFO, C. M.; ZOLDAN, S. R. Desempenho de genótipos de milho na presença ou ausência de inoculação com *Azospirillum brasilense* e adubação nitrogenada de cobertura. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 27, n. 2, p. 49-54, 2014.
- WEBB, B. M. The Influence of magnesium on cell division. 2. The effect of magnesium on the growth and cell division of various bacterial species in complex media. **Journal of General Microbiology**, v. 3, p. 410-417, 1949.
- WIMPENNY, J.; MANZ, W.; SZEWZYK, U. Heterogeneity in biofilms. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, n. 5, p. 661-71, 2000.
- XIE, C. H.; YOKOTA, A. *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 1435-1438, 2005.
- YAMANE, T. Yield of poly-D (-)-hydroxybutyrate from various carbon sources: a theoretical study. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 41, p. 165-170, 1993.
- YANG, J.; KLOPPER, J. W.; RYU, C. M. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. **Trends in Plant Science**, v. 14, n. 1, p. 1-4, 2009.
- YOUNG, C. C.; HUPFER, H.; SIERING, C.; HO, M. J.; ARUN, A. B.; LAI, W. A.; REKHA, P. D.; SHEN, F. T.; HUNG, H. M.; CHEN, W. M.; YASSIN, A. F. *Azospirillum rugosum* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 959-963, 2008.
- YOUNG, C. C.; REKHA, P. D.; LAI, W. A.; 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.