PAULO RICARDO FRANCO MARCELINO

DESENVOLVIMENTO DE MEIOS DE CULTIVO E FORMULAÇÕES INOCULANTES PARA *Azospirillum brasilense* AbV5

Londrina
2012

PAULO RICARDO FRANCO MARCELINO

DESENVOLVIMENTO DE MEIOS DE CULTIVO E FORMULAÇÕES INOCULANTES PARA *Azospirillum brasilense* AbV5

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

Orientação: Profº. Dr. André Luiz Martinez de Oliveira

Londrina
2012

Catalogação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

M314d Marcelino, Paulo Ricardo Franco
Desenvolvimento de meios de cultivo e formulações inoculantes para *Azospirillum brasilense* Abv5 / Paulo Ricardo Franco Marcelino. – Londrina, 2012.
116 f. : il.

Orientador: André Luiz Martinez de Oliveira.
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2012.
Inclui bibliografia.

1. Biotecnologia Agrícola – Teses. 2. Bactérias promotoras do crescimento das plantas – Teses. 3. Biocompósitos – Teses. 4. Produção de biomassa bacteriana – Teses. 5. Exopolissacarídeos – Teses. I. Oliveira, André Luiz Martinez de. II. Universidade Estadual de Londrina. Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

CDU 663.1

PAULO RICARDO FRANCO MARCELINO

DESENVOLVIMENTO DE MEIOS DE CULTIVO E FORMULAÇÕES INOCULANTES PARA *Azospirillum brasilense* AbV5

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

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. André Luiz M. de Oliveira
UEL – Londrina - PR

Profa. Dra Suzana Mali de Oliveira
UEL – Londrina - PR

Dr. José Ivo Baldani
EMBRAPA Agrobiologia - RJ

Londrina, 14 de Fevereiro de 2012.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por tudo, pois Ele é quem melhor nos conhece e ama. Ele tem o melhor para cada um de nós, e sempre na medida certa.

Aos meus pais, por todos os ensinamentos sobre a vida, todo o amor dedicado e por nunca terem me deixado desistir.

Ao meu orientador, Profº Dr. André Luiz Martinez de Oliveira pela orientação e apoio desde a iniciação científica.

A Profª Dra. Suzana Mali pelas contribuições nos trabalhos de desenvolvimento e caracterização físico-química dos biocompósitos.

Não posso deixar de agradecer especialmente à Profª Dra. Maria Inês Rezende. Um exemplo como pessoa e profissional. Responsável por despertar meu interesse em Bioquímica e Biotecnologia, por sempre me apoiar e estimular. Obrigado por me ouvir com interesse e ânimo em todas as questões, dúvidas e os problemas que surgiram durante todo esse tempo. Por sua generosidade, amizade e compreensão. É uma alegria ter você como amiga, praticamente uma "mãe" durante a faculdade e a pós-graduação. Muito obrigado de coração!

A Profª Dra. Célia Guadalupe Tardeli de Jesus Andrade e ao Osvaldo, pelo auxílio nos trabalhos de microscopia eletrônica.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica , Biotecnologia e Química: Nelson Janeiro Rodriguez, Sérgio Nascimento Evangelista, Sandra Aparecida Defende, Neusa Zamuner de Souza, Elda, Ana, Dalvinha, Ivanira e Rose pela colaboração e auxílio.

E aos meus amigos, pois, como dizia Quintana: "A amizade verdadeira, é um amor que nunca morre!"

Aos amigos desde a época da graduação: Luana (Lú), Fábio, Shâmia, Sheyla, Wilson, Eliel, Enio, Beatriz (Bia), Mariete (Mari), Letícia (Lê) e Maria Helena. Muito Obrigado!

Aos amigos do mestrado e laboratório Adriana Casavechia Petri (Dri), Carolina Nachi Rossi (Carolzinha), Lucas Bissoqui, Caio (Fartura), Luciana Von Hohendorff Ferreira (Lu Von), Francine Palermo (Fran), Luciana Carvalho Grade (Lu Grade), Kelly Goes, Fernando Bazani, Franciele Bortoluzzi, Leonardo Cardoso, Bruna Caroline Marques, Patrícia Bittencourt (Potira ou Poti), Arthur, Eddie, Mirian Moraes, Thiago Andrade (Thiagão), Isabela (Isa), Jaqueline (Jaque), Vitor, Daniel, Danielle (Dani), Gabriela (Gabis), Maysa e Ismael Rodriguez Amador pela amizade, apoio, companheirismo, incentivos indispensáveis nos momentos difíceis durante o curso e pela alegria que sempre me proporcionaram.

Não posso deixar de citar com muito carinho, amor e outros sentimentos belos: Emilyn Emy Matsumura, Ana Elisa Stefani Vercelheze, Sílvia Borba, Vilma Vaz e Aline Francisca! Por toda a amizade. Não há como descrever o que acontece quando estou junto de vocês e o que fizeram por mim! Sempre me ouviram, me agüentaram, aconselharam e nunca me julgaram. Foram muitos sorrisos, momentos bons e marcantes. Amo vocês!

Aos estagiários, que são tão responsáveis pelo sucesso deste trabalho quanto eu: Mariane Beatrice Fortin, Odair Pais e Nathaly Hiromi! Meu muito obrigado e saibam que admiro vocês por terem "vestido a camisa" do projeto junto comigo, pela vontade de aprender e por toda a ajuda!

Aos professores do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia.

A todos que contribuíram de alguma forma com este trabalho, Obrigado!

Aos meus pais, pelo amor incondicional,
pelos princípios que sempre me ensinaram a valorizar
e por nunca me deixarem desistir. Amo vocês!

Poeminha do Contra

Todos estes que aí estão
Atravancando o meu caminho,
Eles passarão.
Eu passarinho!

(Mário Quintana)

MARCELINO, Paulo Ricardo Franco. **Desenvolvimento de Meios de Cultivo e Formulações Inoculantes para *Azospirillum brasilense* AbV5.** 2012. 116f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

RESUMO

A utilização de inoculantes bacterianos em cultivos comerciais com leguminosas é uma prática conhecida e empregada há longo tempo e o substrato mais utilizado até o momento tem sido a turfa. Diversos tipos de formulações inoculantes que existem no mercado visam oferecer uma alternativa ao emprego da turfa, principalmente devido à variabilidade na composição deste veículo oriundo de diferentes depósitos e a sua característica não renovável. Com o objetivo de produzir inoculantes bacterianos de alto desempenho para veiculação de bactérias promotoras do crescimento vegetal, foram desenvolvidas formulações para a produção de biomassa celular de *Azospirillum brasilense* AbV5 e formulações inoculantes sólidas e líquidas, avaliando a sobrevivência de *Azospirillum brasilense* AbV5 durante o armazenamento nestas formulações. Através de um planejamento fatorial 2^4 com 3 réplicas no ponto central foram desenvolvidas formulações de meio de cultivo para a produção de biomassa de *A. brasilense* AbV5. Os meios Form1 e Form15 mostraram-se promissores, pois, foram capazes de promover uma elevada densidade celular (10^{10} células/mL) e apresentaram elevador teor de exopolissacarídeos e reserva energética intracelular, possivelmente grânulos de poli-β-hidroxibutirato (PHB). As seis formulações de veículos sólidos foram obtidas pelo processo de extrusão a quente. O material extrusado (biocompósitos) foi embalado em pacotes de celofane com dimensões de 10,0 x 7,0 cm e esterilizado por calor seco à 160 ºC por 4 horas em estufa. Após a esterilização, estes biocompósitos apresentaram pH entre 6,8 e 7,29, densidade de 0,237 a 0,278 g/cm^3, índice de expansão (IE) de 0,938 a 1,450 e capacidade ou índice de absorção de água, após 60 minutos de imersão, variando entre 1,8 e 2,75 g água/g amostra. Os inoculantes sólidos baseados nos biocompósitos foram preparados pela adição de biomassa de *A. brasilense* AbV5 crescida em meio Form15 por 36 horas, diluída e inoculada nas 6 formulações sólidas em uma densidade celular de aproximadamente 10^7 cél/g; a sobrevivência bacteriana foi monitorada nestes inoculantes por 120 dias. O biocompósito de formulação 5 mostrou-se altamente promissor, proporcionando a manutenção de uma densidade de 10^6 cél/g ao final de 120 dias de monitoramento. Formulações inoculantes líquidas foram preparadas utilizando biomassa celular produzida em diferentes condições de cultivo: cultivo no meio Form1 por 12 horas; cultico no meio Form15 por 12 horas; cultivo no meio Dyg's por 12 horas;e cultivo no meio Form15 por 36 horas.A densidade celular inicial para as formulações líquidas foi de aproximadamente 10^9 cél/mL, e após 120 dias de monitoramento da densidade de células viáveis nos inoculantes pode-se observar que a formulação preparada a partir de meio Dyg's apresentou o melhor desempenho, mantendo 10^7 cél/mL. As formulações desenvolvidas nesse trabalho representam um grande potencial para o desenvolvimento de novos produtos para a agricultura.

Palavras-chave: Biotecnologia agrícola. Bactérias promotoras do crescimento de plantas. Biocompósitos. Produção de biomassa bacteriana. Exopolissacarídeos.

Marcelino, Paulo Ricardo Franco. **Development of Culture Media and inoculant formulations for *Azospirillum brasilense* AbV5.** 2012. 116p. Dissertation (M.Sc. Biotechnology) - State University of Londrina, Londrina, 2012.

ABSTRACT

Inoculation of commercial leguminous crops has been adopted as an agriculture routine practice for long, traditionally using the peat to store and carry the inoculant strains in commercial formulations. Nowadays a variety of inoculant formulations are available on market as an alternative to the peat-based formulations. These inoculants aims to substitute the peat-based formulations due to the variability of the peat composition when extracted from different reservoirs, and its non-renewable characteristics. With the objective to develop high performance bacterial inoculants to carry the plant growth promoting (PGP) bacteria *Azospirillum brasilense*, new formulations of culture media, liquid inoculant and solid inoculant were developed. Biomass production, and celular viability and survival of *A. brasilense* AbV5 strain were monitored on the new developed formulations. A factorial statistical planning 2^4 was used to determine the final composition of the culture media to produce biomass of *A. brasilense* AbV5 with high cellular viability and PGP efficiency. The culture media Form1 and Form15 showed the best composition, producing cultures with up to 10^{10} cells mL^{-1}, high production of exopolysaccharide (EPS) and high amount of intracellular polyhydroxybutirate (PHB). Solid inoculant formulations were developed using the hot extrusion process, and different amounts of raw material such as starch, glycerol, sugarcane bagasse and rock powder, in a total of 6 formulations. The autoclave sterilization process promoted modifications in the physico-chemical properties of the biocomposites, and hence dry heat sterilization was used with minor effect over these physico-chemical properties of pH, density, expansion index and water absorption index. The biocomposites produced were packaged into cellophane, sterilized using dry heat and inoculated with a cellular suspension of *A. brasilense* AbV5 cultured for 36 hours in the Form15, diluted to a final concentration of 10^7 cells g^{-1}. The bacterial survival was monitored on these formulations during 120 days, with the biocomposite fomulação5 showing the best results and maintaining a cellular density up to 10^6 cells g^{-1} at the end of the monitoring period. The liquid inoculant formulation developed was used to carry *A. brasilense* AbV5 obtained under different growth conditions: 12 hour growth on Form1 medium; 12 hour growth on Form15 medium; 12 hour growth on Dygs medium; 36 hour growth on Form15 medium. The initial cellular density was set in 1 x 10^9 cells mL^{-1} for each formulation. The cells obtained using Dygs medium showed the best survival, with a population density up to 10^7 cells mL^{-1} after the monitoring period. The growth period influenced the bacterial survival, since inoculants formulated with cells cultured for 36 hour presented higher population after 120 days than inoculants formulated with cells cultured for 12 hour. The formulations developed and presented here are of great potential to the development of new agriculture products.

Keywords: Plant biotechnology. plant growth-promoting bacteria. biocomposites. bacterial biomass production. exopolysaccharides.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Modelo de interação Azospirillum e planta hospedeira 21
Figura 2 - Fluxograma do processo de obtenção dos biocompósitos expandidos por extrusão a quente 44
Figura 3 - Cinética de crescimento de A. brasilense AbV5 em diferentes formulações de meio de cultivo líquido..... 50
Figura 4 - Diagrama de Pareto para a produção de biomassa de Azospirillum brasilense AbV5 de acordo com os valores de O.D.625nm obtidos após 36 horas de cultivo em diferentes formulações 52
Figura 5 - Gráfico de superfície de resposta para a produção de biomassa por A. brasilense AbV5 determinada através da absorvância (D.O.625nm) em resposta à interação entre monoidrogenofosfato de potássio e glicerol 52
Figura 6 - Gráfico de superfície de resposta para a produção de biomassa por A. brasilense AbV5 determinada através da absorvância (D.O.625nm) em resposta à interação entre extrato de levedura e glicerol 55
Figura 7 - Gráfico de superfície de resposta para a produção de biomassa por A. brasilense AbV5 determinada através da absorvância (D.O.625nm) em resposta à interação entre açúcar cristal e glicerol 55
Figura 8 - Figura 8: Gráfico de superfície de resposta para a produção de biomassa por A. brasilense AbV5 determinada através da absorvância (D.O.625nm) em resposta à interação entre açúcar cristal e monoidrogenofosfato de potássio 56
Figura 9 - Relação entre Absorvância (O.D.625nm) e o número de células totais 57
Figura 10 -Exopolissacarídeos precipitados na formulação de meio 15: (A) após 20 horas de cultivo e (B) após 36 horas de cultivo..... 59
Figura 11 -Cinética de crescimento de Azospirillum brasilense AbV5 nos meios Dyg's, Form1 e Form15 61
Figura 12 -Linearização da fase exponencial de crescimento de A. brasilense AbV5 em meio Dyg's..... 62
Figura 13 -Linearização da fase exponencial de crescimento de A. brasilense AbV5 em meio Form1 62
Figura 14 -Linearização da fase exponencial de crescimento de A. brasilense AbV5 em meio Form15 63

Figura 15 -Micrografia óptica de A. brasilense AbV5 em meio Form1, Form15 e Dyg's 66
Figura 16 -Cinética de sobrevivência de A. brasilense AbV5 em compósito expandido e em turfa 69
Figura 17 -Cinética de Absorção de Água em diferentes tempos (1, 5, 10, 20, 30 e 60 minutos) dos biocompósitos expandidos 74
Figura 18 -Cinética de Absorção de Água em Diferentes Tempos (1, 5, 10, 20, 30 e 60 minutos) dos Biocompósitos Expandidos Autoclavados 77
Figura 19 -Cinética de Absorção de Água em Diferentes Tempos (1, 5, 10, 20, 30 e 60 minutos) dos Biocompósitos Expandidos Esterilizados por Calor Seco 78
Figura 20 -Sobrevivência de A. brasilense AbV5 veiculado nos biocompósitos expandidos 79
Figura 21 -Variação de pH dos inoculantes sólidos 80
Figura 22 -Micrografias eletrônicas de varredura dos inoculantes sólidos 83
Figura 23 -Micrografias eletrônicas de varredura dos inoculantes sólidos 84
Figura 24 -Sobrevivência de A. brasilense AbV5 em veículo líquido 85
Figura 25 -Variação de pH dos inoculantes líquidos 86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Delineamento fatorial empregado para o preparo das formulações de meios contendo glicerol, açúcar cristal, extrato de levedura e monoidrogenofosfato de potássio 38
Tabela 2 - Diâmetro médio dos biocompósitos expandidos 43
Tabela 3 - Variáveis componentes dos biocompósitos extrusados 44
Tabela 4 - Composição do veículo inoculante líquido 49
Tabela 5 - Análise de variância para a produção de biomassa por A. brasilense AbV5 em resposta à variação na concentração de componentes da formulação do meio de cultivo após 36 horas de crescimento 51
Tabela 6 - Determinação de açúcares totais e redutores por A. brasilense AbV5 em diferentes formulações de meios de cultivo 53
Tabela 7 - Variação do pH após 36 horas de cultivo 58
Tabela 8 - Parâmetros cinéticos de crescimento de A. brasilense AbV5 nos meios testados 63
Tabela 9 - Projeção de Custos do Meio Form1 67
Tabela 10 - Projeção de Custos do Meio Form 68
Tabela 11 - Projeção de Custos do Meio Dyg's 67
Tabela 12 - pH dos componentes utilizados nas formulações dos biocompósitos utilizados como veículos sólidos 71
Tabela 13 - Resultados de pH, densidade, índice de expansão e porosidade dos biocompósitos expandidos 73
Tabela 14 - Resultados de Índice de Expansão (IE), Cor e Densidade dos Biocompósitos após Esterilização por Calor Úmido e Seco 76

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 16

2 REVISÃO DE LITERATURA 18

2.1 INOCULANTES - IMPORTÂNCIA PARA A AGRICULTURA 18

2.2 BACTÉRIAS DO GÊNERO *AZOSPIRILLUM*: FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO (FBN) E PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO VEGETAL 19

2.3 A UTILIZAÇÃO DOS FERTILIZANTES NITROGENADOS SINTÉTICOS E AS VANTAGENS DO USO DOS INOCULANTES 24

2.4 FORMULAÇÕES DE MEIOS PARA A PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE *A. BRASILENSE*: EXIGÊNCIAS NUTRICIONAIS E CONDIÇÕES DE CULTIVO 26

2.4.1 Fontes de Carbono 27

2.4.2 Fontes de Nitrogênio 27

2.4.3 Fatores de Crescimento e Micronutrientes 28

2.4.4 Processos de Produção: Métodos Fermentativos 29

2.5 VEICULAÇÃO DA BIOMASSA 29

2.5.1 Padronização do Inóculo e Viabilidade Celular 30

2.5.2 Adição de Substâncias Acondicionadoras em Formulações Inoculantes 31

2.5.3 Veículos Sólidos 32

2.5.4 Veículos Líquidos 34

3 OBJETIVOS 36

3.1 OBJETIVO GERAL 36

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 36

4 MATERIAL E MÉTODOS 37

4.1 PRODUÇÃO DE BIOMASSA 37

4.1.1 Microrganismo 37

4.1.2 Desenvolvimento de Meios de Cultivo para a Produção de Biomassa de A. Brasilense AbV5 37

4.1.3 Preparo do Inóculo, Condições de Cultivo e Determinação da Produção de Biomassa 38

4.1.4 Cinética de Crescimento de A. Brasilense AbV5 em Meio Dyg's nos Meios de Cultivo Form1 e Form15 39
4.1.5 Produção de Exopolissacarídeos (EPS) 39
4.1.6 Consumo de Sacarose por A. Brasilense AbV5 nos Meios de Cultivo Form1 e Form15 40
4.1.7 Análise Morfológica de A. Brasilense AbV5 Cultivado nos Meios Dyg's, Form1 e Form15 Através de Microscopia Óptica 41
4.2 PRODUÇÃO DOS VEÍCULOS INOCULANTES SÓLIDOS: BIOCOMPÓSITOS EXPANDIDOS 41
4.2.1 Viabilidade da Aplicação de Biocompósitos Expandidos para Uso Como Veículo Inoculante 41
4.2.2 Desenvolvimento de Formulações para a Produção de Biocompósitos Expandidos Para Uso Como Veículo Inoculante para A. Brasilense AbV5 42
4.2.2.1 Materiais 42
4.2.2.2 Produção dos biocompósitos expandidos 43
4.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS BIOCOMPÓSITOS 45
4.3.1 Análise de pH dos Biocompósitos 45
4.3.2 Índice de Expansão (IE) dos Biocompósitos 45
4.3.3 Densidade Aparente dos Biocompósitos 45
4.3.4 Capacidade ou Índice de Absorção de Água (IAA) 45
4.4 ESTERILIZAÇÃO DOS BIOCOMPÓSITOS 46
4.5 Ensaio de Viabilidade e Sobrevivência de A. brasilense AbV5 Utilizando Diferentes Formulações de Biocompósitos 46
4.5.1 Preparo dos Biocompósitos Inoculantes contendo Azospirillum brasilense AbV5 47
4.5.2 Avaliação da Sobrevivência de Azospirillum brasilense Ab V5 nos Biocompósitos Inoculantes 47
4.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DOS INOCULANTES SÓLIDOS 47
4.7 DESENVOLVIMENTO DE VEÍCULO INOCULANTE LÍQUIDO 48
4.7.1 Materiais 48
4.7.2 Produção do Veículo Líquido 48
4.7.3 Veiculação das Células de A. brasilense Ab V5 ao Inoculante Líquido 49
4.7.4 Avaliação da Sobrevivência de Azospirillum brasilense AbV5 no inoculante líquido 49

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA 49

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 50
5.1 PRODUÇÃO DE BIOMASSA 50
5.1.1 Cinética do Crescimento e Análise Morfológica de A. Brasilense AbV5 nas Diferentes Formulações de Meios de Cultivo 60
5.1.2 Projeção de Custos na Produção das Formulações de Meios Estudados 67
5.2 Produção dos Veículos Inoculantes Sólidos: Biocompósitos Expandidos 68
5.2.1 Viabilidade da Aplicação de Biocompósitos Expandidos Para Uso Como Veículo Inoculante 69
5.2.2 Desenvolvimento de Formulações Para a Produção de Biocompósitos Expandidos Para Uso Como Veículo Inoculante Para Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal 70
5.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E QUÍMICA DOS BIOCOMPÓSITOS 71
5.3.1 Análise do pH dos Biocompósitos 71
5.3.2 Índice de Expansão (IE) dos Biocompósitos 71
5.3.3 Densidade dos Biocompósitos 73
5.3.4 Índice de Absorção de Água (IAA) dos Biocompósitos 73
5.4 Embalagem dos biocompósitos 75
5.5 ENSAIO DE ESTERILIZAÇÃO DOS BIOCOMPÓSITOS 75
5.6 Avaliação da Sobrevivência de Azospirillum Brasilense AbV5 Veiculado nos Biocompósitos 78
5.7 Microscopia Eletrônica de Varredura dos Inoculantes Sólidos 80
5.8 Avaliação da Sobrevivência de Azospirillum Brasilense AbV5 nos Veículos Líquidos 84

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 87

7 CONCLUSÕES 88

REFERÊNCIAS 89

ANEXOS 100

ANEXO A - Meio DYG'S 101
ANEXO B - Solução de micronutrientes para A.brasilense 102
ANEXO C - Solução de FeEDTA 103
ANEXO D - Solução salina 0,9% (m/V) 104
ANEXO E - Pedido de patente 105

1 INTRODUÇÃO

O aumento da produção agrícola no Brasil, nas últimas décadas, vem ganhando destaque internacional, intitulando o país como um "celeiro agrícola". Cereais importantes no cenário mundial, como o milho e o trigo, atingiram na safra 2009/2010 índices de produção históricos para o país, já que foram colhidas 53,2 milhões de toneladas de milho, 3ª maior produção do mundo e, 5,7 milhões de toneladas de trigo (MAPA, 2010). O aumento da produção se dá graças à expansão agrícola e aos incentivos governamentais. Porém o modelo agrícola brasileiro ainda mostra-se altamente dependente de insumos industriais, como os fertilizantes nitrogenados e fosfatados, em sua maioria importados (em torno de 54%), com um consumo de 4,48 milhões de toneladas em 2009 (ANDA, 2010). A adoção deliberada desses adubos ocasiona não somente prejuízos econômicos, mas também, de cunho ambiental.

A exploração de relações naturais e positivas existentes entre micro-organismos e plantas, na forma de inoculantes, surge como alternativa sustentável frente aos fertilizantes convencionais, com o intuito de diminuir custos nos plantios mantendo-se a elevada produtividade, além de não agredir ao meio ambiente. Nos últimos anos, observou-se o aumento da demanda para os inoculantes, incentivando o aparecimento de diversas indústrias produtoras. Como exemplo principal, tem-se a prática da inoculação das sementes de leguminosas, como a soja, com bactérias fixadoras de nitrogênio, que vem sendo feita há muitos anos. Após pesquisas de instituições como a Universidade Federal do Paraná (UFPR), a EMBRAPA Soja (PR) e a EMBRAPA Agrobiologia (RJ), inoculantes para diversas outras culturas importantes foram desenvolvidos, como por exemplo, milho, trigo e cana-de-açúcar.

Os inoculantes para gramíneas ou também denominados "graminantes" utilizam principalmente bactérias do gênero *Azospirillum*, conhecidas por promover a fixação biológica de nitrogênio e o crescimento vegetal. Em experimentos de campo no Brasil, a aplicação das mais variadas formulações inoculantes (líquidas e turfosas) contendo estirpes destas bactérias foram responsáveis por até 60 % do aumento da produtividade em lavouras de milho (SANTOS, 2011).

Atualmente há estudos nas mais variadas vertentes quando o assunto é inoculante para gramíneas. Desde melhoramento genético das cepas utilizadas, desenvolvimento de meios para crescimento das estirpes em elevadas densidades, desenvolvimento de novos veículos que promovam a maior sobrevivência e diminuam custos e testes em campo focando a eficiência da utilização destes microrganismos.

As pesquisas de desenvolvimento de novos inoculantes para gramíneas utilizando *Azospirillum brasilense* buscam a produção de meios de cultivo a partir de substratos com custos menores e que possam ser utilizados em escala industrial na obtenção de um elevado número de células viáveis (RISSI, 2006), e alternativas para substituição dos veículos turfosos vastamente empregados. A turfa apresenta uma composição físico-química variável, que pode afetar a sobrevivência dos microrganismos, e custo elevado já que sua extração e preparo demandam várias operações unitárias (LIMA, 2001), o que faz a pesquisa agrícola buscar substituintes a esse material. Deve-se levar em conta, também, que a turfa não está disponível em alguns países e é um recurso natural não renovável.

O desenvolvimento de novas formulações que possam vir a substituir com eficiência a turfa como suporte nos inoculantes torna-se de extrema importância (SCHUH, 2005). O Brasil como grande produtor agrícola apresenta também uma grande disponibilidade de resíduos e subprodutos agroindustriais, como por exemplo, o bagaço de cana-de-açúcar resultante da produção de etanol, que pode ser utilizado em processos de imobilização/veiculação de microrganismos diazotróficos e promotores do crescimento vegetal, levando-os até as plantações. Dessa forma há uma agregação de valor a esses subprodutos e ao mesmo tempo queda nos custos de produção dos inoculantes. Neste contexto, pesquisas devem ser realizadas para avaliar a fisiologia dos microrganismos imobilizados nestes materiais, o tempo de sobrevivência e eficiência agrícola dos novos produtos desenvolvidos, conforme as regulamentações do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 INOCULANTES - IMPORTÂNCIA PARA A AGRICULTURA

Os inoculantes são produtos de origem microbiana que apresentam ação benéfica para o desenvolvimento das plantas. No Brasil, são produzidos de acordo com a Lei n° 6894, de 16 de novembro de 1980, regulamentada pelo Decreto n° 4954, de Janeiro de 2004 e, a sua qualidade certificada conforme os protocolos estabelecidos pela (RELARE) rede de laboratórios para recomendação, padronização e difusão de tecnologia de inoculantes microbiológicos de interesse agrícola (MAPA, 2010). As formulações inoculantes contêm bactérias específicas para cada espécie vegetal, que promovem o crescimento vegetal e/ou a fixação de nitrogênio. São encontradas células vivas ou latentes dos microrganismos responsáveis pela produção de metabólitos primários e secundários como: proteínas, enzimas, antibióticos, vitaminas, toxinas, fenóis, ésteres e ácidos orgânicos, que desempenham funções hormonais estimulando diretamente o crescimento vegetal e quelatos organominerais que atuam na solubilização de importantes nutrientes para o desenvolvimento vegetal (MEDEIROS et al., 2003; RADWAN et al., 2004). A tendência pelo uso desta tecnologia vem sendo ampliada nos últimos anos, devido aos custos de produção e dos problemas ambientais oriundos do uso dos fertilizantes sintéticos nitrogenados e fosfatados ou agroquímicos.

O Brasil possui um mercado bastante atrativo para a aplicação de tecnologias agrícolas de elevada eficiência e de baixo custo, como é o caso dos inoculantes microbianos. A ausência de subsídios governamentais aos produtos agrícolas, e o grande mercado consumidor nacional e internacional faz com que os produtores brasileiros sejam bastante receptivos a técnicas e tecnologias que promovam a diminuição dos custos de produção (BUAINAIN et al., 2002). Existem atualmente cerca de onze empresas nacionais e oito empresas importadoras de inoculantes, que mobilizam anualmente mais de 200 milhões de reais. A tecnologia de inoculação nacional abrange desde culturas importantes para a alimentação humana e animal, como gramíneas e leguminosas, como plantas de interesse comercial para a indústria de papel e celulose, como o pínus e o eucalipto.

Os inoculantes comercializados nacionalmente são produzidos utilizando estirpes de elevada eficiência econômica e são encontrados basicamente em duas formulações: líquidos e turfosos. O mercado ainda mostra-se bastante seletivo, concentrando cerca de 99 % das doses de inoculantes comercializadas para a cultura da soja. Porém,

pesquisas anuais mostram um aumento dos registros de inoculantes no MAPA, para as culturas de gramíneas importantes como cana-de-açúcar, milho, trigo e arroz.

O primeiro inoculante para a cultura de cana-de-açúcar foi desenvolvido pela EMBRAPA Agrobiologia (RJ) a partir dos resultados dos experimentos de campo de Oliveira e colaboradores (2002), onde foi avaliado o efeito da inoculação de misturas bacterianas (*Gluconacetobacter diazotrophicus, Herbaspirillum seropedicae, Herbaspirillum rubrisubalbicans, Azospirillum amazonense* e *Burkholderia tropica*) em material micropropagado das variedades SP701143 e SP813250 de cana-de-açúcar e verificada a resposta positiva sobre a FBN, com contribuição média de aproximadamente 30 % do nitrogênio acumulado (EMBRAPA, 2008).

Também deve-se à EMBRAPA Soja (PR) em parceria com a Universidade Federal do Paraná (UFPR) e a iniciativa privada (Stoller do Brasil) o desenvolvimento do primeiro inoculante comercial (Masterfix Gramíneas) para o milho, trigo e arroz disponível no mercado brasileiro. Estes produtos foram desenvolvidos após ensaios agronômicos utilizando estirpes de *Azospirillum brasilense* AbV5 e AbV6 em veículos turfoso e líquido. Ao longo dos cinco anos de duração dos experimentos em campo, pode-se constatar incrementos médios de 25 % a 30 % na produtividade do milho e de 8 % a 11 % em trigo. O produto já está sendo comercializado e vem se mostrando satisfatório, pois representa um baixo investimento, menos que 1% do custo de produção total dessas gramíneas, bons índices de rendimento (produtividade) e rentabilidade ao agricultor (EMBRAPA, 2011).

2.2 Bactérias do Gênero *Azospirillum*: Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) e Promoção do Crescimento Vegetal

Como se sabe as bactérias diazotróficas e promotoras do crescimento vegetal utilizam mecanismos benéficos de interação com as plantas e por isso muitas são de extrema importância para a prática de inoculação agrícola. As extensões desses efeitos nos vegetais vêem sendo estudadas graças aos avanços da Microbiologia Agrícola.

As bactérias fixadoras de nitrogênio são comumente classificadas em três grupos: (1) diazotrofos de vida livre, que fixam N_2 para seu próprio consumo, (2) diazotrofos associativos, que contribuem para o crescimento de plantas sem a formação de estruturas diferenciadas, e os (3) diazotrofos simbióticos, que estabelecem uma íntima relação com a planta hospedeira formando estruturas especializadas denominadas de nódulos onde ocorre a conversão do N_2 atmosférico em NH_3 (EVANS e BURRIS, 1992). Entre os vários grupos de

procariotos que fixam nitrogênio podem ser citadas algumas espécies estudadas, tais como *Rhodospirillum rubrum* (fotossintética), *Clostridium spp*. (anaeróbica), *Azotobacter spp*. e *Derxia spp*. (ambas aeróbicas), *Azospirillum spp*., *Herbaspirillum spp*., *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Azorhizobium caulinodans*, *Azoarcus spp*. e *Burkholderia spp*. (microaeróbicas), além de alguns representantes das cianobactérias e actinomicetos (*Frankia sp*.). (STACEY et al., 1992). Além destes destacam-se ainda os diazotrofos descritos dos gêneros *Beijerinckia* (DOBEREINER, 1961), *Klebsiella* (LADHA et al, 1983), *Pseudomonas* (BARRAQUIO et al., 1983), *Campylobacter* (McCLUNG e PATRIQUIN, 1980), *Enterobacter* (HAAHTELA et al., 1981) e *Paenibacillus* (ASH et al, 1993).

As bactérias do gênero *Azospirillum* são classificadas como diazotróficas associativas, Gram-negativas, em forma de bastonete, com movimento ativo, apresentando diâmetro entre 0,8 e 2 μm e 2 a 4 μm de comprimento e com a presença de grânulos intracelulares de poli-β-hidroxibutirato (PHB) (DOBEREINER et al, 1995).

Estas bactérias encontram-se associadas a várias gramíneas, na região rizosférica, colonizando principalmente a zona de elongação e os pêlos radiculares (DOBEREINER et al., 1995; STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000; DOBEREINER e DAY, 1976). Segundo Dobereiner (1992), algumas estirpes são encontradas também nos tecidos internos, como no interior das raízes, caules e folhas, sendo assim denominadas de diazotróficas endofíticas facultativas, termo sugerido para distinguir este gênero, das bactérias endofíticas obrigatórias, como as da espécie *Gluconacetobacter diazotrophicus* encontradas obrigatoriamente nos tecidos internos de plantas como cana-de-açúcar. Conforme relatado por HUBBELL et al., 1978 e MAGALHÃES et al., 1979, algumas espécies de *Azospirillum* invadem as raízes, através da lamela média dos tecidos mais envelhecidos, formando áreas transparentes, que sugerem hidrólise das células do vegetal por enzimas pectinolíticas, produzidas por essas bactérias, já que essa região celular é rica em pectina, celulose e hemicelulose, como ocorre em plantas de milho crescidas durante o período reprodutivo. Dentro da planta, as bactérias ficam livres da competição com os demais habitantes da rizosfera e as trocas de nutrientes entre estas e a planta hospedeira se tornam muito mais efetivas (MELO e AZEVEDO, 1998).

Os organismos do gênero *Azospirillum* são considerados ubíquos, (DOBEREINER E PEDROSA, 1987), colonizando plantas crescidas em diferentes habitats, algumas espécies como *A. lipoferum, A. amazonense, A. halopraeferans e A. irakense* habitam preferencialmente ambientes de clima tropical (DOBEREINER et al., 1995). Além disso, são encontradas em associação com plantas monocotiledôneas, incluindo milho, arroz, cana-de-

açúcar, sorgo, gramíneas forrageiras como *Digitaria* e "*Kallar grass*" (DOBEREINER et al., 1976; HAAHTELA et al., 1981; REINHOLD et al., 1986; RENNIE, 1980; WONG e STEMBERG, 1979) e com dicotiledôneas (RAO e VANKATESWARTU, 1982). Algumas espécies, como *A. brasilense*, ocorrem associadas majoritariamente a trigo, arroz, centeio, aveia e gramíneas com a via fotossintética C_3 (DOBEREINER e De-POLLI, 1980; ROCHA et al., 1981). Este padrão e colonização mostra uma tendência de especificidade entre grupos de plantas e as bactérias (MELO e AZEVEDO, 1998).

Embora o processo de associação entre *Azospirillum* e a planta hospedeira não esteja completamente desvendado, um modelo foi proposto por DEL GALLO e FENDRIK (1994) e está descrito na Figura 1. Através de métodos indiretos, foi possível provar no modelo em questão, que mecanismos semelhantes aos que ocorrem entre *Rhizobium* e as leguminosas parecem estar envolvidos na ligação das bactérias com a superfície da raíz, inclusive com a participação de polissacarídeos bacterianos (KATUPITIYA et al., 1995). No caso de espécies de *Rhizobium* que infectam raízes de leguminosas, o sítio de reconhecimento para a ligação do microrganismo à raíz da planta está na cápsula; o receptor do vegetal é constituído por determinadas glicoproteínas denominada lectinas (BARBOSA et al., 1998).

Figura 1 - Modelo de interação *Azospirillum* e planta hospedeira

Fonte: Modificado de (DEL GALLO e FENDRIK, 1994).

A fixação biológica de nitrogênio por *Azospirillum* e os demais diazotrofos, nas condições ambientais de temperatura e pressão, ocorre em função da atividade do complexo enzimático da nitrogenase.

A nitrogenase é composta por duas unidades básicas: a dinitrogenase redutase, uma ferro-proteína ou NifH, que coleta a força redutora e energia, e a dinitrogenase, uma ferro-molibdênio (Fe-Mo) ou NifDK, proteína que coleta e reduz o substrato. A proteína NifH é um dímero γ_2 (produto do gene *nifH*), contém um núcleo 4Fe-4S e sua função é transportar elétrons até a proteína NifDK que, por sua vez é um tetrâmero $\alpha_2\beta_2$ (produto dos genes *nifD e nifK*) contendo dois grupos prostéticos: 2 centros de Fósforo e 2 cofatores ferro-molibdênio (Fe-Mo) (BURRIS, 1991).

A redução do nitrogênio molecular a amônia pela nitrogenase envolve as seguintes etapas: a Fe-proteína, com duas moléculas de MgATP ligadas e seu grupamento [4Fe-4S] reduzido, liga-se a uma metade da MoFe-proteína (uma subunidade αβ). Esta ligação permite a hidrólise de duas moléculas de Mg-ATP a duas moléculas de Mg-ADP e a transferência de um único elétron da Fe-proteína para a Mo-Fe-proteína. O receptor dos elétrons é o grupamento P, que provavelmente age como um mediador na transferência eletrônica. Os elétrons (um ou mais) são então transferidos ao cofator Fe-Mo, onde o substrato liga-se, sendo então reduzido. Depois de cada evento de transferência eletrônica, a Fe-proteína deve se dissociar da Mo-Fe-proteína para ser reduzida por uma proteína doadora de elétrons (ferredoxina ou flavodoxina) substituindo Mg-ADP por Mg-ATP. Então, este ciclo deve ser repetido no mínimo 8 vezes para cada N_2 reduzido e H_2 formado (IGARASHI & SEEFELDT, 2003). Em resumo, a fixação de nitrogênio pode ser representada pela equação abaixo:

$$\mathbf{N_2 + 8e^- + 16\ ATP + 8\ H^+ \rightarrow 2\ NH_3 + 16\ ADP + 16\ P_i + H_2}$$

Outros dois tipos de nitrogenase independentes de molibdênio já são conhecidas, como as que contem vanádio ou apenas ferro, as chamadas nitrogenases alternativas. Esses tipos já foram encontrados em espécies dos gêneros: *Clostridium, Rhodobacter, Anabaena, Rhodospirillum, Heliobacterium* e *Azospirillum* (IGARASHI & SEEFELDT, 2003).

Dentre os fatores que afetam a atividade da nitrogenase, a sensibilidade dessa enzima ao oxigênio é o de primordial importância devido à característica redutiva do

processo de fixação de nitrogênio. Para neutralizar a incompatibilidade entre o processo de fixação de N_2 atmosférico e seu metabolismo, os organismos diazotróficos desenvolveram vários mecanismos para proteger o sítio da nitrogenase da interferência do oxigênio, seja por consumo do O_2 excedente, barreiras à difusão, ou ainda, por mecanismos de compartimentalização (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Como exemplo clássico podem ser citadas as bactérias do gênero *Azospirillum* que formam uma película de crescimento característica quando cultivadas em meio semi-sólido isento de nitrogênio fixado. Esta película é responsável pela mediação da concentração de O_2 no meio e sua compatibilidade com a síntese e a atividade da nitrogenase (DÖBEREINER e DAY, 1976).

Além de fixar N_2 atmosférico as bactérias do gênero *Azospirillum* são capazes de produzir fitormônios importantes para o desenvolvimento vegetal, e outras substâncias ativas na transformação, mobilização e solubilização, de nutrientes do solo e sua absorção pelas plantas ocasionando o aumento da produtividade (DEY et al., 2004). Devido a essas características esses organismos também são denominados promotores do crescimento vegetal (DEY et al., 2004).

Os principais fitormônios produzidos pelas bactérias do gênero *Azospirillum* são: Giberelinas, Citocininas e Auxinas (TIEN et al., 1979). Os resultados da produção dessas substâncias são marcantes na morfologia e fisiologia das plantas, pois, quando sintetizados aceleram a taxa de respiração celular e o metabolismo do vegetal promovendo alterações na densidade e no comprimento dos pêlos radiculares, resultando no aumento da superfície do sistema radicular e permitindo melhor exploração dos nutrientes e água do solo (OKON et al., 1996; REIS, 2007; PUENTE et al., 2009).

Além dos fitormônios essas bactérias são capazes de produzir substâncias solubilizadoras de alguns nutrientes vegetais encontrados na forma mineral insolúvel, como ferro e fosfatos. Este fato foi observado por alguns autores como Lian et al. (1983) e Kapulnik et al. (1983), em experimentos de inoculação de *A. brasilense* em plantas de milho, trigo e sorgo, tendo resultado num aumento significativo na absorção de potássio, ferro, nitrato e fósforo.

Os agentes quelantes responsáveis pela complexação e redução dos íons Fe^{3+} (íon férrico) de minerais insolúveis em Fe^{2+} (íon ferroso), transportando-os para o interior das células são denominados sideróforos (MADIGAN et al., 2010). Em *Azospirillum*, após a complexação dos íons férricos por ação das enterobactinas, derivados de grupos fenólicos como os catecolatos, os ferrisideróforos são transportados e reconhecidos por proteínas receptoras de elevada especificidade (HEILDINGER et al., 1983). Esses

microrganismos têm como vantagem sobre os outros, uma vez que se no ambiente onde se encontram observa-se baixas concentrações de ferro, esta quantidade estaria disponível apenas para eles próprios (HOHNADEL e MEYER, 1988) e numa competição entre essas rizobactérias e um patógeno esta característica garante a substituição ou exclusão deste último (WELLER, 1988).

Na solubilização dos fosfatos, os principais mecanismos envolvido por esses microrganismos são a produção de gás carbônico (CO_2) e ácidos orgânicos, redução de compostos férricos a ferrosos e a produção de H_2S sob baixas concentrações de O_2 (MULDER et al., 1969).

Algumas linhagens de *Azospirillum* também são capazes de aumentar a absorção de água pelas plantas em condições normais de campo. Essas linhagens podem apresentar um coeficiente de extração de umidade de solo da ordem de 15 % quando comparadas com plantas não inoculadas (KAPULNIK et al., 1985). Este fato mostra que a inoculação de *Azospirillum* pode ser um aliado ao combate do estresse hídrico em plantas.

As características das bactérias fixadoras de nitrogênio e promotoras do crescimento vegetal citadas neste item garantem às plantas uma maior supressão de patógenos (MELO, 1998).

2.3 A Utilização dos Fertilizantes Nitrogenados Sintéticos e as Vantagens do Uso dos Inoculantes

Os fertilizantes nitrogenados sintéticos são largamente utilizados visando o aumento da produtividade agrícola, já que o solo brasileiro é pobre em compostos nitrogenados e para os vegetais, o nitrogênio é o nutriente exigido em maior quantidade, sendo componente dos aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos e da molécula de clorofila (BULL, 1993; EPSTEIN e BLOOM, 2006). Entre os fertilizantes nitrogenados sintéticos têm-se como principais o sulfato e o nitrato de amônio ($(NH_4)_2SO_4$ e NH_4NO_3) e a uréia ($CO(NH_2)_2$).

Segundo dados da Associação Nacional de Difusão de Adubos (ANDA) em 2011, aproximadamente 28.326.255 toneladas de fertilizantes foram vendidas no Brasil**.** O uso indiscriminado de fertilizantes nitrogenados pelos agricultores, ocasiona problemas no desempenho da própria lavoura, pois, a dose deste elemento fornecida, deve ser equilibrada em relação à quantidade dos outros nutrientes (JORNAL AGRÍCOLA, 2007), além dos

impactos ambientais que comprometem os ecossistemas agrícolas a médio e longo prazo, além do aumento de gastos.

Desde a produção, através da queima de combustíveis fósseis para obtenção de energia, como no processo de produção da amônia (Haber-Bosch) e o uso deliberado ocasionam problemas como contaminação da atmosfera, de mananciais e lençóis freáticos, a eutrofização dos rios e lagos e a acidificação dos solos (MCLAUGHLIN et al., 2000; HUNGRIA E VARGAS, 2000). Como exemplo prático, temos o sulfato de amônio, extensamente utilizado nas lavouras, que apresenta elevada solubilidade em água podendo contaminar cursos d'água, tornando-os impróprios para uso em qualquer finalidade e através da decomposição liberando na atmosfera gases nitrosos tóxicos (NO_x) que contribuem para a destruição da camada de ozônio e consequentemente o efeito estufa (VALE FERTILIZANTES, 2012).

Conforme relatado em pesquisas da Fapesp (2008), o considerável aumento do uso destes fertilizantes são um dos indicadores quanto às implicações nas mudanças climáticas do planeta, uma vez que o nitrogênio em excesso aumenta a atividade biológica marinha e a absorção de dióxido de carbono, o que, por sua vez, leva à produção de mais dióxido nitroso considerado ainda mais prejudicial ao aquecimento global do que o metano ou o próprio dióxido de carbono, devido a isso, a disseminação das técnicas de inoculação é uma das ações previstas no Programa Agricultura de Baixo Carbono (ABC) do Ministério da Agricultura cuja a iniciativa pretende aliar produção de alimentos e bionergia com redução dos gases de efeito estufa (MAPA, 2011).

Além dos aspectos ambientais negativos, na economia, o Brasil permanece dependente da disponibilidade e dos preços do mercado internacional, uma vez a produção nacional de fertilizantes supre cerca de 38,1 % do mercado. O cenário futuro apresenta-se com o incremento do consumo de fertilizantes, como evidenciado pelos registros históricos de produção, importação e consumo de fertilizantes no Brasil. Considerando a quantidade de fertilizantes comercializados em 2010, observa-se um aumento de cerca de 9,4 % comparativamente a 2009, associado a um aumento de 38,6 % na quantidade de fertilizantes importada neste mesmo período (ANDA, 2011). Aliado a este fato, tem-se uma conjuntura internacional onde o cenário de preços é altamente instável e dependente de fatores extrínsecos à economia brasileira. Traz também, uma economia ao produtor, uma vez que os fertilizantes nitrogenados podem chegar a participar com até 40 % dos custos de produção agrícola (HUNGRIA E VARGAS, 2000; IBGE, 2010).

Devido aos problemas ambientais e econômicos ocasionados pelos fertilizantes nitrogenados sintéticos, podemos listar alguns benefícios da adoção dos inoculantes nas práticas agrícolas:

- A redução do uso de fertilizantes minerais, associada a uma maior eficiência na absorção dos nutrientes pelas plantas cultivadas e o aumento da produtividade, são metas possíveis de serem atingidas pela exploração e utilização de microrganismos eficientes na promoção do desenvolvimento de plantas (DOBBELAERE et al., 2003; LUGTENBERG e KAMILOVA, 2009). De acordo com Zilli et al. (2010), a inoculação das sementes de soja com *Bradyrhizobium* proporcionou rendimento de grãos semelhante ao fertilizante nitrogenado com 200 kg ha^{-1} de N, evidenciando assim a eficiência desta tecnologia. Em experimentos de campo, com aplicação de inoculantes líquidos a base de *A. brasilense* AbV5 em milho e sem a fertilização nitrogenada sintética, Santos (2011) conseguiu um aumento de produção de aproximadamente 60 %, comprovando mais uma vez a potencialidade destes microrganismos na prática de inoculação em cereais;
- Oferece uma maior economia ao agricultor, influenciando a balança comercial, já que a grande maioria dos fertilizantes sintéticos é importada. Os ganhos econômicos pela substituição dos fertilizantes nitrogenados pelos inoculantes, é de aproximadamente 3 bilhões de dólares anuais ao país (HUNGRIA *et al*., 2005);
- Melhora a qualidade dos produtos agrícolas podendo diminuir a contaminação por micotoxinas, já que em experimentos, in vitro, várias estirpes bacterianas mostraram atividade antagonista ao fungo *Aspergillis flavus*, produtor de aflatoxina, sendo capazes de degradar a toxina (CHO et al., 2000).

2.4. Formulações de Meios para a Produção de Biomassa de *A. brasilense*: Exigências Nutricionais e Condições de Cultivo

Na preparação das formulações de meios para produção massal de microrganismos utilizados em inoculantes agrícolas, lança-se mão das formulações sintéticas e complexas. As primeiras são muito utilizadas em laboratórios, nos experimentos em escala de bancada, já que apresentam composição bem definida e permitem a reprodutibilidade, a simplificação dos balanços materiais e possibilita inferir a influência de cada componente do meio no resultado do cultivo microbiano. Já as formulações complexas ou naturais são preparadas utilizando produtos de origem animal, vegetal ou microbiana, de composições químicas não definidas quali e quantitativamente. A composição das formulações de meios,

de um modo geral, deve levar em conta a composição elementar do microrganismo a ser cultivado e sua fisiologia, ou seja, a sua capacidade de converter as substâncias químicas do meio de cultura em massa celular ou outros produtos desejados (LIMA, 2001). Os principais macro e micronutrientes necessários para a produção de biomassa de microbiana estão descritos a seguir:

2.4.1 Fontes de Carbono

As bactérias do gênero *Azospirillum,* como *A. brasilense* e *A. lipoferum*, são capazes de utilizar ácidos orgânicos como malato, lactato, succinato, piruvato e outros intermediários do ciclo de Krebs como fontes de Carbono observando-se um ótimo crescimento celular. O *Azospirillum brasilense* é particularmente exigente em suas necessidades de Carbono. Em carboidratos como D-glucose, D-manose, D-sorbose e sacarose, segundo Dobereiner e Pedrosa (1987), observou-se pouco ou nenhum crescimento.

Quanto ao metabolismo de carbono, as seguintes características foram detectadas: (I) a ausência da via das Pentoses Fosfato (Via do Fosfogluconato) em ambas as espécies, (II) a degradação de frutose através da Via de Embden-Meyerhor-Parnas (Via Glicolítica) por *A. brasilense* e (III) a presença das vias de Entner Doudoroff e Glicolítica em *A. lipoferum* (WESTBY et al., 1983). O metabolismo intermediário, em *A. brasilense*, conta com vias como o ciclo de Krebs completo e do glioxilato para assimilação de acetato, além disso, para a síntese de poliidroxibutiratos (PHB), foram observadas enzimas da gliconeogênese (LOH et al., 1984).

2.4.2 Fontes de Nitrogênio

O nitrogênio é o segundo macronutriente em importância para as bactérias do gênero *Azospirillum*, já que é um elemento essencial para a biossíntese de proteínas, ácidos nucléicos e polímeros da parede celular. Para a síntese de proteínas são requeridos, geralmente, alguns aminoácidos da série L, enquanto que, para a construção da parede celular são necessários alguns D-aminoácidos como a D-alanina, e o D-aspártico. Em alguns casos, como acontece com *Azospirillum lipoferum*, a fixação de Nitrogênio requer peptídeos de histidina (HARTMANN e BURRIS, 1988). Em baixas quantidades de Nitrogênio e presença de carbono, o metabolismo dessas bactérias é alterado. As células cessam sua reprodução, mas seguem metabolizando o Carbono e formando produtos de reserva interna em grande

quantidade, como os poli-β-hidroxibutiratos, e também, alguns exopolissacarídeos. (LIMA, 2001). Além disso, quando o nitrogênio encontra-se limitante observa-se elevadas atividades da Nitrogenase, que contribui na fixação de nitrogênio (STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000).

As fontes de nitrogênio utilizadas para o cultivo de bactérias diazotróficas, como no caso do *Azospirillum spp*. podem ser de origem inorgânica ou orgânica. As de origem inorgânica, geralmente sais nitrogenados, que devem ser bem projetadas para evitar grandes alterações de pH quando consumidas. Já as fontes orgânicas têm a vantagem de não provocarem grandes alterações de pH quando consumidas. As principais fontes orgânicas de Nitrogênio são: aminoácidos, uréia, extrato ou água de levedura, água de maceração de milho e outros subprodutos ou resíduos industriais orgânicos (BALATTI, 1992).

O nitrogênio em *Azospirillum* influencia diretamente as condições metabólicas referentes ao consumo de oxigênio, pois, em cultivos supridos com fonte de nitrogênio combinado, o comportamento microbiano observado é aeróbio, porém, quando dependem da fixação de N_2, são microaerófilos (DOBEREINER et al., 1995) .

2.4.3 Fatores de Crescimento e Micronutrientes

Por fatores de crescimento entendem-se produtos orgânicos, como vitaminas, aminoácidos e outros, essenciais a nutrição celular, que a célula não sintetiza, e são importantes para processos biossintéticos e catalíticos, devendo, portanto, ser suplementado ao meio de cultura. A necessidade de suplementação desses produtos depende da célula que se está cultivando. Podem ser adicionados aos meios de cultura como produtos puros, como por exemplo, ácido glutâmico, glutamato monossódico, biotina, vitamina B_{12} e ácido fólico. Porém uma forma mais prática e mais barata de acrescentá-los é através de produtos extraídos de materiais biológicos, como o extrato e a água de levedo, peptona, extrato de carne e água de maceração de milho. A água de levedura é uma excelente fonte de fatores de crescimento, sendo relativamente barata e de fácil preparação (LIMA, 2001).

Os micronutrientes visam suplementar os cultivos com elementos em quantidades traços, ou seja, as concentrações encontram-se por volta de 10^{-5} a 10^{-6} mol/L (BALATTI, 2008). Esses são em geral metais que as células utilizam, principalmente em seus sistemas enzimáticos como cofatores. Segundo Lehninger (2006), os principais micronutrientes são: K, Na, P, Cl, Mg, Mo, Mn, Fe, Ca, Cu, Zn, Co, V, Ni, Cr, Se, Si, Sn e As. Os micronutrientes podem ser fornecidos em suas formas salinas, como por exemplo:

K_2HPO_4, KH_2PO_4, $MgSO_4$, NaCl, $(NH_4)_2HPO_4$, $CaSO_4$, $Ca(NO_3)_2$, $CaCO_3$, $FeCl_3$, $MnSO_4$ e KNO_3 (BALATTI, 1992; PEPPLER e PERLMAN, 1979). Alguns micronutrientes são necessários em quantidades tão pequenas, que sua presença na água de preparação ou ainda como impurezas dos demais produtos químicos ou biológicos utilizados, é suficiente para suprir todas as necessidades da cultura.

2.4.4 Processos de Produção: Métodos Fermentativos

Os processos de produção de inoculantes microbianos são basicamente de dois tipos: a cultura sobre substrato sólido, muito comum na produção de ectomicorrizas, e o cultivo em fermentação submersa seguido da veiculação da biomassa.

No primeiro caso, as células do microrganismo selecionado desenvolvem-se sobre um suporte inerte previamente esterilizado, embebido em um meio de cultura complexo, contidos em sacos plásticos, armazenados em ambientes com umidade e temperatura controladas. Porém, apesar de extremamente simples, este método possui algumas dificuldades inerentes ao processo de fermentação semi-sólida: a dificuldade de controle de pH, da temperatura e da disponibilidade de oxigênio e de outros substratos para a biomassa em desenvolvimento, com os conseqüentes problemas de ampliação de escala (LIMA, 2001).

No caso da fermentação submersa, é possível o controle e o estabelecimento das condições mais propícias para o crescimento da biomassa microbiana selecionada. A ampliação da escala pode ser realizada pelos métodos convencionais de cultivo e, em geral, os cultivos apresentam produtividades mais elevadas (PRADELLA et al., 1990). A veiculação da biomassa produzida pela fermentação submersa pode ser conseguida pelo envolvimento da biomassa em partículas de gel hidrófilo de polímeros naturais (LE TACON et al., 1983), ou por sua mistura com um substrato inerte, como por exemplo, a turfa.

2.5 VEICULAÇÃO DA BIOMASSA

Após a produção da suspensão bacteriana, a biomassa pode ser diretamente aplicada às sementes ou ao local destinado ao seu plantio, ou ainda, ser agregada a um material inerte, um suporte (LIMA, 2001).

O primeiro inoculante comercialmente produzido, o Nitragin®, exclusivamente para leguminosas e a base de *Rhizobium*, foi produzido em gelatina e

posteriormente em meio de ágar nutriente. Tais inoculantes foram usados pela aplicação direta nas sementes de suspensão em leite desnatado ou pela mistura da bactéria com solo contendo restos de leguminosas cortados, que eram espalhados sobre o campo. Culturas de ágar foram mudadas para inoculantes em sólido, em 1920, nos Estado Unidos e, em 1952, na Austrália, principalmente devido à mortalidade microbiana após a aplicação. A mortalidade durante a fase de secagem pôde ser significativamente reduzida pela adição de 9 % de maltose (WILLIAMS, 1984).

Atualmente os tipos de veículos ou suportes disponíveis para as tecnologias de inoculação são variáveis, no mercado nacional, encontram-se desde veículos líquidos, no caso, o próprio meio de cultivo ou hidrogéis, veículos sólidos, como e turfa, biopolímeros e outros materiais naturais, como o bagaço de cana-de-açúcar, o glicerol proveniente da indústria de biocombustíveis, além de produtos de baixo custo como o amido, a sacarose, óleos vegetais, rochas ricas em fosfatos e outros minerais, ácidos húmicos ou sintéticos que permitem a imobilização e conservação das células microbianas até mesmo materiais liofilizados (SCHUH, 2005). Além da performance na imobilização celular, ao se desenvolver um veículo inoculante procura-se utilizar materiais que diminua os custos produtivos.

2.5.1 Padronização do Inóculo e Viabilidade Celular

O sucesso da prática de inoculação dependente diretamente do inóculo. A quantidade e a qualidade do inóculo podem determinar o êxito do processo. O controle de qualidade dos inoculantes, em relação à quantidade e a qualidade das células microbianas, foi uma preocupação dos pesquisadores desde os primórdios da comercialização desses produtos no Brasil (FREIRE e VIDOR, 1981; LOPES e GIARDINI, 1981). Sendo assim, a partir de 2004, pela Instrução Normativa Nº 5, o Ministério da Agricultura oficializou que os inoculantes devem apresentar 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 de, no mínimo, de seis meses. Toda a normativa, porém, foi redigida com base em inoculantes contendo rizóbios. Segundo Hungria (2004), no caso de inoculantes para não-leguminosas utilizando *Azospirillum*, a concentração celular mínima exigida, neste caso, deve ser de $1,0 \times 10^8$ células viáveis/g ou mL. Os inoculantes também devem ser elaborados em suporte estéril e estar isentos de microrganismos não especificados na diluição de $1,0 \times 10^{-5}$ (MAPA, 2004).

A maior dificuldade, no caso de inoculantes a base de *Azospirillum*, tem sido a baixa concentração de celular devida à mortalidade precoce, com o uso de substâncias acondicionadoras nas formulações inoculantes procura-se diminuir a extensão deste problema.

2.5.2 Adição de Substâncias Acondicionadoras em Formulações Inoculantes

Várias substâncias vêm sendo testadas como acondicionadores de microrganismos, ou seja, substâncias que assegurem a estabilidade e viabilidade das células bacterianas, atuando como agente protetor por longos períodos de tempo, já que durante o armazenamento, as células são submetidas a condições adversas como temperatura, salinidade, substâncias produzidas pela semente, dissecação (DEAKER et al., 2004), predação por protozoários e competição com as populações indígenas por substratos orgânicos (KEYA e ALEXANDER, 1975). Além da característica protetora é desejável que essas substâncias sejam de fácil manipulação e não possuam toxicidade a bactéria durante o processo de inoculação (TUMELERO e DENARDIN, 2008), além disso, servem também como suportes ou veículos para as células. Dentre as mais comuns, encontram-se biopolímeros importantes como carboximetilcelulose (CMC), polivinilpirrolidona (PVP), goma xantana, outras gomas de origem microbiana ou vegetal e o glicerol.

A goma xantana é um heteropolissacarídeo de origem microbiana bem conhecida. Foi descoberto nos anos 50, tendo sua produção comercial se iniciado em 1964 nos Estados Unidos e comercializado sob a marca comercial Kelsan® (COTTRELL e KANG, 1978). Este exopolissacarídeo produzido pela bactéria *Xanthomonas campestris* tem um alto peso molecular, normalmente composto de um heptassacarídeo constituído de glicose, manose e ácido glucurônico, na proporção de 2:2:1 (DRUZIAN e PAGLIARINI, 2007). Sua propriedade mais relevante é o sinergismo com galactomananas, promovendo a formação de géis termorreversíveis que podem ser utilizados em uma vasta gama de produtos, principalmente alimentícios, como estabilizantes de emulsões (PARKER et al., 1995), além disso, com o advento das mais diversas tecnologias de inoculação, observou-se que a goma xantana pode ser usada para encapsular células bacterianas e seu efeito protetor é atribuído a sua capacidade térmica, de diminuir as transferências de calor, boas propriedades reológicas e alta atividade de água (MUGNIER e JUNG, 1985).

O polivinilpirrolidona (PVP), composto por poli[1-vinil-2-pirrolidona], conhecido comercialmente por Povidone, é um polímero sintético, formulado a partir de formadeído e acetileno (LITTER, 1964). É utilizado na indústria de cosméticos, têxtil,

farmacêutica e como aditivo para melhorar características de determinados produtos. O PVP como agente protetor para rizóbio foi patenteado na Nova Zelândia, em 1981, pela Coated Seed (ROUGHLEY, 1988). O PVP é um produto capaz de melhorar as características físico-químicas de acondicionadores para inoculantes de leguminosas (CASTAÑEDA, 1989). O uso de PVP em inoculantes formulados a base de biopolímeros, proporcionaram concentrações de células viáveis, das estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 de *Bradyrhizobium elkanii*, iguais ou superiores aquelas obtidas por estes mesmos inoculantes não aditivados, após oito meses de armazenamento sob condições de temperatura ambiente (DENARDIN, 1997). Estudos indicam que o PVP possui capacidade de proteger as bactérias através da absorção de compostos poli-fenólicos dos exudatos das sementes e formação de filme protetor, impedindo perdas de água (BUSHBY e MARSHALL, 1977).

O glicerol é um acondicionador bastante utilizado para a conservação das culturas. Segundo Campos et al., (2004) e Vendan e Thangaraju (2007), o glicerol apresenta propriedade crioprotetora muito utilizada nos processos de congelamento, pois impede a difusão da água no interior das células e reduz a formação de cristais de gelo, além de estabilizar alguns componentes da membrana celular, impedindo alterações celulares; tem alta capacidade de água de ligação, ou seja, age como um hidratante celular, protegendo as células contra os efeitos da dessecação e retardando a taxa de secagem.

2.5.3 Veículos Sólidos

Este tipo de veículo para inoculantes encontra-se entre os mais difundidos na sociedade, pois estão disponíveis em vários locais e muitos são de baixo custo. A literatura reporta diversos materiais que podem ser utilizados como suporte: turfa, perlita, terra de diatomácea, solo, vermiculita, polímeros como alginato, poliacrilamida, carragenas e várias gomas de origem microbiana e vegetal têm sido utilizados para imobilizar microrganismos diazotróficos e promotores do crescimento vegetal (SCHUH, 2005; BALATTI, 2008).

Segundo Balatti (2008), para que um suporte sólido seja adequado à veiculação de microrganismos, ele deve assumir as seguintes características:

- Não ser tóxico ao microrganismo;
- Apresentar um pH próximo a neutralidade, entre 6,5 e 7,0, em caso de acidez, deve-se ajustar utilizando Carbonato de Cálcio sólido;
- Ter alta capacidade de retenção de água, ou seja, atividade de água (a_w) elevada. Recomenda-se que no momento de sua umectação com o caldo nutritivo a umidade

residual deve estar próxima de 10 %, já que de outra forma o calor liberado durante a impregnação pode afetar a viabilidade das células.

Para a esterilização destes materiais, pode-se adotar métodos que utilizem desde vapor úmido, no caso, a autoclave, até radiações gama e choque térmico.

De todos os suportes sólidos utilizados, nota-se que a turfa é o material preferido. Os inoculantes turfosos têm origem de solos aluviais orgânicos e ácidos que são moídos, peneirados e corrigidos, visando elevar o pH para próximo da neutralidade. Paralelamente, em laboratório de microbiologia multiplicam-se, em fermentadores de diversos volumes, as estirpes da bactéria fixadora de N_2 de interesse. A produção ocorre injetando-se, assepticamente, determinado volume do caldo fermentado na turfa esterilizada (CÂMARA, 1998). Segundo Brockwell (1995), inoculantes a base de turfa esterilizada são preferidos, pois eles podem conter até 100 vezes mais bactérias que a turfa não esterilizada, além disso, a sobrevivência das cepas, a viabilidade e as propriedades fisiológicas das células podem ser mantidas por períodos extensos (BALATTI, 2008). Apesar da preferência quase que unâmine, certas especificidades negativas devido ao uso desta veiculação podem tornar-se impedimento para uma inoculação eficiente já que a turfa é obtida através de atividades extrativistas, e a sua extração em diferentes sítios confere desuniformidade na sua composição, podendo apresentar contaminação com metais pesados e/ou resíduos biológicos. Devido a esses problemas, a sociedade atual busca novos materiais para a produção de suportes para inoculantes.

O desenvolvimento de um novo veículo inoculante deve buscar a funcionalidade para diferentes espécies microbianas, ser oriundo de uma fonte renovável e de baixo custo, atóxico e biodegradável, apresentando eficiência e versatilidade para diferentes condições de solo e clima, podendo ser transportado e armazenado sob temperatura ambiente. Uma das formas de se alcançar o desenvolvimento de uma formulação inoculante próxima do ideal é a utilização de misturas de materiais, pela baixa probabilidade de encontrar todas as características desejáveis em uma única substância, sem acarretar impedimentos econômicos para o desenvolvimento do produto. A mistura em proporções adequadas de diferentes materiais que possam apresentar propriedades aditivas, quando às características desejáveis em uma formulação inoculante, pode levar ao desenvolvimento de um produto de baixo custo, cujas propriedades sinérgicas das substâncias participantes da mistura levem a uma maior eficiência dos efeitos promotores do crescimento vegetal pelo uso de insumos microbianos (van ELSAS e HEIJNEN, 1990).

A utilização de diferentes substâncias para a produção de uma mistura homogênea apresenta algumas dificuldades. Moléculas de elevado peso molecular, ou com

características contrastantes quanto à solubilidade em água, tendem a ser imiscíveis, o que pode resultar na instabilidade da mistura obtida, decorrente da ação de interações antagônicas entre os componentes da mistura. Uma das formas de se compatibilizar diferentes substâncias em uma mistura é a utilização de um agente compatibilizante, que apresente um peso molecular reduzido, com capacidade de interagir com as diferentes substâncias presentes na mistura, aumentando a estabilidade da formulação (KONING et al., 1998). Desta forma é possível a produção de misturas estáveis contendo fibras de cana-de-açúcar (bagaço), glicerol, amido, pó de rocha, glicerol, óleos vegetais, entre outras substâncias, através do processo industrial de moldagem por extrusão a quente.

Misturas semelhantes vêm sendo desenvolvidas por pesquisadores da Universidade Estadual de Londrina, com objetivo de desenvolver embalagens biodegradáveis para alimentos (DEBIAGI et al., 2010). A adequação da mistura utilizada para que se alcance um compósito que sirva como fonte de nutrientes para as plantas inoculadas, bem como para suportar o crescimento e a multiplicação de microrganismos, pode permitir a sua utilização como um biofertilizante de baixo custo, caracterizando uma inovação ao processo de produção de inoculantes bacterianos para uso na agricultura.

2.5.4 Veículos Líquidos

A obtenção de um veículo líquido é um processo delicado já que o microrganismo, geralmente encontrado no solo, apresenta-se de forma vulnerável, submetido a um entorno muito particular, no qual nos leva a estabelecer com muito cuidado e seletividade a eleição de uma série de componentes que têm por função resguardar a célula a fim de alcançar produtos de longa vida e que satisfaçam as expectativas dos agricultores.

A principal preocupação neste tipo de veiculação é a estabilização da suspensão celular por longos períodos, com elevada sobrevivência e persistência das propriedades fisiológicas das cepas. Para se obter uma boa estabilização das suspensões celulares deve-se levar em conta a regulação da pressão osmótica, a preservação da integridade da membrana e a fragilidade da bactéria. A pressão osmótica pode ser regulada empregando-se soluções de Cloreto de Sódio 0,4 mol/L ou Sacarose 0,5 mol/L. Quanto à fragilidade celular, evita-se adicionando aos meios gelatina, goma xantana, polivinilpirrolidona. A membrana pode ser preservada com adição de trealose ou Sulfato de Magnésio. O pH pode ser ajustado com a adição de sais de Fosfato. Com estes componentes

observa-se boas estabilizações com períodos de um ano, mantendo concentrações superiores a 10^9 células/mL e a persistência das propriedades fisiológicas celulares (BALATTI, 2008).

Os principais problemas encontrados no uso das veiculações líquidas são referentes ao transporte, armazenamento e aplicação homogênea nas sementes. Além disso, segundo Hungria et al. (2005), as formulações líquidas não podem ser aplicadas a todas as condições edafoclimáticas brasileiras, pois muitas vezes encontra-se ausente na formulação protetores de células contra estresse.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver formulações para a produção de biomassa de *A. brasilense* AbV5 e veículos sólidos e líquidos de alto desempenho para a utilização destes produtos como insumos agrícolas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolvimento de formulações de meios de cultivo para a produção de biomassa de *A. brasilense* AbV5;

- Desenvolvimento de formulações sólidas para veiculação de *A. brasilense* AbV5 como inoculantes para uso no sulco de plantio de culturas agrícolas não-leguminosas;

- Caracterização físico-química dos biocompósitos expandidos utilizados como veículos sólidos: pH, índice de expansão, densidade aparente e capacidade de absorção de água;

- Avaliação da sobrevivência de *A. brasilense* AbV5 nos veículos sólidos e líquidos;

- Avaliação do processo de imobilização/veiculação de *A. brasilense* AbV5 nos biocompósitos expandidos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PRODUÇÃO DE BIOMASSA

4.1.1 Microrganismo

Foi utilizada a estirpe de *Azospirillum brasilense* AbV5 gentilmente cedida pela Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, PR. Esta estirpe está registrada no MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) para uso como inoculante nas culturas de milho, trigo e arroz. A estirpe está armazenada sob criopreservação no laboratório de Bioquímica Molecular da Universidade Estadual de Londrina. Para a criopreservação, inoculou-se uma colônia do microrganismo crescido em meio Dyg's (RODRIGUES NETO et al., 1986) agarizado em meio Dyg's líquido, incubando as culturas em agitador orbital a 180 rpm, 28±2 ºC por 24 horas. Posteriormente alíquotas com de 1,0 mL da cultura bacteriana foram transferidas para microtubos criogênicos de 2,0 mL, adicionados de 1,0 mL de glicerol P.A. esterilizado, e armazenadas em freezer à -20 ºC até o momento do uso, sendo então denominadas culturas estoque.

4.1.2 Desenvolvimento de Meios de Cultivo para a Produção de Biomassa de *A. brasilense* AbV5

Para o desenvolvimento das formulações dos meios de cultivo utilizou-se um planejamento fatorial 2^4 com 3 réplicas no ponto central, totalizando 19 ensaios. As variáveis selecionadas para o estudo da produção de biomassa foram: glicerol (x_1), açúcar cristal (x_2), extrato de levedura (x_3) e monohidrogenofosfato de potássio (x_4). Foi também adicionado 0,08 mL/L de solução de micronutrientes para todas as formulações testadas. A Tabela 1 apresenta as concentrações das variáveis estudadas em cada uma das formulações testadas. Os meios foram preparados sem a adição de açúcar cristal e extrato de levedura, que foram adicionados posteriormente sob condições assépticas, e tiveram o pH ajustado para 6,5 com NaOH 0,1 M, já que os meios descritos para crescimento de *A. brasilense* encontram-se nesta faixa de pH. As soluções de açúcar cristal e extrato de levedura, ambas numa concentração de 10 %, foram esterilizadas separadamente em autoclave à 121 ºC, por 15 minutos para evitar a ocorrência de reação de Maillard, e adicionadas em volumes de solução equivalente para obtenção das concentrações apresentadas na Tabela 1. Após a confecção de

cada formulação, foram distribuídos 70 mL em frascos Erlenmeyers com capacidade para 125 mL e armazenados sob refrigeração (4 ^{o}C) até o momento do uso.

Tabela 1 - Delineamento fatorial empregado para o preparo das formulações de meios contendo glicerol, açúcar cristal, extrato de levedura e monoidrogenofosfato de potássio.

Formulação	Componentes							
	Variáveis Codificadas				Variáveis Decodificadas			
	x_1	x_2	x_3	x_4	% (v/v) Glicerol (x_1)	% (m/v) Açúcar Cristal (x_2)	% (m/v) Extrato de levedura (x_3)	% (m/v) Monoidrogenofosfato de Potássio (x_4)
Form1	-1	-1	-1	-1	3	1	1	0,05
Form2	1	-1	-1	-1	10	1	1	0,05
Form3	-1	1	-1	-1	3	5	1	0,05
Form4	1	1	-1	-1	10	5	1	0,05
Form5	-1	-1	1	-1	3	1	5	0,05
Form6	1	-1	1	-1	10	1	5	0,05
Form7	-1	1	1	-1	3	5	5	0,05
Form8	1	1	1	-1	10	5	5	0,05
Form9	-1	-1	-1	1	3	1	1	0,15
Form10	1	-1	-1	1	10	1	1	0,15
Form11	-1	1	-1	1	3	5	1	0,15
Form12	1	1	-1	1	10	5	1	0,15
Form13	-1	-1	1	1	3	1	5	0,15
Form14	1	-1	1	1	10	1	5	0,15
Form15	-1	1	1	1	3	5	5	0,15
Form16	1	1	1	1	10	5	5	0,15
Form 17	0	0	0	0	5	2	2,5	0,1
Form 18	0	0	0	0	5	2	2,5	0,1
Form 19	0	0	0	0	5	2	2,5	0,1

4.1.3 Preparo do Inóculo, Condições de Cultivo e Determinação da Produção de Biomassa

Para a realização dos ensaios de produção de biomassa, foi preparado um único inóculo a partir da cultura estoque, que foi transferido para Erlenmeyers de 125 mL com 25 mL de meio Dyg's, incubados em agitador orbital à 180 rpm, 28 ± 2 ºC por 24 horas. Transcorrido esse período, com o auxílio de uma escala nefelométrica de Mc Farland, inoculou-se 1,0 x 10^6 células/mL, em cada uma das formulações testadas, seguindo nova incubação em mesa agitadora orbital à 28 ± 2 ºC e 150 rpm. Os cultivos foram interrompidos após 12, 24 e 36 horas, sendo coletadas alíquotas de 5,0 mL em cada tempo. Estas alíquotas

foram centrifugadas a 6000 rpm, a 4 ºC por 10 minutos, descartando-se o sobrenadante. A biomassa precipitada por centrifugação foi lavada com 5,0 mL de solução salina, seguida de uma nova centrifugação e ressuspensão do precipitado. As suspensões assim obtidas tiveram a produção de biomassa determinada por espectrofotometria através da leitura das absorvâncias em comprimento de onda de 625 nm ($D.O._{625\ nm}$). Durante o ensaio, notou-se o aumento da consistência dos meios Form 1 e 15, o que poderia caracterizar a produção de exopolissacarídeos, a partir desta observação estas formulações foram selecionadas para refinamento dos dados.

4.1.4 Cinética de Crescimento de *A. Brasilense* AbV5 em Meio Dyg's nos Meios de Cultivo Form1 e Form15

Uma cinética do crescimento de *Azospirillum brasilense* AbV5 foi realizada nos meios Dyg's, Form1 e Form15. A partir de um inóculo preparado como descrito no item anterior, foram inoculados frascos Erlenmeyers de 250 mL com contendo 100 mL de cada um dos meios testados. A densidade inicial de inóculo utilizada foi de 1,0 x 10^7 cél/mL, e os cultivos foram incubados em mesa agitadora orbital à 150 rpm e 28 ± 2 °C. Após 3, 6, 10, 15, 21, 24, 27 e 31 horas de cultivo, alíquotas de 0,5 mL foram coletadas para a determinação do número de células viáveis por unidades formadoras de colônias (UFC). A contagem de unidades formadoras de colônias em placas foi realizada segundo o método de Miles e Misra (1938). Para cada coleta, as alíquotas amostradas foram convenientemente diluídas (10^{-1} à 10^{-7}), e gotas de 0,002 mL foram semeadas em meio Dyg's sólido. Após incubação por 18 horas em estufa a 30 ± 2 ºC, foi determinado o número de colônias formadas em cada diluição e tratamento, com uma média da contagem de 9 repetições para cada ponto obtido, exprimindo-se os resultados em UFC/mL de cultivo.

4.1.5 Produção de Exopolissacarídeos (EPS)

Para determinar a produção de exopolissacarídeos (EPS) por *Azospirillum brasilense* AbV5, inoculou-se 1,0 x 10^7 células, obtidas a partir de pré-inóculo em meio Dyg's obtido como descrito anteriormente, em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL dos meios Form1 e Form15. Os cultivos foram realizados sob agitação orbital de 150 rpm a 28 ± 2 °C, sendo realizadas coletas após 12 e 36 horas de cultivo.

Em cada coleta, o volume total de cada um dos cultivos foi centrifugado a 6000 rpm por 10 minutos a 4 °C para sedimentação da biomassa celular, sendo o sobrenadante, - denominado extrato livre de células (ELC) - coletado para a extração e quantificação dos exopolissacarídeos. O ELC foi transferido para uma proveta, e adicionado a um volume de 150 mL de etanol absoluto gelado, agitando-se vigorosamente para favorecer a precipitação do EPS presente no sobrenadante. O procedimento de precipitação com 3 volumes de etanol gelado, foi realizado três vezes, sempre centrifugando (6000 rpm, 4 °C por 10 min) para a separação da amostra e do etanol, e quantificando açúcares redutores e proteínas totais nas frações aquosas das amostras. Após isso, os precipitados foram ressuspensos em água destilada e mantidos em freezer, – 20 °C, por 24 horas, com o objetivo de aumentar o rendimento do material precipitado. Em seguida, as soluções com os precipitados foram centrifugadas novamente (6000 rpm, 4 °C por 10 min), descartando-se o sobrenadante. O EPS foi solubilizado no menor volume possível de água destilada (cerca de 5 mL) e submetidos à diálise exaustiva em um volume de 4000 mL de água destilada sob temperatura de 4 °C (MENESES et al., 2009). O procedimento de diálise prosseguiu até que o teor de açúcares redutores da água de diálise fosse próximo do branco. Por fim, uma alíquota do material dialisado foi transferida para cadinhos previamente tarados, secos em estufa a 70 ^{o}C por 48 horas, e a massa foi determinada por gravimetria para cada amostra analisada.

4.1.6 Consumo de Sacarose por *A. Brasilense* AbV5 nos Meios de Cultivo Form1 e Form15

Com o objetivo de verificar o consumo de sacarose por *A. brasilense* AbV5 nos meios Form1 e Form15, uma vez que a literatura descreve esta espécie como incapaz de metabolizar este dissacarídeo, foi feita a determinação dos teores de açúcares totais e açúcares redutores no ELC de cultivos realizados nos novos meios desenvolvidos. Os açúcares totais foram determinados pelo método do fenol-sulfúrico descrito por Dubois e colaboradores (1956). O método consiste na formação do derivado hidroximetil furfural a partir de hexoses, ou furfural a partir de pentoses, pela reação do ácido sulfúrico com os mono e oligossacarídeos, desidratando-os, que então condensam-se com o fenol formando um complexo de coloração amarela. A quantificação de açúcares nos extratos foi feita por espectrofotometria a partir da leitura da absorvância a 490 nm e correlação dos resultados com uma curva padrão de glicose e os resultados foram expressos em g/L.

Para a determinação dos açúcares redutores utilizou-se a metodologia descrita por Miller (1959) com algumas modificações. O método baseia-se na redução do

DNS (ácido 3,5-dinitro salicílico) a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, concomitante com a oxidação do carbono anomérico (grupo aldeído) do açúcar a grupo carboxílico. A solução torna-se alaranjada e a quantificação de açúcares nos extratos foi feita por espectrofotometria a partir da leitura da absorvância a 540 nm e correlação dos resultados com uma curva padrão de glicose. Os resultados foram expressos em g/L.

4.1.7 Análise Morfológica de *A. Brasilense* AbV5 Cultivado nos Meios Dyg's, Form1 e Form15 Através de Microscopia Óptica

Com o objetivo de avaliar variações sobre a morfologia e a presença de grânulos de polihidroxibutirato em *A. brasilense* AbV5 em resposta ao crescimento nos meios de cultivo Dyg's, Form1 e Form15, foram preparados cultivos a partir de pré-inóculo em meio Dyg's obtido como descrito anteriormente, em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de cada um dos meios avaliados. Os cultivos foram realizados sob agitação orbital de 150 rpm a 28 ± 2 °C, sendo realizadas coletas após 12 e 36 horas de cultivo.

Com o auxílio de uma alça de platina flambada ao rubro e resfriada, foram transferidas amostras dos cultivos para o centro de uma lâmina previamente limpa. O material celular foi espalhado até a obtenção de um esfregaço oval e uniforme, e deixado secar espontaneamente ao ar. Adicionou-se uma gota do corante vermelho de safranina sobre o esfregaço, posteriormente cobriu-o com a lamínula e retirou o excesso de corante com papel toalha. As lâminas foram visualizadas em microscópio óptico BIOVAL – AM-423X com objetiva de imersão, sob aumento de 100 vezes e ampliação de 10 vezes. As imagens foram digitalizadas com auxílio de câmera digital DINOEYE.

4.2 PRODUÇÃO DOS VEÍCULOS INOCULANTES SÓLIDOS: BIOCOMPÓSITOS EXPANDIDOS

4.2.1 Teste Preliminar: Viabilidade da Aplicação de Biocompósitos Expandidos para uso como Veículo Inoculante

Com o objetivo de avaliar a viabilidade de uso de biocompósitos expandidos como veículos carreadores de células de *A. brasilense* AbV5 para uso como inoculante, foi realizado um ensaio preliminar de veiculação e sobrevivência microbiana em um compósito expandido com base no amido de mandioca, álcool polivinílico (PVA), argila modificada (Closite Na®) e glicerol. Este biocompósito foi gentilmente cedido pela Profª. Dra. Suzana

Mali de Oliveira, do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina.

Para aumentar a superfície de exposição deste biocompósito às células bacterianas, fracionou-se o material original obtendo-se fragmentos com comprimento aproximado de 1,0 cm e 8 mm diâmetro. O pH dos compósitos foi determinado antes dos ensaios de inoculação adicionando 1,0 g do material pulverizado em 9,0 mL de água destilada e deixado em temperatura ambiente por 1 hora, sendo em seguida submetidas à determinação do pH. Foram preparadas embalagens de celofane com 10 cm x 10 cm de dimensão contendo 5,0 g do biocompósito. As embalagens foram submetidas à esterilização por calor úmido, em autoclave a 121 °C, 1,0 atm por 15 minutos, e secas a temperatura ambiente. Os biocompósitos foram inoculados com uma cultura em Dyg's de *A. brasilense* AbV5 para uma densidade final de 1,0 x 10^9 cél/g biocompósito. As embalagens produzidas foram mantidas em temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

A avaliação da sobrevivência de *A. brasilense* AbV5 veiculada nos compósitos expandidos foi realizada aos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 dias após o preparo das embalagens. Nesse procedimento, determinou-se a concentração de células viáveis por unidade de massa, no inoculante, através de contagens das unidades formadoras de colônias (UFC). Para isso, 1 g do compósito foi macerado em 9,0 mL de solução salina (0,9% m/v) com o auxílio de almofariz e pistilo. Em seguida, realizaram-se diluições seriadas e alíquotas de 0,1 mL das diluições foram semeadas em placas contendo meio Dyg's sólido e incubadas em estufa à 30 ± 2 °C por 24 horas.

4.2.2 Desenvolvimento de Formulações para a Produção de Biocompósitos Expandidos Para Uso Como Veículo Inoculante Para *A. Brasilense* AbV5

4.2.2.1 Materiais

O ensaio preliminar de viabilidade de uso do biocompósito como veículo para uso como inoculante agrícola demonstrou a necessidade de adequações da formulação. Diferentes formulações de biocompósito foram desenvolvidas a partir dos seguintes materiais: amido de mandioca, bagacilho de cana-de-açúcar, fosfato de rocha (pó de basalto), açúcar cristal, leite em pó desnatado, extrato de levedura e solução tampão Fosfato (1,0 M - pH = 7,0). Estes componentes e suas concentrações, bem como o pH final das formulações, foram determinados com base na disponibilidade, capacidade de biodegradação, inocuidade ao

ambiente e potencial de atuarem como protetores para as células de bactérias promotoras do crescimento.

Todos os componentes das formulações de biocompósitos tiveram seus pH medidos. Aproximadamente 1 g de cada material foi submergido em 9 mL de água destilada e mantido em repouso por 1 hora. Após esse período, foram feitas determinações de pH em potenciômetro sob temperatura ambiente. Os ensaios foram realizados em triplicata.

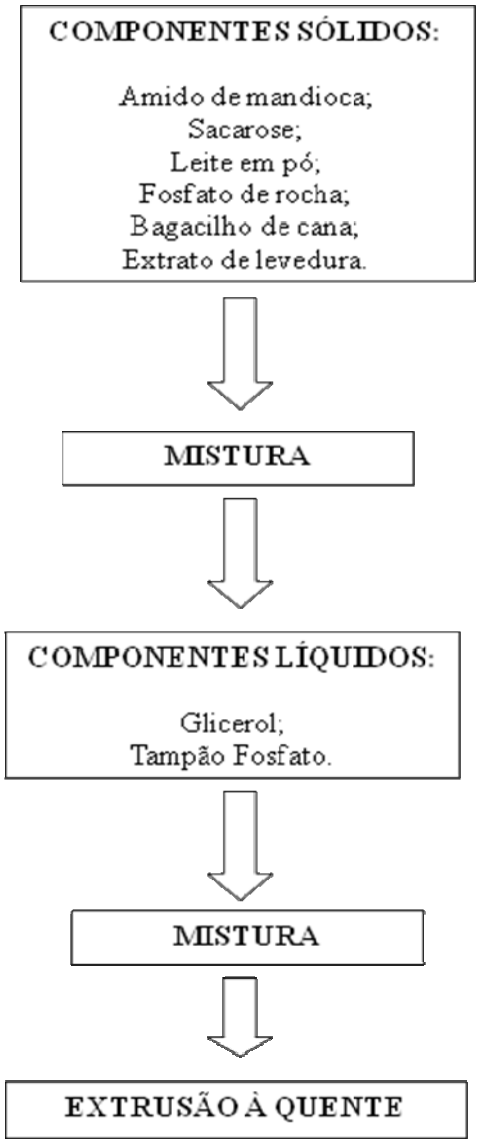
4.2.2.2 Produção dos biocompósitos expandidos

Os biocompósitos expandidos foram obtidos pelo processo de extrusão à quente. Empregou-se uma extrusora monorosca da marca BGM (modelo EL-25, Brasil), com temperatura de 120 °C nas suas quatro zonas; velocidade do parafuso de 70 rpm e matriz cilíndrica de 4,0 mm de diâmetro. O material extrusado foi obtido na forma de "*pellets*" cilíndricos com aproximadamente 0,5 cm de comprimento e diâmetro conforme a Tabela 2. Para o preparo das formulações, primeiro adicionou-se os componentes sólidos, misturando-os manualmente através de movimentos circulares por aproximadamente 10 minutos. O tampão fosfato e o glicerol foram adicionados e misturados até a homogeneização, minutos antes do processo de extrusão. O esquema apresentado na Figura 2 demonstra a produção dos biocompósitos.

Tabela 2 - Diâmetro médio dos biocompósitos expandidos.

Biocompósito	1	2	3	4	5	6
Diâmetro (mm)	5,8	4,1	4,4	4,4	3,8	4,3

Figura 2 - Fluxograma do processo de obtenção dos biocompósitos expandidos por extrusão a quente.



A Tabela 3 apresenta as composições das formulações utilizadas para a produção dos biocompósitos.

Tabela 3 - Variáveis componentes dos biocompósitos extrusados.

Componentes	Formulação de biocompósito					
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
Amido de Mandioca (%)	72,4	58,5	65,0	69,7	56,7	62,8
Açúcar Cristal (%)	1,9	1,5	1,7	1,8	1,5	1,7
Leite em pó (%)	1,0	0,8	0,9	0,9	0,7	0,8
Glicerol (%)	9,5	7,7	8,5	9,2	7,5	8,3
Fosfato de Rocha (%)	4,8	7,7	6,0	4,6	7,5	5,8
Bagacilho de Cana (%)	9,5	23,1	17,1	9,2	22,4	16,5
Extrato de Levedura (%)	1,0	0,8	0,9	4,6	3,7	4,1
Tampão Fosfato (mL)	10,9	11,7	10,1	10,9	11,7	10,1

4.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS BIOCOMPÓSITOS

Os biocompósitos expandidos foram condicionadas sob umidade relativa (UR) de 60 % em estufa contendo solução saturada de brometo de sódio (NaBr) à 25 °C até o momento da caracterização físico-química (ROCKLAND, 1960).

4.3.1 Análise de pH dos Biocompósitos

Aproximadamente 1 g de cada uma das 6 formulações foram pulverizadas e misturadas a 9,0 mL de água destilada e mantidas em repouso por 1 hora. Após esse período, foram feitas determinações de pH em potenciômetro sob temperatura ambiente. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.3.2 Índice de Expansão (IE) dos Biocompósitos

Para o cálculo do índice de expansão (IE) utilizou-se a razão entre o diâmetro do biocompósito (mm) e o diâmetro da matriz da extrusora. O valor considerado foi obtido por meio da media aritmética de 20 determinações para cada tratamento, conforme a metodologia proposta por Gujska e Khan (1991).

4.3.3 Densidade Aparente dos Biocompósitos

Para avaliar a densidade dos biocompósitos, amostras de 0,5 cm de comprimento, foram colocadas em uma proveta de 10 mL até atingir a sua capacidade volumétrica. A proveta foi então pesada em balança analítica. Realizou-se os testes em quintuplicata para as 6 formulações. A densidade foi obtida através da razão da massa pelo volume da proveta, sendo expressa em g/cm^3 (SHOGREN et al., 1998).

4.3.4 Capacidade de Absorção de Água

Para o cálculo da capacidade ou índice de absorção de água utilizou-se o procedimento descrito pela norma ABNT NBR NM ISSO 535 (1999) modificada. Amostras com aproximadamente 2,5 cm de comprimento foram pesadas em balança analítica e submersas em água destilada, sob temperatura ambiente. Posteriormente, o excesso de água

dos corpos de prova foi retirado com o auxílio de papel toalha e novamente pesados para avaliar o aumento da massa. Este ensaio foi realizado para as 6 formulações em diferentes tempos (1, 5, 10, 20, 30 e 60 minutos) e em quintuplicata. A capacidade de absorção de água foi expressa em g água/g biocompósito.

4.4 Ensaio para Esterilização dos Biocompósitos

Foram avaliadas duas estratégias para esterilização dos biocompósitos produzidos: calor úmido e calor seco. A esterilização dos biocompósitos por calor úmido deu-se através do processo de autoclavagem. Embalagens de celofane, com dimensões de 10 cm de comprimento x 7 cm de largura foram seladas contendo 5 g, de cada formulação estudada, foram submetidas a esterilização em autoclave vertical à 121 °C, 1,0 atm por 20 min. Após esse período o material foi retirado da autoclave e mantido em temperatura ambiente.

Para a esterilização dos biocompósitos por calor seco, as embalagens contendo as formulações de biocompósito estudadas foram submetidas a 4 horas de tratamento em estufa sob 4 diferentes temperaturas: 60, 90, 120 e 160 °C. Após esse período as embalagens foram mantidas em temperatura ambiente por 24 horas e posteriormente submetidas a testes de eficiência da esterilização, através de desintegração em solução salina, diluição seriada e plaqueamento das diluições em meio Dyg's.

Os testes foram realizados em triplicata e após a realização das esterilizações os biocompósitos foram submetidos aos testes de caracterização físico-química descritos nos itens 4.3.2, 4.3.3 e 4.3.5.

4.5 Ensaio de Viabilidade e Sobrevivência de *A. brasilense* AbV5 Utilizando Diferentes Formulações de Biocompósitos

A determinação da viabilidade e sobrevivência de *A. brasilense* AbV5 veiculado nas diferentes formulações de biocompósito foi realizada como segue. Foram pesados 5,0 gramas de cada formulação dos biocompósitos, e embaladas em celofane com dimensões de 10,0 cm de comprimento x 7,0 cm de largura que, posteriormente selados com o auxílio de uma seladora térmica. Por fim, as embalagens com os biocompósitos foram esterilizados por calor seco antes da veiculação de *A. brasilense* AbV5.

4.5.1 Preparo dos Biocompósitos Inoculantes contendo *Azospirillum brasilense* AbV5

Um pré-inóculo da estirpe AbV5 de *A. brasilense* foi preparado a partir de crescimento em meio Form15 por 36 horas sob agitação orbital a 150 rpm e temperatura de 30 ± 2 ºC. Esta cultura foi diluída (1:100, v/v) em meio veículo inoculante líquido (descrito na sessão 4.7.2) e alíquotas de 2,0 mL desta diluição foram inoculadas em embalagens de celofane seladas e esterilizadas com o auxílio de seringas descartáveis estéreis, vedando os orifícios com fita adesiva e homogeneizando-se manualmente a suspensão de células sobre os biocompósitos. Após o preparo dos inoculantes, as embalagens foram mantidas sob temperatura ambiente ao abrigo da luz.

4.5.2 Avaliação da Sobrevivência de *Azospirillum brasilense* AbV5 nos Biocompósitos Inoculantes

A sobrevivência das células veículadas aos biocompósitos expandidos foi determinada aos 5, 10, 20, 40, 60 e 90 dias após o preparo dos inoculantes. Nesse procedimento, o número de células viáveis por unidade de massa no inoculante foi determinado através do método do número mais provável (NMP). Para isso, 5 g biocompósito foram adicionadas de 45 mL de solução salina (0,9% m/v) em frascos Erlenmeyer de 125 mL e mantidas sob agitação orbital a 200 rpm por 4 horas. A suspensão obtida foi seriadamente diluída em solução salina e 0,5 mL das diluições (10^{-1} a 10^{-7}) foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 4,5 mL de meio Dyg's líquido. Os tubos foram incubados em estufa à 30 ± 2 °C por 24 horas. Após a incubação foram realizadas as contagens segundo o método do NMP com o auxílio da Tabela de McCrady para 4 repetições.

4.6 Microscopia Eletrônica de Varredura dos Inoculantes Sólidos

As eletromicrografias dos biocompósitos foram obtidas no Laboratório de Microscopia da UEL, através de um microscópio eletrônico de varredura FEI Quanta 200 (Oregon – EUA). As amostras dos biocompósitos coletadas após 10 dias de inoculação foram cortadas longitudinalmente com o auxílio de pinças e lâmina de aço em condições assépticas. As amostras foram fixadas por imersão em solução de glutaraldeído 3 % em tampão fosfato 0,1 M por 24 horas. Após a fixação, as amostras foram lavadas com tampão fosfato 0,1 M e impregnadas com tetróxido de ósmio 1%. Em seguida as amostras foram desidratadas através

de imersão sequencial em soluções de etanol:água com concentração decrescente de água por 10 min, posteriormente substituído por gás carbônico liquefeito na câmara do aparelho de ponto crítico para obter a secagem completa das amostras. Após secagem ao ponto crítico, seguiu-se com a metalização através do recobrimento com uma fina camada de ouro e as imagens foram realizadas empregando-se uma voltagem de 20 kV.

4.7 DESENVOLVIMENTO DE VEÍCULO INOCULANTE LÍQUIDO

4.7.1 Materiais

Para a produção dos veículos líquidos utilizou-se glicerol, goma xantana, extrato de levedura, polivinilpirrolidona (PVP), EDTA férrico, sulfato de magnésio heptaidratado, nitrato de amônio, cloreto de sódio, solução de micronutrientes, mono e diidrogenofosfato de potássio. Estes componentes e suas concentrações, bem como o pH final das formulações, foram determinados com base em informações da literatura, disponibilidade, capacidade de biodegradação, inocuidade ao ambiente e potencial de atuarem como protetores para as células de bactérias promotoras do crescimento.

4.7.2 Produção do Veículo líquido

A Tabela 4 apresenta a composição final do veículo inoculante líquido. Os componentes do veículo líquido foram dissolvidos em água destilada sob agitação contínua e aquecimento a 70 ºC em uma placa aquecedora com agitação magnética. A agitação foi mantida por 30 minutos até obter-se completa homogeneização da mistura, sendo em seguida transferida para agitação vigorosa em liquidificador industrial por 2 minutos. Após o resfriamento à temperatura ambiente, ajustou-se o pH da formulação para 6,5 ± 0,1 com a adição de volumes variáveis de NaOH 0,1 N, dependendo do pH da formulação. Em seguida, alíquotas de 36 mL desta mistura foram vertidas em frascos de polipropileno com tampa e capacidade total de 50 mL, os quais foram fechados e esterilizados em autoclave durante 15 minutos, à temperatura de 121º C e pressão de 1atm.

Tabela 4 - Composição do veículo inoculante líquido

Componentes	Quantidade por Litro de inoculante
Glicerol	200 mL
Goma Xantana	1,0 g
Extrato de Levedura	1,0 g
Polivinilpirrolidona (PVP)	10 g
FeEDTA	2,0 mL
Sulfato de Magnésio Heptaidratado ($MgSO_4 . 7H_2O$)	1,0 g
Cloreto de Sódio (NaCl)	0,1 g
Diidrogenofosfato de Potássio (KH_2PO_4)	4,0 g
Monoidrogenofosfato de Potássio (K_2HPO_4)	6,0 g
Nitrato de Amônio (NH_4NO_3)	1,6 g
Solução de Micronutrientes	20 mL

4.7.3 Veiculação das Células de *A. Brasilense* AbV5 ao Inoculante Líquido

Culturas de *A. brasilense* AbV5 crescidas nos meios Form1 e Dyg's após 12 horas de cultivo e Form15 após 12 e 36 horas de cultivo, foram transferidos para os frascos de polipropileno com o veículo líquido, buscando-se uma densidade inicial de células de 1,0 x 10^9 cél/mL. Os frascos contendo os inoculantes foram armazenados em temperatura ambiente e sob o abrigo da luz.

4.7.4 Avaliação da Sobrevivência de *Azospirillum Brasilense* AbV5 no Inoculante Líquido

A avaliação da sobrevivência das células de *Azospirillum brasilense* AbV5 no veículo líquido foi realizada aos 5, 10, 20, 40, 60, 90 e 120 dias, após o preparo dos inoculantes. Nesse procedimento, mediu-se a concentração de células viáveis (Unidades Formadoras de Colônia – UFC) por mililitro de inoculante em placas contendo o meio Dyg's sólido, segundo o método de Miles e Misra (1938). As amostras foram diluídas seriadamente e gotas de 0,002 mL das diluições (10^{-1} a 10^{-7}) foram semeadas em meio Dyg's sólido. Após incubação em estufa a 30 ± 2 ºC por 18 horas, obteve-se a média da contagem de 10 gotas para cada ponto obtido, exprimindo-se os resultados em UFC/mL de inoculante.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram submetidos à análise da variância (ANOVA) e teste de Tukey de comparação de médias ($p \leq 0,05$) empregando-se o software Statistica 7.0 (Statsoft, Oklahoma, USA).

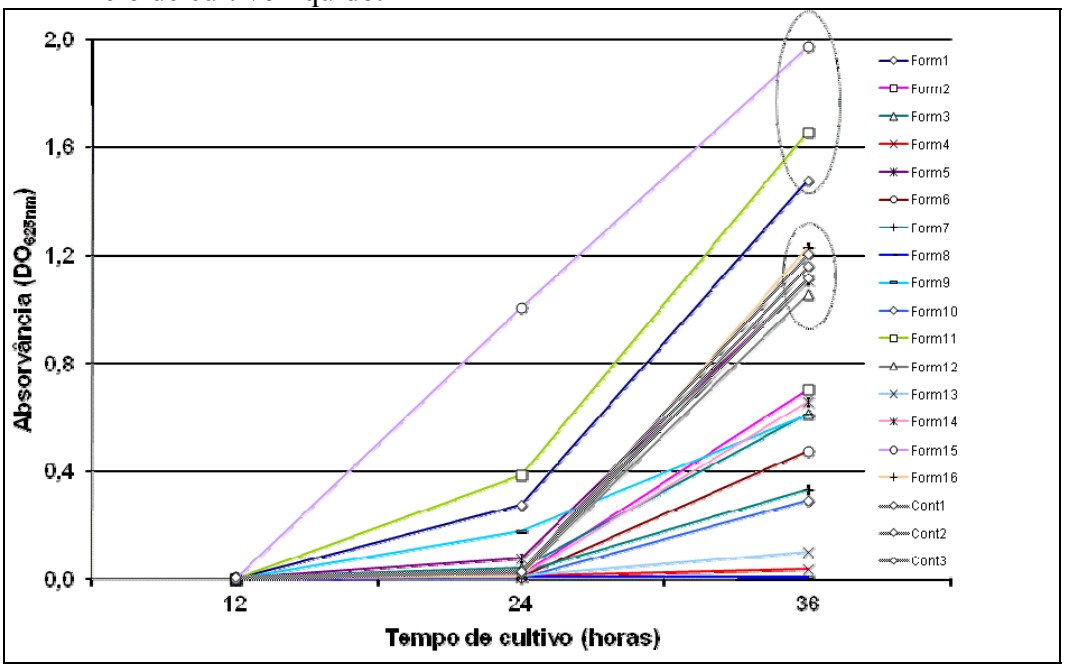
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PRODUÇÃO DE BIOMASSA

O delineamento experimental 2^4 com 3 pontos centrais foi usado para identificar os fatores que teriam efeito significativo sobre o crescimento celular de *A. brasilense* AbV5. Foram avaliadas as seguintes variáveis: concentração de glicerol (x_1), concentração de sacarose (x_2), concentração de extrato de levedura (x_3) e concentração de monoidrogenofosfato de Potássio (x_4), todas sob 2 níveis: (+) alto e (-) baixo. A ferramenta de planejamento experimental e análise de superfície de resposta possibilitou a investigação da influência das variáveis estudadas sobre a produção de biomassa de *A. brasilense* AbV5, bem como determinar o tipo de interação entre estas variáveis cultivo.

Os resultados experimentais obtidos no estudo de cinética de produção de biomassa por *A. brasilense* AbV5 nos diferentes meios de cultivo avaliados, conforme retratado na Figura 3, sugerem que o tempo de cultivo de 36 horas não foi suficiente para que o microrganismo alcançasse a fase estacionária de crescimento em nenhuma das formulações estudadas. Os maiores valores de absorvância ($O.D._{625nm}$) foram observados para o tempo de cultivo de 36 horas, sendo escolhido este tempo de cultivo para realização da análise de variância.

Figura 3 - Cinética de crescimento de *A. brasilense* AbV5 em diferentes formulações de meio de cultivo líquido.



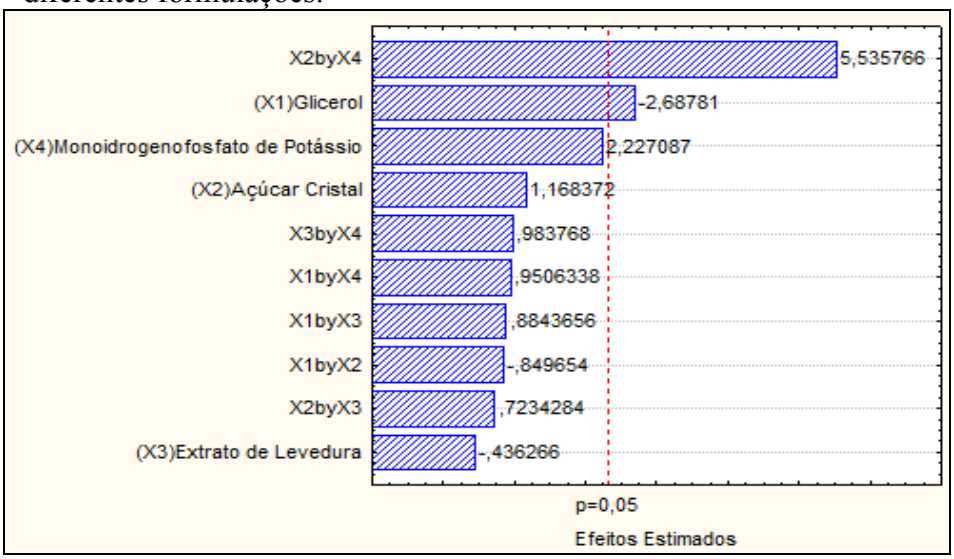
A análise de variância dos resultados obtidos no estudo do crescimento de *A. brasilense* AbV5 sob diferentes formulações de meio de cultivo (Tabela 5) apresentou um bom ajuste para o modelo fatorial (R^2 = 0,847), sendo que a concentração de glicerol e a interação sacarose x K_2HPO_4 foram os principais fatores de influência sobre a produção de biomassa. A análise dos efeitos dos tratamentos estudados através do gráfico de Pareto (Figura 4), apresenta ainda o efeito da concentração de K_2HPO_4 com forte tendência a influenciar o crescimento da estirpe AbV5 (p = 0,066), o que explica parte do efeito observado para a interação sacarose x K_2HPO_4.

Tabela 5 - Análise de variância para a produção de biomassa por *A. brasilense* AbV5 em resposta à variação na concentração de componentes da formulação do meio de cultivo após 36 horas de crescimento.

Variávies	SQ[1]	GL[2]	MQ[3]	F[4]	Efeitos	Coeficientes	p-valor
Glicerol (x_1)	0,726	1	0,726	6,619	-0,425875	-0,212938	0,032983*
Sacarose (x_2)	0,137	1	0,137	1,251	0,185125	0,092562	0,295859
Extrato de levedura (x_3)	0,019	1	0,019	0,174	-0,069125	-0,034563	0,687222
K_2HPO_4 (x_4)	0,498	1	0,498	4,545	0,352875	0,176438	0,065609
$x_1 \cdot x_2$	0,073	1	0,073	0,662	-0,134625	-0,67312	0,439578
$x_1 \cdot x_3$	0,079	1	0,079	0,717	0,140125	0,070063	0,421857
$x_1 \cdot x_4$	0,091	1	0,091	0,828	0,150625	0,075313	0,389436
$x_2 \cdot x_3$	0,053	1	0,053	0,480	0,114625	0,057312	0,508237
$x_2 \cdot x_4$	3,077	1	3,077	28,079	0,877125	0,438562	0,000729*
$x_3 \cdot x_4$	0,097	1	0,097	0,887	0,155875	0,082765	0,373920
Erro	0,877	8	0,110				
Falta de ajuste (lack of fit)	0,440	6	0,073	0,336			0,873622
Erro puro	0,437	2	0,218				
Total	5,726	8					

x_1 = glicerol; x_2 = sacarose; x_3 = extrato de levedura; x_4 = monoidrogenofosfato de Potássio;
[1]SQ = soma quadrática; [2]GL = graus de liberdade; [3]MQ = média quadrática; [4]F = distribuição F de Snedecor; R^2 = 0,847; *Significativo com nível de significância de 95% (p < 0,05) pelo teste de Tukey.

Figura 4 - Diagrama de Pareto para a produção de biomassa de *Azospirillum brasilense* AbV5 de acordo com os valores de $O.D._{625nm}$ obtidos após 36 horas de cultivo em diferentes formulações.



As Figuras 5, 6, 7 e 8 apresentam algumas interações entre as variáveis estudadas sobre a produção de biomassa de *A. brasilense* AbV5 em gráficos de superfície de resposta. Pode-se visualizar a influência negativa do aumento da concentração do glicerol no meio de cultivo sobre a produção de biomassa para quaisquer das interações possíveis entre as variáveis testadas (Figuras 5, 6 e 7). Os melhores resultados para aumento de biomassa celular ($O.D._{625nm}$) são obtidos quando são utilizadas baixas concentrações de glicerol no meio de cultivo. Sabe-se que o glicerol é uma das fontes de carbono utilizadas por *Azospirillum brasilense* para seu metabolismo energético, conforme citado por Tarrant et al (1978). É catabolizado, neste caso, com o auxílio das enzimas glicerol quinase e glicerol-3-fosfato desidrogenase, responsáveis pela fosforilação e subsequente desidrogenação, originando assim o gliceraldeído-3-fosfato que é degradado facilmente através da segunda etapa da via glicolítica e subseqüente oxidação pelo ciclo de Krebs (MATHEWS, et al., 2002; WESTBY et al., 1983).

Sobre a influência da concentração de glicerol no cultivo de *Azospirillum*, na literatura, encontram-se estudos como o de Westby et al. (1983) , onde utilizaram uma concentração de 5 g/L de glicerol em meios de cultivo para *A. brasilense*, onde avaliaram um bom crescimento, e de Hartmann e Zimmer, (1994) e Bashan et al., (2011), onde a substituição de glicose por glicerol em meio TYG, aumentou o desempenho do meio em termos de crescimento celular, já que as taxas de crescimento foram aumentadas. Trabalhos com espécies de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, na produção de inoculantes, como os

realizados por pesquisadores do IPT (1985) e Balatti (1992) relatam a inibição do crescimento microbiano em concentrações de glicerol maiores que 12 g/L. Neste caso, a conversão de substrato em biomassa está em torno de 0,4 a 0,6 g de células/g do substrato. Os autores sugerem que para alcançar concentrações celulares maiores deve-se utilizar na fermentação o processo descontínuo alimentado, com adição parcelada dos substratos.

Apesar de vários trabalhos na literatura apresentar *Azospirillum brasilense* com incapaz de metabolizar a sacarose no experimento esta variável apresentou-se como uma das responsáveis pelo estímulo ao crescimento microbiano Os resultados obtidos pelo estudo da cinética de crescimento nas diferentes formulações de meio de cultivo apresentam sacarose (açúcar cristal) como altamente significativa quando interage com KH_2PO_4, como pode ser observado nos gráficos das superfícies de resposta (Figura 8). Com o objetivo de certificar os resultados, foi realizada a determinação de açúcares totais e redutores em meio Dyg's e nas Form1 e Form15 (Tabela 6):

Tabela 6 - Determinação de açúcares totais e redutores por *A. brasilense* AbV5 em diferentes formulações de meios de cultivo.

Tempo de cultivo (horas)	Açúcares Totais (g/L)			Açúcares Redutores (g/L)			Consumo de sacarose (g/L)		
	Meio Dyg's	Form 1*	Form 15*	Meio Dyg's	Form 1*	Form 15*	Meio Dyg's	Form 1*	Form 15*
0	2	10,1	50,28	2	0	0	0	0	0
6	0,0041	9,12	48,22	0,0039	0,0005	0,0013	1,996	0,876	2,059
12	0	7,31	44,17	0	0,0004	0,001	0	2,789	6,109
24	0	6,15	43,96	0	0	0,0017	0	3,948	6,318
36	0	6,021	43,72	0	0	0	0	0	0

*Form 1 corresponde a formulação de meio 1 do planejamento fatorial;
*Form 15 corresponde a formulação de meio 15 do planejamento fatorial.

A habilidade para utilizar sacarose já foi reportada nas espécies *A. amazonense, A. lipoferum* e até em algumas estirpes de *A. brasilense* através de experimentos utilizando ^{14}C como um traçador capaz de avaliar a absorção deste dissacarídeo (TARRANT et al., 1979). Em *A. amazonense*, o crescimento em sacarose, deu-se através do metabolismo de D-glicose e D-frutose, monossacarídeos oriundos da ação hidrolítica da invertase (β-frutofuranosidase) nas ligações α,β (1➔2) (MARTINEZ-DRETS et al., 1985). Nas formulações de meio Dyg's, 1 e 15, pode-se notar o consumo de açúcares redutores por *A. brasilense* AbV5 através da diferença entre o teor de açúcares totais e redutores residuais.

A influência do extrato de levedura não foi significativa. Rissi (2006), em experimentos para o crescimento de cepas de *Azospirillum brasilense* e *Azospirillum lipoferum* em meios de cultivo líquidos, constatou que o extrato de levedura adicionado

propiciou o crescimento apenas de *A. lipoferum* BR17, e que para o processo de produção de *A. brasilense* deve-se utilizar sais de amônio como fonte de nitrogênio, uma vez que esse nutriente conduziu aos maiores fatores de conversão e velocidades específicas de crescimento.

O potássio, encontrado no monoidrogenofosfato, é necessário devido a grande diversidade de enzimas que o requerem especificamente como cofator, como por exemplo, algumas envolvidas na síntese de proteínas. Já o fosfato é fonte de Fósforo para a síntese de ácidos nucléicos, fosfolipídeos de membranas, compostos ricos em energia e, além disso, o íon HPO_4^{2-} atua no tamponamento do meio (MADIGAN et al. 2010; PELCZAR, 1978). A análise do gráfico de superfície de resposta no experimento (Figuras 5 e 8) revela que para a obtenção de maiores valores de concentração de biomassa as concentrações de fosfato devem aumentadas nas formulações de meio de cultivo, o que é comprovado pela ANOVA, que indica um efeito positivo, quase significativo.

Figura 5 - Gráfico de superfície de resposta para a produção de biomassa por *A. brasilense* AbV5 determinada através da absorvância ($D.O._{625nm}$) em resposta à interação entre monoidrogenofosfato de potássio e glicerol.

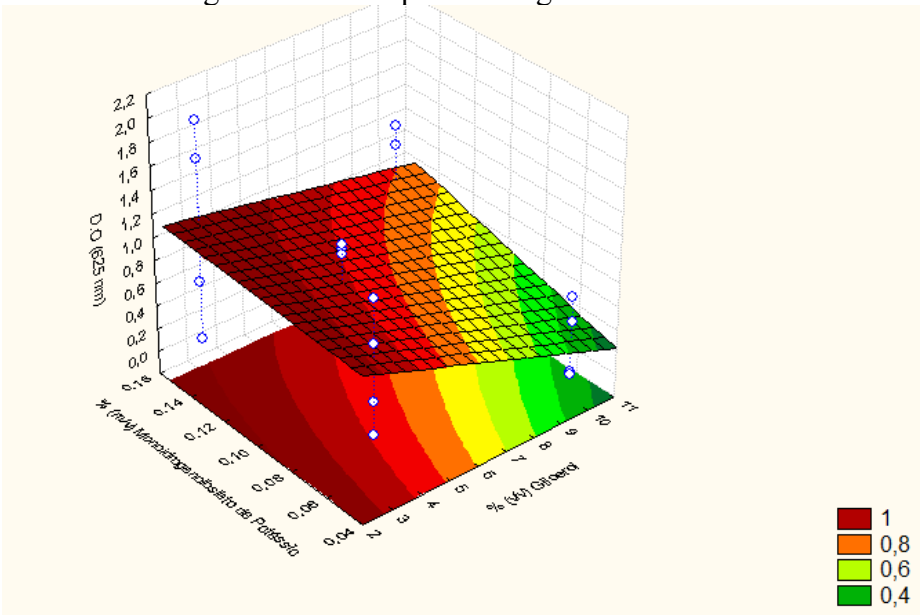


Figura 6 - Gráfico de superfície de resposta para a produção de biomassa por *A. brasilense* AbV5 determinada através da absorvância ($D.O._{625nm}$) em resposta à interação entre extrato de levedura e glicerol.

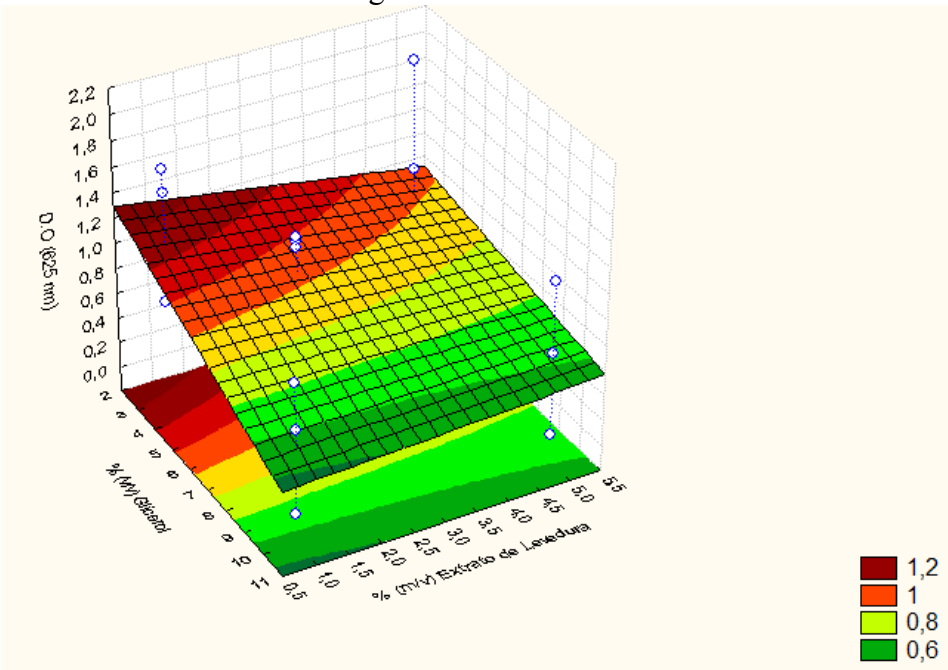


Figura 7 - Gráfico de superfície de resposta para a produção de biomassa por *A. brasilense* AbV5 determinada através da absorvância ($D.O._{625nm}$) em resposta à interação entre açúcar cristal e glicerol.

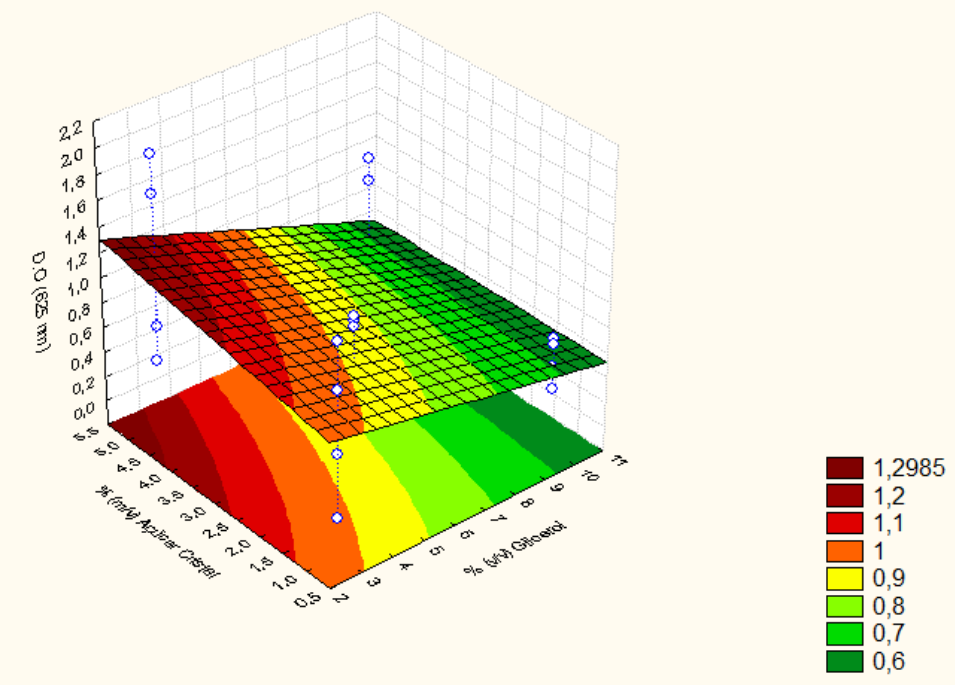
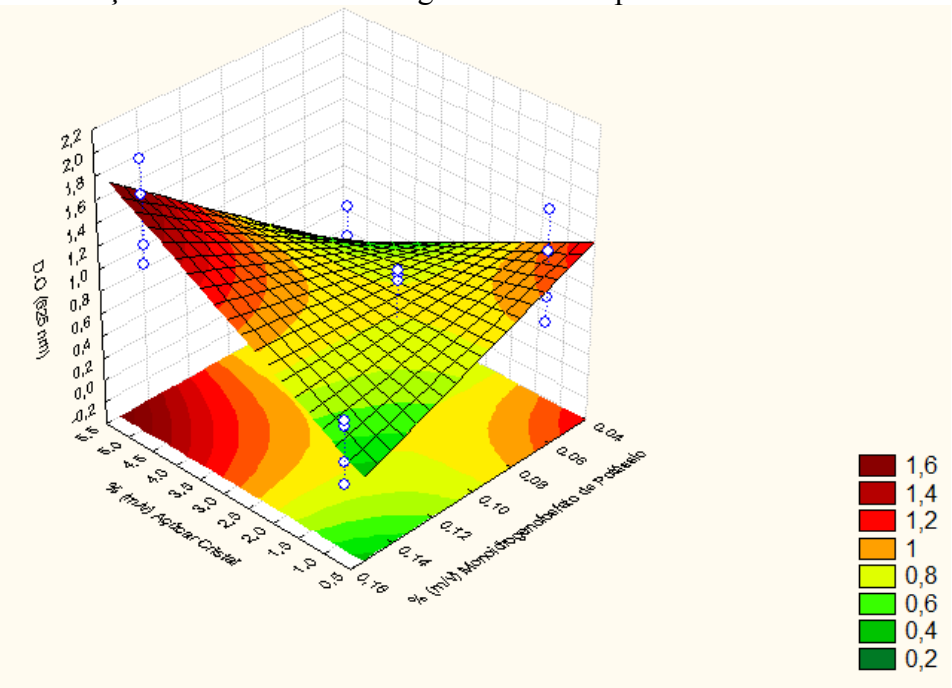
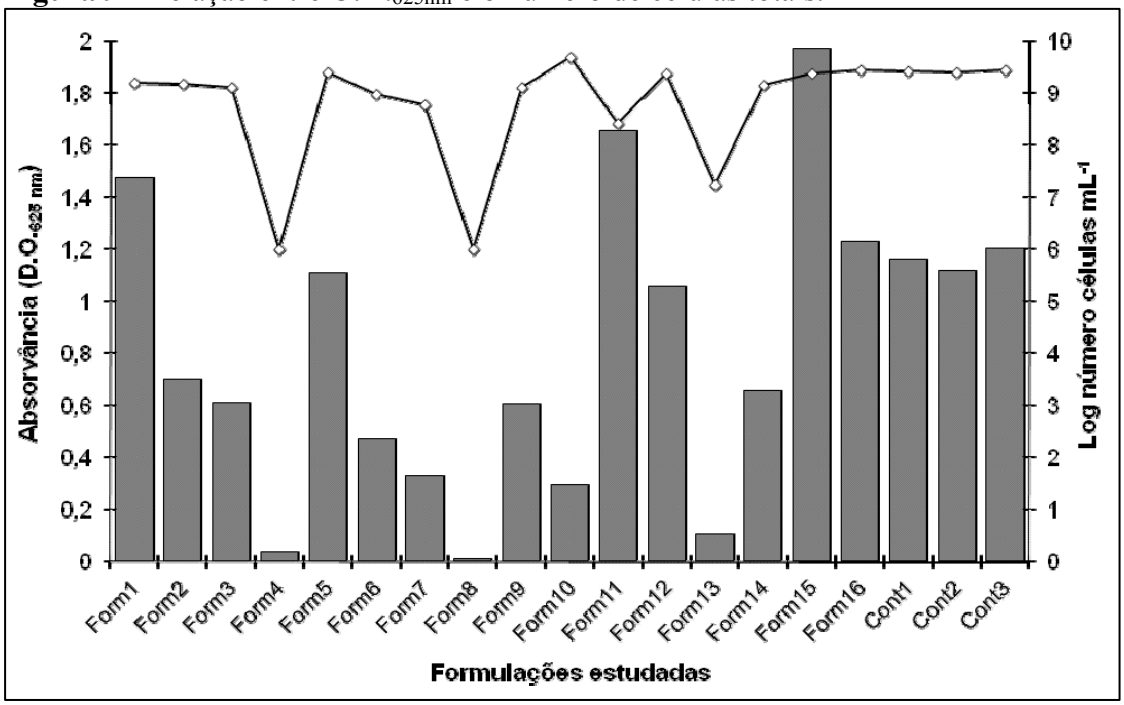


Figura 8 - Gráfico de superfície de resposta para a produção de biomassa por *A. brasilense* AbV5 determinada através da absorvância ($D.O._{625nm}$) em resposta à interação entre açúcar cristal e monoidrogenofosfato de potássio.



A análise conjunta da $D.O._{625nm}$ e do número de células totais após 36 horas de cultivo está apresentada na Figura 9. É possível observar a obtenção de elevadas densidades de cultivo em quase todas as formulações. Da mesma forma, os meios controle apresentaram uma densidade de células de 2,66 x 10^9 células/mL em média, equivalente aos valores encontrados para as formulações 1 (2,20 x 10^9 células/mL) e 15 (2,35 x 10^9 células/mL). Desta forma, os maiores valores de absorvância observados nestas formulações, em comparação à formulação controle, podem ter ocorrido pela elevada presença de exopolissacarídeos (EPS).

Figura 9 - Relação entre O.D.$_{625nm}$ e o número de células totais.



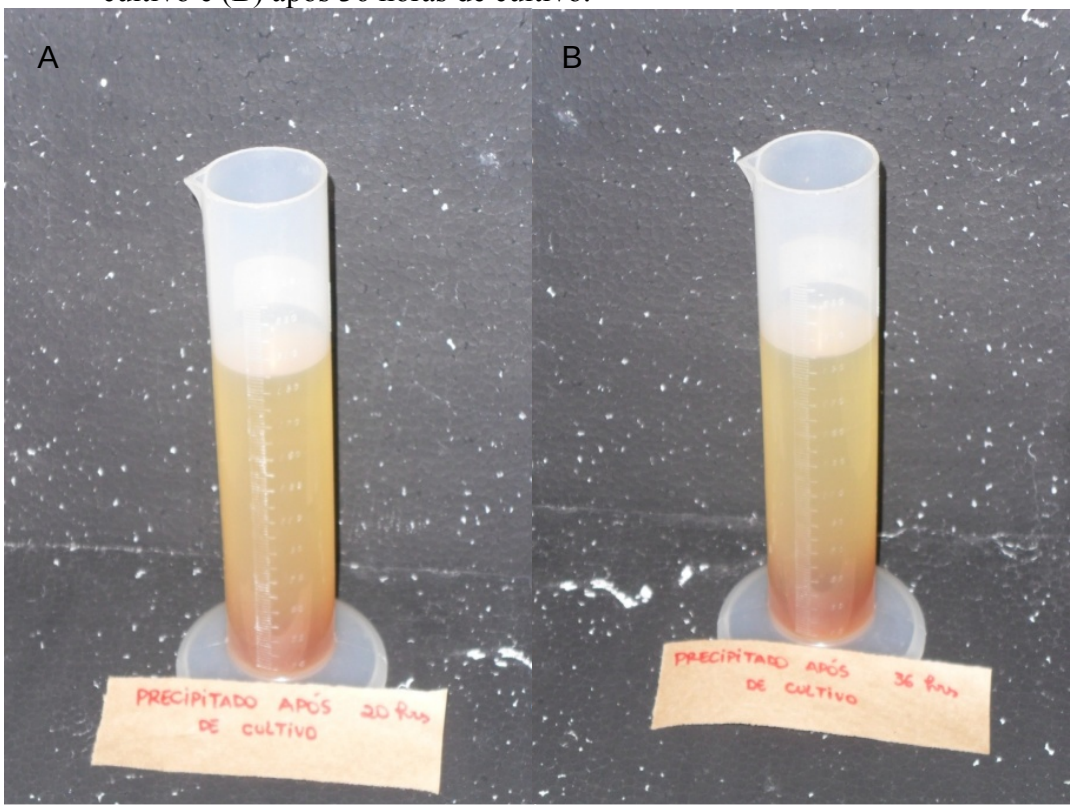
Conforme a Tabela 7, pode-se observar que as variações de pH, na maioria dos cultivos, permaneceram quase constantes. Segundo relatos de Goebel e Krieg, (1984), os principais subprodutos do metabolismo de *Azospirillum* são alguns ácidos orgânicos, principalmente acético, lático, glioxálico, málico, 2-oxoglutárico e β-hidroxibutírico formados em quantidades reduzidas, ocasionando um pequeno decréscimo do pH sem induzir a inibição do crescimento bacteriano. Além disso, existem relatos na literatura sugerindo que a adição de glicerol ao meio de cultivo com *Azospirillum brasilense* evita a diminuição do pH decorrente da produção destes ácidos (CHRISTIANSEN-WENIGER e VAN VEEN, 1991).

Tabela 7 - Variação do pH após 36 horas de cultivo

Formulação	pH inicial (0 horas)	pH final (36 horas)
1	6,81	6,87
2	6,61	6,04
3	6,59	6,85
4	6,48	6,47
5	6,64	6,77
6	6,62	6,67
7	6,7	6,7
8	6,59	6,62
9	6,59	7,34
10	6,61	6,49
11	6,59	5,92
12	6,6	5,45
13	6,61	6,62
14	6,69	6,4
15	6,6	5,39
16	6,74	5,83
17	6,65	6,52
18	6,69	6,29
19	6,59	5,98

A partir dos dados de produção de biomassa e exopolissacarídeos (EPS), foram selecionadas 2 formulações que apresentaram maiores contrastes nesse último quesito, para estudar a influência deste fator no desenvolvimento de formulações inoculantes. A formulação 1 apresentou elevada densidade celular, porém, notou-se uma menor concentração de EPS (1,06 g/L) no meio de cultivo. Por outro lado, a formulação 15, apresentou um elevado número de células e uma maior concentração de EPS entre as formulações estudadas, pois após 24 horas de cultivo a concentração de EPS era de 1,82 g/L, após 36 horas era de 2,85 g/L. Desta forma, as formulações 1 e 15 foram selecionadas para prosseguir com o desenvolvimento das formulações inoculantes.

Figura 10 - Exopolissacarídeos precipitados na formulação de meio 15: (A) após 20 horas de cultivo e (B) após 36 horas de cultivo.



1,82 g/L de EPS **2,85 g/L de EPS**

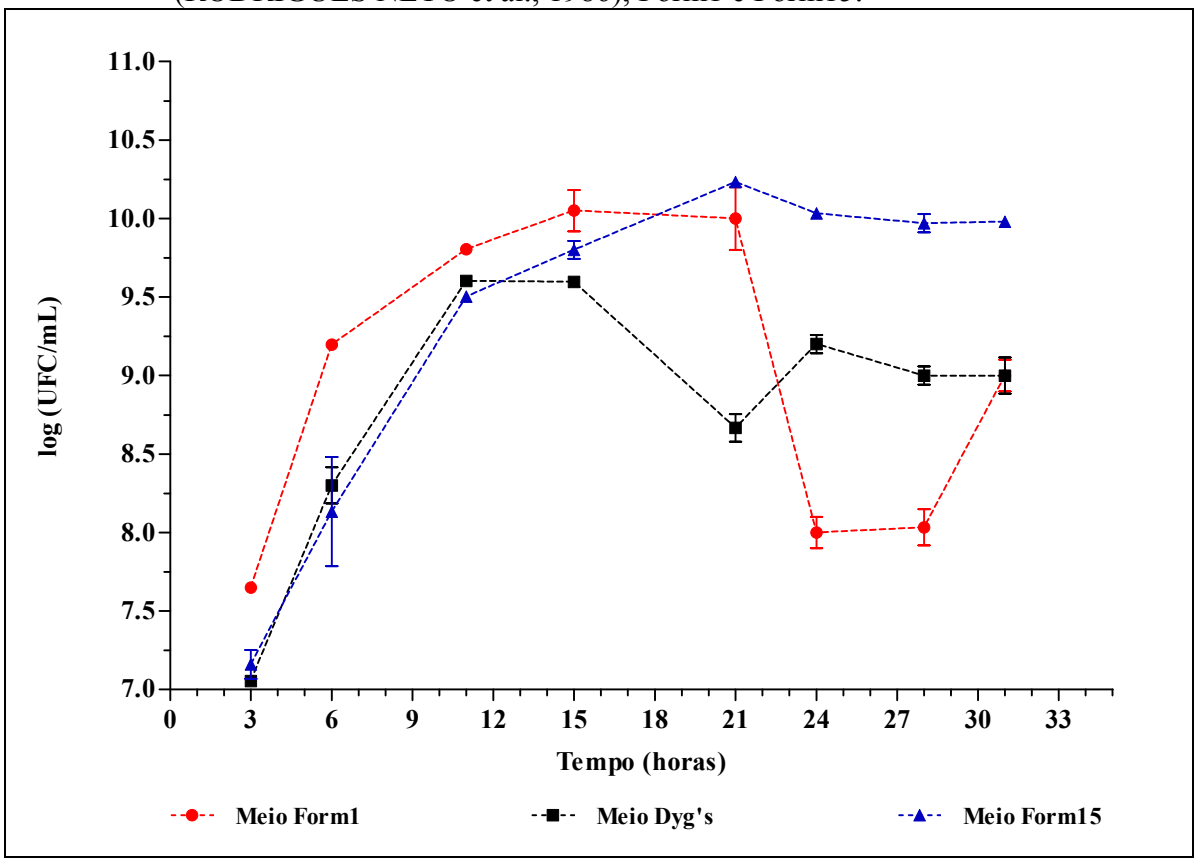
Os EPS produzidos por diazotróficos são moléculas envolvidas na interação célula-célula, que promovem a adesão das bactérias à superfície da planta. Estão envolvidos também no reconhecimento e na determinação da competência da associação planta-bactéria, além de ser uma estratégia metabólica desses microorganismos para crescimento e desenvolvimento em condições desfavoráveis, auxiliando na proteção microbiana contra tensões de habitats extremos e/ou outras condições prejudiciais (RAMEY et al., 2004; DANHORN e FUQUA, 2007; NETO e PINOTTI, 2004). Sendo assim, para a prática de inoculação a utilização de culturas de *Azospirillum* onde há maior produção de EPS é essencial já que a presença destas biomoléculas promove a sobrevivência deste no solo e uma maior fixação às raízes vegetais (EGORENKOVA et al., 2001).

5.1.1 Cinética do Crescimento e Análise Morfológica de *A. brasilense* AbV5 nas Diferentes Formulações de Meios de Cultivo

Os resultados do estudo de cinética do crescimento de *Azospirillum brasilense* AbV5 foi realizado nos meios Form1, Form15 e Dyg's são apresentados na Figura 11.

Neste ensaio pode-se observar que a fase de crescimento logarítmico teve início praticamente imediato para os 3 meios testados. Notou-se ainda que a fase de crescimento logarítmico foi mais curta nos meios de cultivo Dyg's e Form1 (aproximadamente 11 horas de fase *log*), em comparação ao crescimento no meio de cultivo Form15 (com duração aproximada de 20 horas de fase *log*). Além disso, o maior valor para densidade de células viáveis por unidade de volume de meio de cultivo ocorreu na formulação Form15, 21 horas após o início do período de crescimento, chegando a $1,7 \times 10^{10}$ células/mL. Este resultado pode ter sido consequência da maior disponibilidade de carbono e nitrogênio na Form15, que continha maiores concentrações de sacarose e extrato de levedura do que a Form1, por exemplo, consequentemente suportando o crescimento celular por um período maior de tempo. A fase exponencial de crescimento ou fase log é a mais importante para a produção de biomassa, já que nela ocorre um aumento exponencial do número de células, e o cultivo atinge a sua velocidade máxima de crescimento (BASTOS, 2010). Outro fato interessante observado foi a manutenção do número de células viáveis no meio de cultivo Form15 após 20 horas de cultivo, tempo em que o cultivo atingiu a fase de crescimento estacionário. Esta manutenção da densidade do cultivo sugere que não houveram condições deletérias para os microrganismos cultivados nesta formulação, como o esgotamento de nutrientes.

Figura 11 - Cinética de crescimento de *Azospirillum brasilense* AbV5 nos meios Dyg's (RODRIGUES NETO et al., 1986), Form1 e Form15.



*Média de 3 repetições.

A realização do estudo de cinética de crescimento de *A. brasilense* AbV5 permitiu a determinação da taxa de crescimento específico ($\mu_{máx}$) para os 3 meios de cultivo estudados. Para isso foram traçadas curvas transformadas dos valores de UFC por unidade de volume de meio de cultivo [ln(UFC/mL)] em função do tempo (em horas). Após traçadas as curvas, notou-se que os pontos estabeleciam uma relação linear e com isso foi possível obter os coeficientes da reta através de uma regressão,como pode ser observado nas Figuras 12, 13 e 14.

Figura 12 -Linearização da fase exponencial de crescimento de *A. brasilense* AbV5 em meio Dyg's (RODRIGUES NETOS et al., 1986).

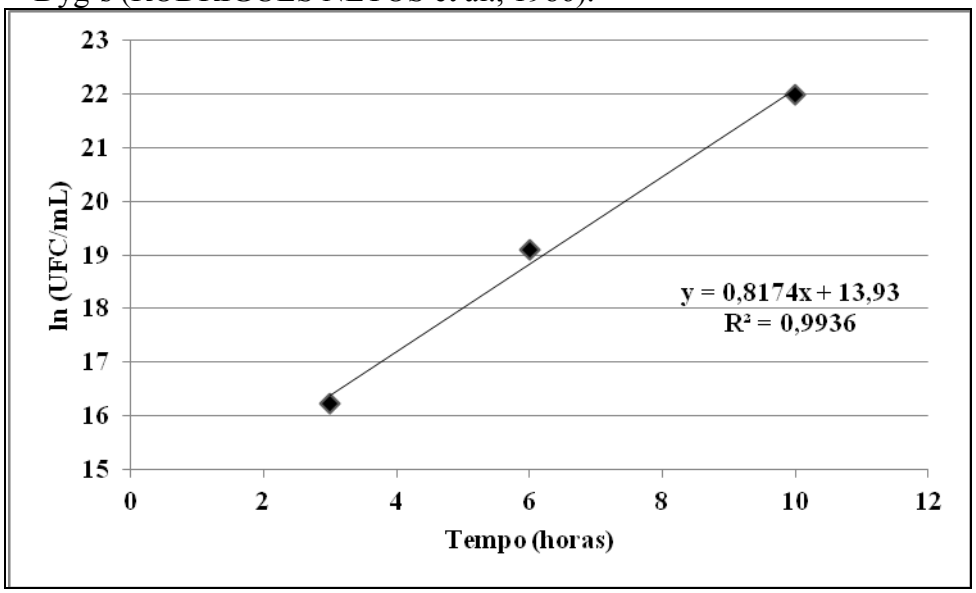


Figura 13 -Linearização da fase exponencial de crescimento de *A. brasilense* AbV5 no meio Form1.

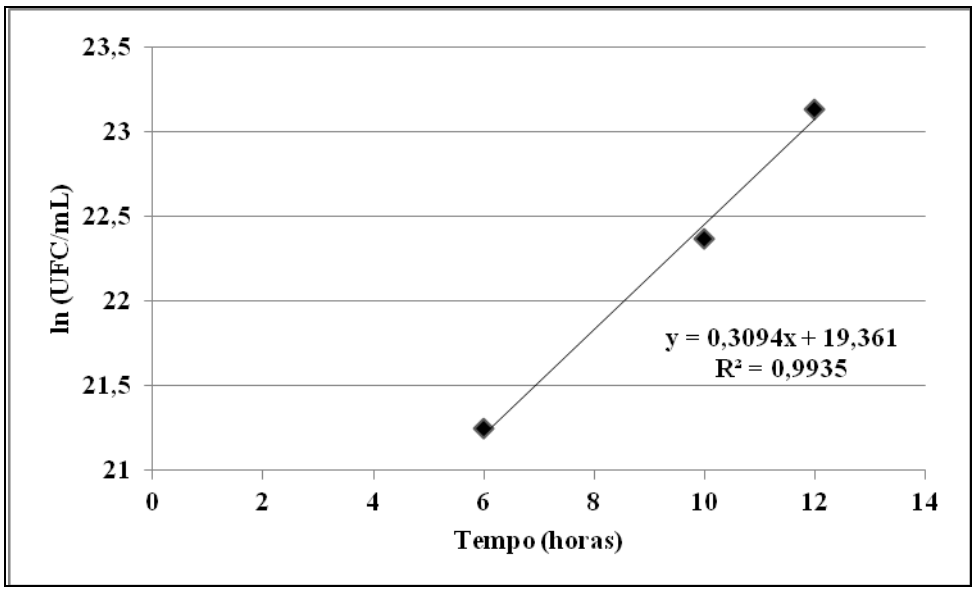
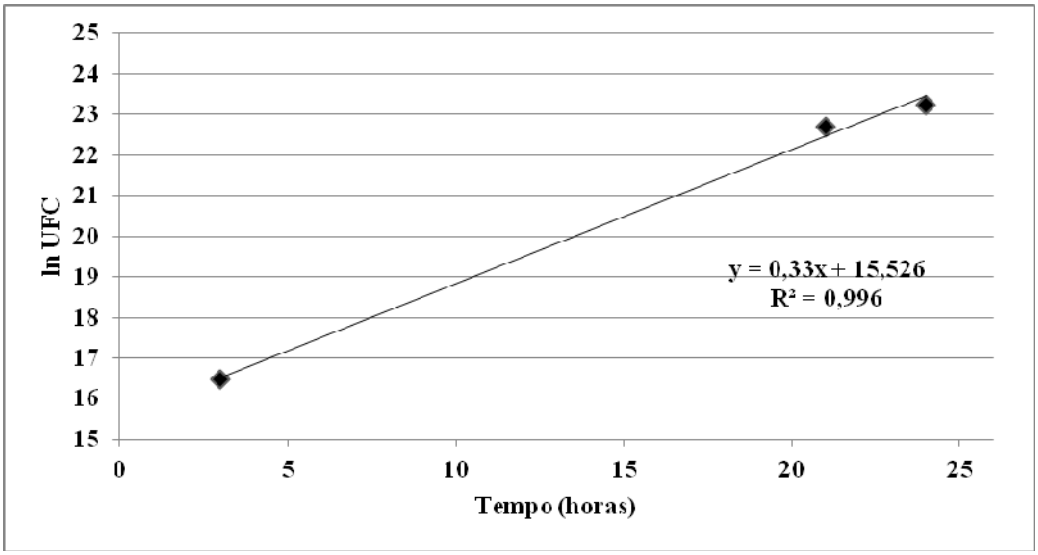


Figura 14 - Linearização da fase exponencial de crescimento de *A. brasilense* AbV5 no meio Form15.



Após a linearização da fase exponencial de crescimento nos meios de cultivo estudados, bem como a obtenção das respectivas equações das retas, foi possível determinar os seguintes parâmetros cinéticos: velocidade específica de crescimento ($\mu_{máx}$) e tempo de geração ou duplicação (G) (Tabela 8). A taxa específica de crescimento está relacionada com o número de gerações (ou o tempo de cada geração) que ocorrem por unidade de tempo numa cultura em crescimento exponencial. De fato, quanto maior for a taxa específica de crescimento, mais rapidamente aumenta a população, maior é o número de gerações que ocorrem em determinado período de tempo e menor é o tempo de cada geração (G).

Tabela 8 - Parâmetros cinéticos de crescimento de *A. brasilense* AbV5 nos meios testados.

Parâmetro	**Formulações**		
	Meio Dyg's	**Form1**	**Form15**
Velocidade Específica de crescimento ($\mu_{máx}$)	0,817 h^{-1}	0,309 h^{-1}	0,330 h^{-1}
Tempo de geração (G)	0,848 h	2,243 h	2,100 h
UFC máxima (T)*	3,555 x 10^9 (11 horas)	1,667 x 10^{10} (10 horas)	1,220 x 10^{10} (24 horas)

*UFC máxima (T): tempo de cultivo em horas onde observou-se o valor máximo para UFC.

Os resultados da Tabela 8 mostram que a taxa de crescimento de *A. brasilense* AbV5 nas formulações dos meios Form1 e Form15 foi aproximadamente 2,5 vezes menores do que no meio Dyg's. Isto se deve, possivelmente, à composição dos meios 1 e 15, onde encontramos a sacarose como fonte de carbono, enquanto o meio Dyg's apresenta

glicose como fonte de carbono. O uso de sacarose para o crescimento de *A. brasilense* vem sendo descrito como inadequado, resultando em baixas taxas de crescimento e densidade de cultivo. Os resultados obtidos entretanto sugerem que *A. brasilense* AbV5 esteja utilizando a sacarose como fonte de carbono para a produção de biomassa celular e energia, uma vez que os cultivos realizados nestes meios apresentaram densidade de células de 10^{10} células/mL, enquanto nos cultivos realizados em meio Dyg's isso não foi possível, sendo observado uma densidade máxima de 10^9 células/mL. O uso de sacarose como nutriente pode ter diminuído a taxa de crescimento de *A. brasilense*, uma vez que para o catabolismo deste carboidrato as células necessitam expressar outras enzimas, o que pode ocasionar um gasto energético extra e como conseqüência, observa-se uma menor velocidade de crescimento nos meios de cultivo que possuem sacarose como fonte de carbono.

Os resultados obtidos no experimento de cinética se assemelham com trabalhos como o de Rissi (2006), onde a velocidade específica de crescimento de *A. lipoferum* em meio contendo sacarose como fonte de carbono foi de aproximadamente 0,35 h^{-1}. Bashan e colaboradores (2011) testaram as estirpes Cd e Sp6 de *A. brasilense* em meios suplementados com glicerol obtendo $\mu_{máx}$ de 0,48 h^{-1} e 0,49 h^{-1}, respectivamente.

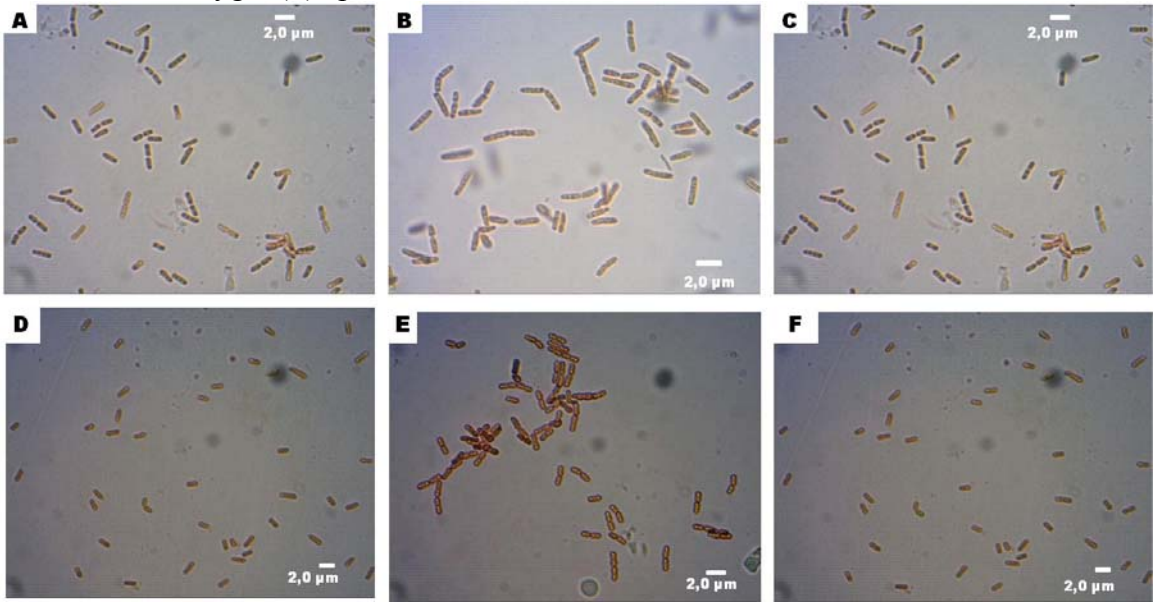
Outro ponto interessante observado foi o comportamento dos cultivos de *A. brasilense* AbV5 nos meios de cultivo Form1 e Dyg's, que apresentaram diminuição do número de células viáveis ao final do período de crescimento exponencial, seguido de novo aumento nas densidades dos cultivos, de forma mais pronunciada no meio Form1. Este comportamento pode ser devido à ocorrência de diauxia, caracterizada por irregularidades ou desníveis na densidade celular dentro de uma mesma fase de crescimento, que pode ser tanto no período exponencial como no estacionário, semelhante ao observado na Figura 4. Este tipo de fenômeno já foi citado por Rojas et al., (2009) no cultivo de *Rhizobium* sp. A diauxia, diauxismo ou ainda crescimento diáuxico, é conhecida como o metabolismo concomitante de dois substratos, é freqüentemente observada quando duas ou mais fontes de Carbono, como glicose e glicerol, são usadas num mesmo meio de cultivo (TSUJI et al., 1997). Por outro lado, existe relato na literatura da ocorrência de duas fases de crescimento em cultivos de *A. brasilense* Sp 245 em meio contendo glicerol e extrato de levedura (DIAS, 1988), devido ao consumo preferencial das substâncias nitrogenadas contidas no extrato de levedura e não pela ocorrência de diauxia. Em seu estudo, Rissi (2006) estudou o crescimento de *A. brasilense* Sp7 em meio de cultivo contendo 1,0 g/L de extrato de levedura e 5,0 g/L de glicerol e observou o consumo simultâneo de ambas as fontes durante o cultivo, sem observar duas fases de crescimento exponencial.

Os resultados obtidos não permitem concluir se houve diauxia durante o cultivo nos meios Dyg's ou Form1, ou se ocorreu o consumo preferencial de algum dos nutrientes que tornando-se limitante, exigiu uma readaptação do metabolismo celular à composição dos meios de cultivo favorecendo a ocorrência de duas fases distintas de crescimento exponencial. Ainda, o cultivo realizado no meio Form15 apresentou uma curva de crescimento bastante característica, com distinção entre as fases de crescimento exponencial estacionária. A presença de glicerol nas formulações 1 e 15 e a possível assimilação desta fonte de C por *Azospirillum brasilense*, pode facilitar o seu metabolismo primeiramente, e posteriormente a sacarose como sugerido na literatura. O mesmo pode ser observado no meio Dyg's, onde a glicose é consumida num primeiro momento, e só após isso os esqueletos carbônicos encontrados na peptona e extrato de levedura serão utilizados (MATHEWS et al., 2002). É importante lembrar que o meio de cultivo Form1 contém glicerol, sacarose e/ou extrato de levedura que podem ser utilizados como fonte de carbono, enquanto o meio Dyg's apresenta glicose, a peptona e extrato de levedura, estes últimos podendo ser metabolizados como em rotas de desaminação para uso dos esqueletos carbônicos (PELCZAR, 1978) para o crescimento microbiano. A maior concentração de extrato de levedura e/ou sacarose presente no meio de cultivo Form15 pode ter suportado o crescimento celular durante todo o cultivo, mesmo havendo consumo preferencial de algum dos nutrientes, e desta forma evitando a ocorrência de irregularidades na curva de crescimento.

A avaliação dos resultados sobre a cinética de crescimento de *A. brasilense* AbV5 permitiu inferir que o início da fase estacionária de crescimento ocorreu aproximadamente após 20 horas de cultivo no meio Form15, enquanto nos meios Form1 e Dyg's esta etapa ocorreu aproximadamente após 11 horas de cultivo. Isso pode ser explicado pelas concentrações dos nutrientes nas diferentes formulações testadas. No meio 15, a elevada concentração de sacarose (50 g/L) e extrato de levedura (50 g/L) pode ter ocasionado uma extensão da fase de crescimento exponencial, consequentemente retardando a fase estacionária. Este fato possivelmente contribuiu para a produção de compostos do metabolismo secundário, pois apesar do microrganismo ter cessado o seu crescimento e divisão celular, produz vigorosamente os EPS, já citados anteriormente. Além disso, a literatura ainda cita a presença das inclusões celulares, como PHB (poli-β-hidroxibutirato), que estão relacionadas a uma maior longevidade celular (MADIGAN et al., 2010; SANGKHARAK e PRASERTSAN, 2008; BURDMAN et al., 1998). Na Figura 15 pode-se

observar a presença das inclusões celulares, possivelmente PHB, nas células de *A. brasilense* AbV5 cultivadas nos meios Dyg's, Form1 e Form15 em diferentes tempos de cultivo.

Figura 15 - Micrografias ópticas de células de *A. brasilense* AbV5: em meio Form1 (A), Form15 (C) e Dyg's (E) após 12 horas de cultivo e meio Form1 (B), Form15 (D) e Dyg's (F) após 36 horas de cultivo.



Na figura 15, é possível observar que as células de *A. brasilense* AbV5 ainda encontram-se em divisão. Porém, é possível notar a presença inclusões celulares, provavelmente grânulos de poli-β-hidroxibutirato (PHB).

A produção de PHB em *Azospirillum brasilense* apresenta-se variável de acordo com as condições de crescimento do microrganismo, principalmente relacionadas ao metabolismo de carbono e nitrogênio. Para Brandl et al. (1990), além de C e N, a escassez de oxigênio também pode levar à produção de PHB em cepas de *Azospirillum brasilense* Cd. Sob condições de fixação de N_2, este biopolímero pode chegar a corresponder cerca de 30 % de sua massa seca; por outro lado, quando cultivado utilizando NH_4^+ como fonte de N, a produção de PHB é diminuída e constitui apenas 1 % da biomassa (NUR et al., 1982). Na ausência de NH_4^+ e sob condições de fixação de N, cepas de *A. brasilense* Cd, em cultivo descontínuo acumularam cerca de 75 % da sua massa seca como PHB (TAL e OKON, 1985). Este biopolímero de reserva é importante para a espécie em questão já que se apresenta como única fonte de C e energia em condições de baixa disponibilidade de nutrientes, como por exemplo, na ausência das plantas hospedeiras e no solo. Este mecanismo fisiológico de proteção, junto de outros como a produção de exopolissacarídeos e melanina, permite

classificar os representantes deste gênero em bactérias rizocompetentes (OKON et al., 1976; BASHAN e LEVANONY, 1990; DEL GALLO e FENDRIK, 1994). Na produção de inoculantes estes metabólitos podem garantir uma maior sobrevida e consequentemente a qualidade do produto.

5.1.2 Projeção de Custos na Produção das Formulações de Meios Estudadas

O custo de produção de um litro de meio Dyg's foi de aproximadamente R$ 1,40 (Tabela 11), enquanto que um litro dos meios 1 e 15, custa respectivamente, R$ 3,41 (Tabela 9) e R$ 12,32 (Tabela 10). Apesar do custo maior, os meios propostos são capazes de sustentar uma elevada densidade celular, aproximadamente 10^{10} UFC/mL, em condições ainda não otimizadas. Isto garante uma economia para as indústrias produtoras de inoculantes e biofertilizantes, pela maior produção de biomassa por volume de cultivo, comparado, por exemplo, ao meio Dyg's, onde a densidade celular máxima obtida foi de 10^9 UFC/mL h^{-1}. Pensando-se em termos industriais também procura-se alternativas ao meio NFB, muito utilizado na produção de biomassa de *Azospirillum*, pois a sua principal fonte de carbono, o ácido málico, é uma substância de difícil obtenção, além, dos micronutrientes e vitaminas da formulação que agregam um alto custo e dificultam o preparo deste meio.

Os cultivos obtidos nos meios Form1 e Form15 apresentaram elevada produção de EPS, que vem sendo descrito como importante para a manutenção da viabilidade das células inoculantes como também para a melhoria da qualidade de formulações inoculantes para aplicação na agricultura.

Como alternativas para a redução dos custos dos meios propostos também pode ser empregados como substitutos do extrato de levedura, os subprodutos de cervejarias, destilarias e usinas com elevado teor de nitrogênio.

Tabela 9 - Projeção dos Custos de produção do Meio Form1.

Substrato	Quantidade Aplicada	Valor (R$)	Quantidade	Total (R$)
Sacarose	10 g/L	5,99	500 g	0,01
Glicerol	36 g/L	21,45	1200 g	0,64
K_2HPO_4	0,5 g/L	26,00	500 g	0,03
Extrato de levedura	10 g/L	111,60	500 g	2,23
$CuSO_4 . 5H_2O$	$3,2 \times 10^{-5}$ g	16,67	500 g	0,10
$ZnSO_4 . 7H_2O$	$9,6 \times 10^{-4}$ g	16,71	500 g	0,10
H_3BO_3	$1,1 \times 10^{-3}$ g	80,00	500 g	0,10
$Na_2MoO_4 . 2H_2O$	$8,0 \times 10^{-4}$ g	224,65	500 g	0,10
$MnSO_4 . H_2O$	$9,6 \times 10^{-4}$ g	20,50	500 g	0,10
	TOTAL			**3,41**

Tabela 10 - Projeção dos Custos de produção do Meio Form15.

Substrato	Quantidade Aplicada	Valor (R$)	Quantidade	Total (R$)
Sacarose	50 g/L	5,99	500 g	0,05
Glicerol	36 g/L	21,45	1200 g	0,64
K_2HPO_4	0,5 g/L	26,00	500 g	0,03
Extrato de levedura	50 g/L	111,60	500 g	11,16
$CuSO_4 . 5H_2O$	$3,2 \times 10^{-5}$ g	16,67	500 g	0,10
$ZnSO_4 . 7H_2O$	$9,6 \times 10^{-4}$ g	16,71	500 g	0,10
H_3BO_3	$1,1 \times 10^{-3}$ g	80,00	500 g	0,10
$Na_2MoO_4 . 2H_2O$	$8,0 \times 10^{-4}$ g	224,65	500 g	0,10
$MnSO_4 . H_2O$	$9,6 \times 10^{-4}$ g	20,50	500 g	0,10
	TOTAL			**12,38**

Tabela 11 - Projeção dos Custos de produção do Meio Dyg's.

Substrato	Quantidade Aplicada	Valor (R$)	Quantidade	Total (R$)
Glicose	2 g/L	6,50	500 g	0,03
Peptona	1,5 g/L	293,00	500 g	0,88
K_2HPO_4	0,5 g/L	26,00	500 g	0,03
Extrato de levedura	2 g/L	111,60	500 g	0,45
$MgSO_4 . 7H_2O$	0,5 g/L	9,94	500 g	0,01
	TOTAL			**1,40**

5.2 PRODUÇÃO DOS VEÍCULOS INOCULANTES SÓLIDOS: BIOCOMPÓSITOS EXPANDIDOS

5.2.1 Viabilidade da Aplicação de Biocompósitos Expandidos para uso como Veículo Inoculante

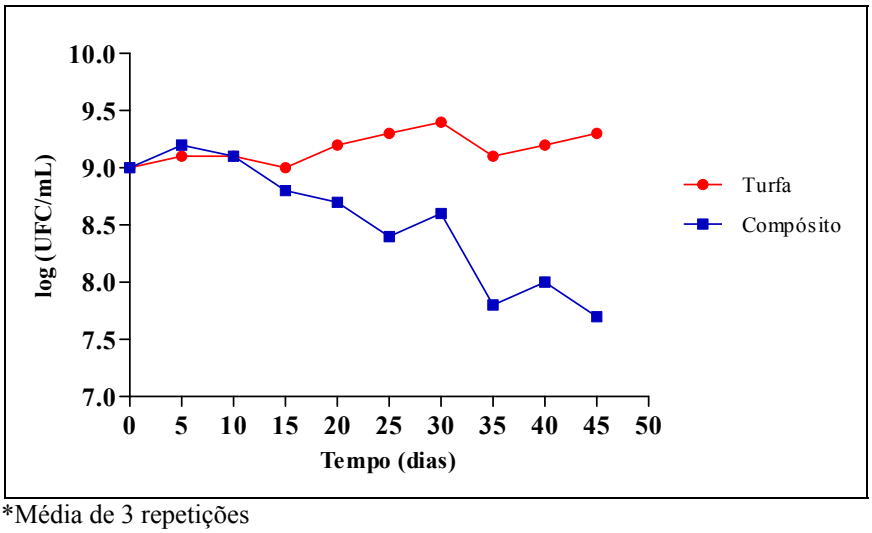
A avaliação da sobrevivência das bactérias veiculadas no compósito expandido ao longo do tempo, obtida através da realização de curvas a partir de valores de contagens de unidades formadoras de colônia, mostrou que houve uma redução significativa no número de células viáveis de *A. brasilense* AbV5 na formulação biocompósito 15 dias após o início do ensaio, em comparação com as contagens referentes ao inoculante turfoso, que apresentou pouca variação entre as contagens realizadas durante os 45 dias de duração do ensaio, conforme pode ser observado na Figura 16.

É importante ressaltar que mesmo ocorrendo diminuição do número de células viáveis da formulação biocompósito, o decréscimo ocorreu de forma gradual, sugerindo a potencialidade de aplicação de biocompósitos a base de amido para uso como veículo inoculante para bactérias promotoras do crescimento vegetal. É possível que a incapacidade do biocompósito manter uma população estável de células bacterianas ao longo do período do ensaio estivesse relacionada com a finalidade pela qual este compósito expandido foi produzido, e consequentemente a sua composição e características físico-

químicas. Segundo Debiagi et al. (2010), a principal finalidade do biocompósito seria o seu emprego como um polímero biodegradável, substituto aos polímeros sintéticos convencionais utilizados como embalagens plásticas. O maior emprego destas embalagens é a conservação e comercialização de alimentos, que por sua vez busca desenvolver produtos que não favoreçam a proliferação de micro-organismos.

A avaliação de algumas propriedades químicas e físicas do biocompósito expandido, que interferem diretamente na sobrevivência bacteriana, mostrou a provável ineficiência do material para aplicação como veículo inoculante. O pH inicial mostrou-se ácido para o desenvolvimento bacteriano, em torno de 4,32 ± 0,10 comprometendo a sobrevivência do microrganismo. A cor foi determinada no sistema CIE L*a*b*. Enquanto as coordenadas de cromaticidade que indicam as direções que a cor pode assumir, a*(+a* = vermelho e -a* = verde) com um valor de 9,60 ± 0,21 e b* (+b* = amarelo e -b* = azul) igual a 24,12 ± 3,11, indicou, respectivamente, aumento da coloração avermelhada e amarelada, confirmando a ocorrência de reações de Maillard, durante o processo de extrusão, conforme já mencionado por Cheftel (1986), Camire et al. (1990), Kokini (1993) em função do teor de açúcares livres associado às matérias-primas empregadas na confecção do biocompósito, especialmente no caso das fibras de cana-de-açúcar que podem conter resíduos de sacarose livre (DEBIAGI et al., 2010). A formação e a presença dos produtos das reações de escurecimento não-enzimático, melanoidinas e compostos pirazínicos (BOBBIO e BOBBIO, 1992), podem indisponibilizar nutrientes ao microrganismo, como por exemplo, a lisina, ou ainda, apresentar alguma toxicidade.

Figura 16 -Cinética de sobrevivência de *A. brasilense* AbV5 em compósito expandido e em turfa.



*Média de 3 repetições

5.2.2 Desenvolvimento de Formulações para a Produção de Biocompósitos Expandidos para Uso Como Veículo Inoculante para Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal

Após a realização do teste descrito no item 5.2.1 e analisando os resultados obtidos, optou-se em aperfeiçoar qualitativa e quantitativamente a formulação do biocompósito, buscando adequar a possibilidade de compatibilização de diferentes materiais oferecida pela técnica de extrusão a quente com a necessidade de manutenção da viabilidade celular por um elevado período de tempo de armazenamento. Desta forma, buscou-se adicionar à formulação original alguns nutrientes e agentes protetores para a célula, como também modificar algumas propriedades químicas e físicas do biocompósito.

Segundo Schuh (2005), diversas substâncias têm sido estudadas para uso como suporte para inoculantes, como por exemplo: argila, carvão, lignita, perlita, fosfato de rocha, talco, poliacrilamida, gomas naturais e alginatos. Além desses compostos destaca-se ainda o uso de polímeros naturais ou sintéticos, como os polissacarídeos, que podem fornecer as características desejadas ao produto final, bem como manter a viabilidade celular. Baseando-se nisso, as misturas para a obtenção dos veículos sólidos utilizaram amido de mandioca, glicerol, sacarose, leite em pó, fosfato de rocha, fibra de cana e extrato de levedura, como nutrientes e componentes necessários para o processo de extrusão.

Após a escolha dos componentes, todos tiveram os pH medidos (Tabela 12), já que esta propriedade é de extrema importância para a sobrevivência do microrganismo. O pH do meio onde a célula se encontra deve ser rigorosamente controlado, já que este pode modificar a composição e a natureza da superfície celular e influenciar as conformações protéicas e de outras macromoléculas afetando a fisiologia microbiana (BALATTI, 2008). Na mistura dos materiais além do equilíbrio nas proporções dos diversos componentes de origem ácida e básica, a água da formulação original foi substituída por tampão Fosfato 1,0 mol/L para garantir um pH estável e próximo da neutralidade.

Tabela 12 - pH dos componentes utilizados nas formulações dos biocompósitos utilizados como veículos sólidos

Componentes	pH
Amido de mandioca	5,43
Fibra de cana	3,17
Glicerol	6,57
Fosfato de rocha (pó de basalto)	9,92
Leite em pó	6,23
Extrato de levedura	7,02
Açúcar Cristal (sacarose)	6,43
Tampão Fosfato 1,0 mol/L	7,01

*Média 3 repetições.

5.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E QUÍMICA DOS BIOCOMPÓSITOS

5.3.1 Análise do pH dos Biocompósitos

Posteriormente ao processo de extrusão a quente, determinou-se o pH das formulações (Tabela 13), que mostraram-se mais adequados ao emprego como inoculante, pois o limite recomendado pela literatura em função da legislação é de 6,5 – 7,0 (BALATTI, 2008). No caso da turfa, a sua composição heterogênea leva-a a ter um pH ácido. Neste caso, a neutralização é realizada através da adição de carbonatos e hidróxido de amônio o que ocasiona um maior custeio do produto em relação os biocompósitos (LIMA, 2001).

5.3.2 Índice de Expansão (IE) dos Biocompósitos

A expansibilidade é uma característica física desejável aos biocompósitos desenvolvidos para atuarem como suportes sólidos na imobilização de células microbianas com finalidade de uso como inoculante agrícola. Este parâmetro influencia as propriedades físicas do material, sendo um dos parâmetros utilizados para avaliar a homogeneidade, uniformidade e a repetibilidade dos ensaios de caracterização destes materiais (CUQ et al., 1996). Considerando a aplicação na imobilização de micro-organismos vivos, o índice de expansão também é importante para prever como se dará a interação das células bacterianas com o biocompósito, uma vez que o microrganismo pode ficar aderido e/ou adsorvido somente à superfície do material, como também pode ocorrer o engaiolamento das células, quando estas ficam inclusas nos poros do material. A imobilização de células bacterianas em formulações inoculantes para uso agrícola possibilitam o incremento da viabilidade celular através da proteção contra estresses bióticos (como a predação) e abióticos (como o estresse

hídrico). O uso de células imobilizadas em uma matriz biodegradável permite ainda que ocorra a liberação lenta dos microrganismos inoculantes junto às sementes e/ou raízes vegetais (BASHAN, 1986).

No processo de extrusão, o material é submetido a um aquecimento sob condições adiabáticas e tensões de cisalhamento que, combinados a diferentes tipos de matérias-primas, umidade, temperatura, e fatores intrínsecos do equipamento de extrusão, propiciam a obtenção de um produto final com características específicas de textura, densidade e expansão, sendo estas bastante distintas daquelas observadas nos materiais tratados em separado. A expansão do material ocorre após sua saída da extrusora, quando ocorrem grandes diferenças de temperatura e pressão proporcionando uma rápida evaporação da água na saída da matriz e a formação de células de ar no corpo do material extrusado (GUTKOSKI e EL- DASH, 1999; LUSTOSA et al., 2008).

Na tabela 13, estão os resultados de índice de expansão dos biocompósitos logo após o termino do processo de extrusão. O IE variou de 0,938 a 1,450 dependendo da composição da formulação, devido aos diferentes teores de fibra de cana e umidade empregados. As formulações 1 e 4 apresentaram os maiores índices de expansão e nelas foram empregados apenas 9,2 e 9,5% de fibra e 10,9 mL de tampão. Por outro lado, as formulações com maiores teores de fibra apresentaram um índice de expansão menor, 0,938 e 1,025. Karam et al.,(2001) notaram dificuldade de expansão em materiais ricos em fibras, corroborando os dados observados neste estudo.

Vários pesquisadores vêm estudando o efeito do teor de umidade da matéria-prima e da temperatura de extrusão nas propriedades dos extrusados (HAPER, 1981; MERCIER e FEILLET, 1976; MILLER, 1985). A umidade afeta significativamente a expansão sendo considerada a variável mais importante do processo (CHEN et al., 1991). Um baixo teor de umidade do amido pode restringir o fluxo do material dentro do extrusor aumentando, assim, a taxa de cisalhamento e tempo de residência, o que provavelmente aumenta o grau de gelatinização do amido e, por conseguinte, a expansão. Todavia, quando o teor de umidade é baixo demais (inferior a 15%), isto pode criar uma taxa de cisalhamento muito alta, aumentando a temperatura do produto e conseqüentemente, a degradação do amido. Tal condição pode resultar na redução da expansão (CHINNASWANNY e HANNA, 1988; HAPER, 1986). Segundo Vilela e El-Dash (1987), o aumento da temperatura de extrusão diminui a viscosidade do gel, provocando um maior fluxo do material durante a extrusão e maior porosidade.

5.3.3 Densidade dos Biocompósitos Expandidos

Na Tabela 13, estão contidos os resultados de densidade dos biocompósitos. Esta propriedade reflete a estrutura química e a organização molecular do material. Assim, as regiões cristalinas apresentam-se mais compactas, enquanto que as regiões amorfas são mais volumosas (MANO, 2000). Segundo Lewis (1993) a densidade aparente de um produto depende de uma série de fatores como a densidade de seus componentes, a geometria, o tamanho, as propriedades de superfície e o método de medida.

Foi observado que a densidade das 6 formulações de biocompósitos variou entre 0,237 a 0,278 g/cm^3, valores menores do que os encontrados na literatura, como os compósitos a base de amido e fibras vegetais obtidos por Debiagi e colaboradores (2010), onde a densidade oscilou entre 0,86 e 0,97 g/cm^3 e no trabalho de Schmidt e Laurindo (2010), onde foram produzidos materiais a base de amido utilizados como embalagens expandidas, os valores de densidade encontram-se entre 0,63 e 1,3 g/cm^3.

Os resultados obtidos estão de acordo com a literatura, já que Glenn et at. (2001) e Funabashi e Kunioka (2005), em experimentos com materiais extrusados a base de amido e fibras, constataram que a densidade dos compósitos decresce com a adição de fibras. Este fato se deve ao efeito causado pelas fibras durante a extrusão que ocasionou a retenção de ar no interior do material que aumentando a expansão.

Tabela 13 - Resultados de pH, densidade, índice de expansão e porosidade dos biocompósitos expandidos.

Biocompósito	**pH**	**Densidade (g/cm^3)**	**Índice de Expansão (IE)**
1	7,29	0,265±0,016^a	1,450 ± 0,192^a
2	6,85	0,244±0,012^b	1,025 ± 0,138^b
3	7,10	0,237±0,013^c	1,100 ± 0,150^b
4	7,14	0,278±0,008^d	1,088 ± 0,168^a
5	6,80	0,244±0,016^b	0,938 ± 0,160^b
6	6,82	0,237±0,012^c	1,075 ± 0,143^b

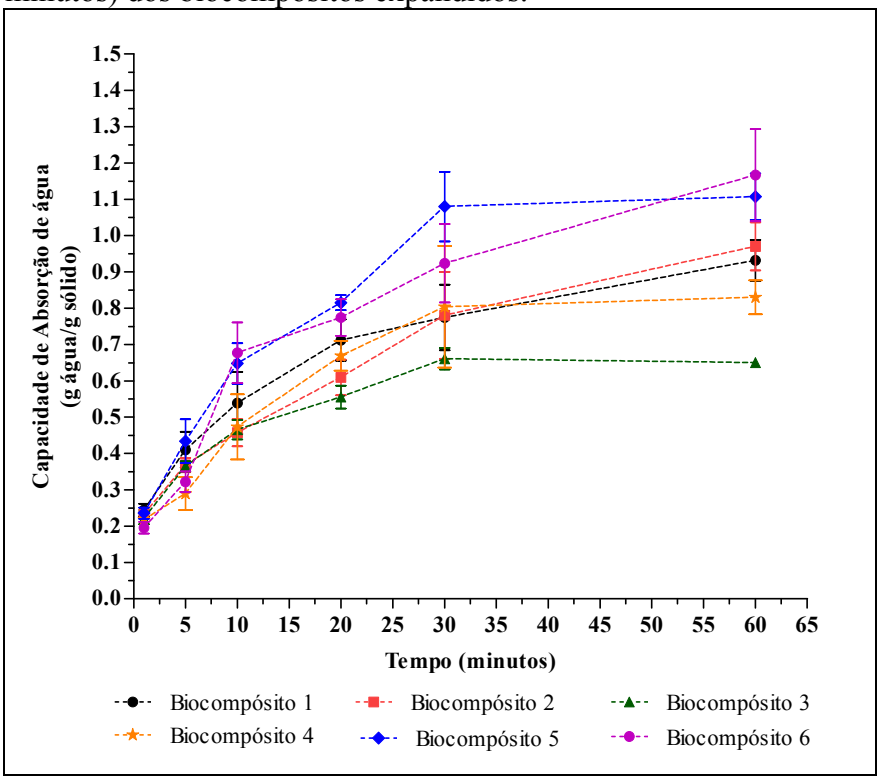
Média ± desvio padrão. Letras minúsculas diferentes significam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as médias na mesma coluna (teste de Tukey).
*Média de 20 repetições.

5.3.4 Índice de Absorção de Água (IAA) dos Biocompósitos

Os resultados de absorção de água dos biocompósitos em diferentes tempos (1, 5, 10, 20, 30 e 60 minutos) estão expressos na Figura 17. Os IAA, após 60 minutos,

variaram de 0,65 a 1,20 g água/g amostra. Quando comparados com o trabalho de Debiagi et al. (2010), onde a variação do IAA foi de 0,85 a 1,50 g água/g amostra, pode-se observar que os dados obtidos foram inferiores. O biocompósito 6 apresentou o maior índice de absorção de água, aproximadamente 1,20 g água/g amostra. Os biocompósitos 3, 4 e 5, após 30 minutos de experimento atingiram a saturação. De acordo com Sjoqvist et al. (2010), a formação materiais de menor densidade e com uma estrutura porosa oferece uma maior capacidade de absorção de água, como observado nos biocompósitos 5 e 6. A quantidade de água absorvida no tempo inicial está relacionada à porosidade das espumas, enquanto o aumento na quantidade de água absorvida a medida que se aumenta o tempo de imersão pode estar relacionado com a absorção de água pelo amido. Para Pothan (2004), a capacidade ou o índice de absorção de água em polímeros enriquecidos com fibras vegetais é maior, já que estruturalmente apresentam hidroxilas presentes na hemicelulose e celulose, tendo assim, uma natureza hidrofílica.

Figura 17 - Cinética de Absorção de Água em diferentes tempos (1, 5, 10, 20, 30 e 60 minutos) dos biocompósitos expandidos.



*Média de 5 repetições.

5.4 EMBALAGEM DOS BIOCOMPÓSITOS

Como embalagem utilizou-se pacotes de celofane com dimensões de 10 cm comprimento por 7 cm de largura. Este tipo de material, de acordo com Bellhouse et al. (1973), garante uma boa troca gasosa entre o ambiente e o produto. Devido a isso, várias pesquisas realizadas nas áreas alimentícia e médica utilizam-o como membrana biológica.

Vários trabalhos utilizam embalagens de polipropileno, seja pela sua baixa permeabilidade à água e à luz, uma vez que ambos os fatores desencadeiam reações químicas diversas no material, que culminam em alterações indesejáveis no produto final (POLICARPO et al., 2007). Porém, no presente estudo, optou-se por um plástico alternativo para verificar a sua viabilidade como embalagem para o produto e a diminuição dos custos de produção.

5.5 ENSAIO DE ESTERILIZAÇÃO DOS BIOCOMPÓSITOS

A esterilização dos suportes sólidos para inoculantes é necessária, pois muitas vezes pode-se observar atividade antagonista devido à população microbiana natural encontrada no biocompósito (LIMA, 2001). Porém, deve ser efetiva na eliminação de contaminantes, sem, no entanto, alterar as propriedades físicas e químicas do substrato (ROMANI, 1989). Ainda, segundo Bashan (1998), a escolha do método de esterilização é um fator de extrema importância para o processo, pois ele pode elevar ainda mais os custos de produção dos inoculantes.

Os testes de eficiência de esterilização por calor seco realizados para as diferentes temperaturas testadas permitiram determinar a adequação do tratamento das embalagens a 160 °C por 4 horas, uma vez que as temperaturas inferiores (60, 90 e 120 ºC), foi possível observar contaminação fúngica do material.

A escolha entre a esterilização por calor seco e a esterilização por calor úmido deu-se através da análise das propriedades físicas e químicas dos biocompósitos após o tratamento de esterilização pela sua influência sobre a sobrevivência e viabilidade do microrganismo, cujos resultados são apresentados na Tabela 14.

Para os biocompósitos foram testados 2 métodos alternativos de esterilização: por calor úmido, através da autoclavagem, e por calor seco. Nos testes de esterilização por calor seco, a temperatura escolhida foi de 160 °C por 4 horas, já que nas

temperaturas inferiores testadas (60, 90 e 120 ºC), após o plaqueamento ainda foi possível observar contaminação fúngica do material.

A escolha do método deu-se através de observações das propriedades físicas e químicas, como índice de expansão, cor, densidade e índice de absorção de água dos materiais, que atuam diretamente na veiculação e viabilidade do microrganismo.

Tabela 14 - Resultados de Índice de Expansão (IE), Cor e Densidade dos Biocompósitos após Esterilização por Calor Úmido e Seco.

	Biocompósito Autoclavado			**Biocompósito esterilizado a seco**		
Formulação	**IE**	**Densidade**	**Cor**	**IE**	**Densidade**	**Cor**
1	1,375±0,222[a]	0,319±0,020[a]	+ + +	1,713±0,203[a]	0,263±0,018[a]	+ +
2	0,900±0,170[b]	0,276±0,011[b]	+ + +	1,050±0,154[b]	0,246±0,009[b]	+ +
3	0,988±0,190[b]	0,277±0,014[b]	+ + +	1,062±0,138[b]	0,237±0,017[c]	+ +
4	0,988±0,172[b]	0,284±0,012[b]	+ + +	1,700±0,208[a]	0,276±0,005[d]	+ +
5	0,888±0,206[b]	0,278±0,012[b]	+ + +	1,388±0,128[c]	0,242±0,009[b]	+ +
6	0,938±0,111[b]	0,278±0,012[b]	+ + +	1,050±0,154[b]	0,235±0,013[c]	+ +

Média ± desvio padrão. Letras minúsculas diferentes significam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as médias na mesma coluna (teste de Tukey). Na avaliação subjetiva da cor: + + + indica que o escurecimento quando comparado ao biocompósito não esterilizado foi extremo e + + indica um escurecimento intermediário.
*Média de 20 repetições.

Comparando os resultados dos métodos de esterilização através da Tabela 14, pôde-se constatar que a esterilização por calor úmido, através da autoclavagem, mostrou-se ineficiente, pois provocou uma redução dos IE, aumento da densidade, alteração do índice de absorção de água e o escurecimento dos biocompósitos.

A redução do índice de expansão e o aumento da densidade durante a esterilização são fatores de extrema importância na produção do inoculante sólido que utiliza o biocompósito como suporte já que, na presença de poros pequenos, a adsorção ocorre apenas na superfície (PRASAD et al., 2005), o que é indesejável, pois a localização superficial deixa as células desprotegidas. Isso ocorre devido à elevada umidade no processo de autoclavagem. O amido quando aquecido na presença da água, observa-se o rompimento de seus grânulos e uma fusão o que ocasiona a constrição do material e a diminuição da porosidade (FARHAT e BLANSHARD, 1997), contribuindo para o reforço da matriz polimérica levando a uma estrutura mais compacta e estável.

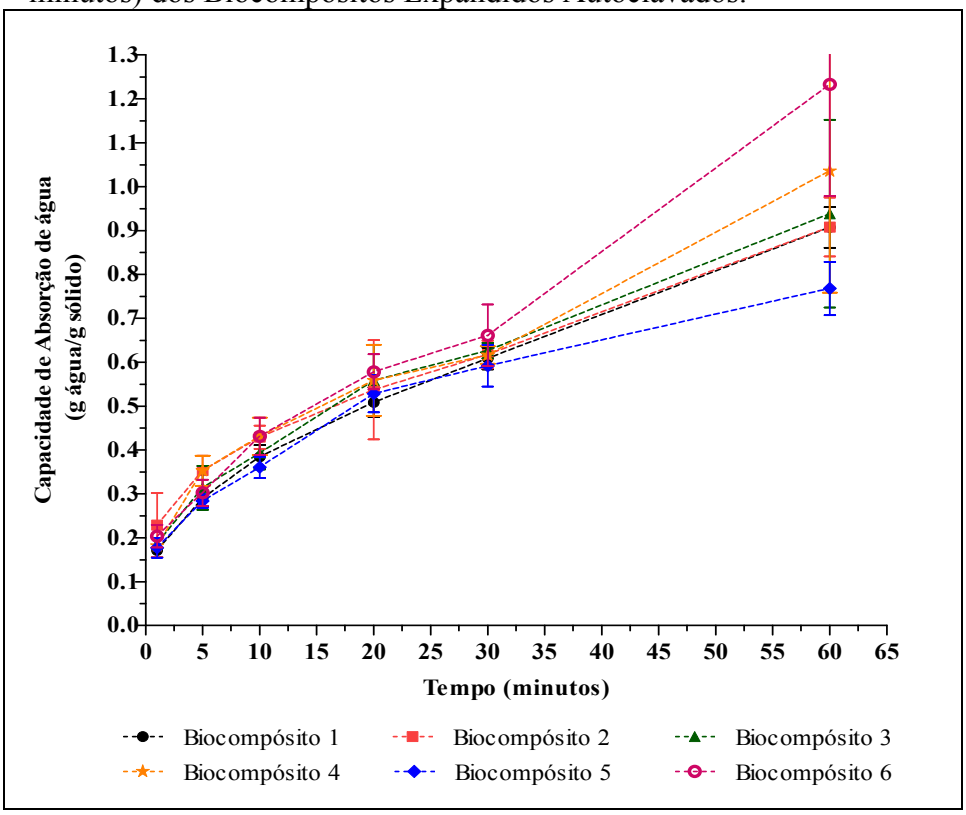
Os ensaios de absorção de água com os biocompósitos autoclavados e esterilizados a seco também comprovam possíveis mudanças estruturais, como pode ser observado nas Figuras 18 e 19. É nítido que a possível compactação da matriz polimérica ocasionada pela autoclavagem interferiu na porosidade do material e, por conseqüência, na

absorção de água (permeabilidade). Nos biocompósitos autoclavados os IAA, após 60 minutos de experimento, variaram de 0,75 a 1,25 g água/g amostra, enquanto que nas amostras esterilizadas por calor seco a variação foi de 1,8 a 2,75 g água/g amostra.

O comportamento de sorção nos biocompósitos pode ser atribuído ao mecanismo de capilaridade que envolve o fluxo da água para os espaços internos (células de ar - poros) formados durante o processamento do material. Para Sjoqvist et al. (2010) e Bouchonneau et al. (2010), o aumento da porosidade de um material faz com que este tenha maior capacidade de sorção através do processo de entrada da água nos espaços vazios, ou seja, o aumento da área de contato eleva as possibilidades de sorção de água pelo material. Autoclavando o material, fundindo os grânulos de amido e causando a constrição, a compactação, como já foi descrito anteriormente, possivelmente a porosidade será diminuída, o que poderia ser uma das explicações para a diminuição do IAA.

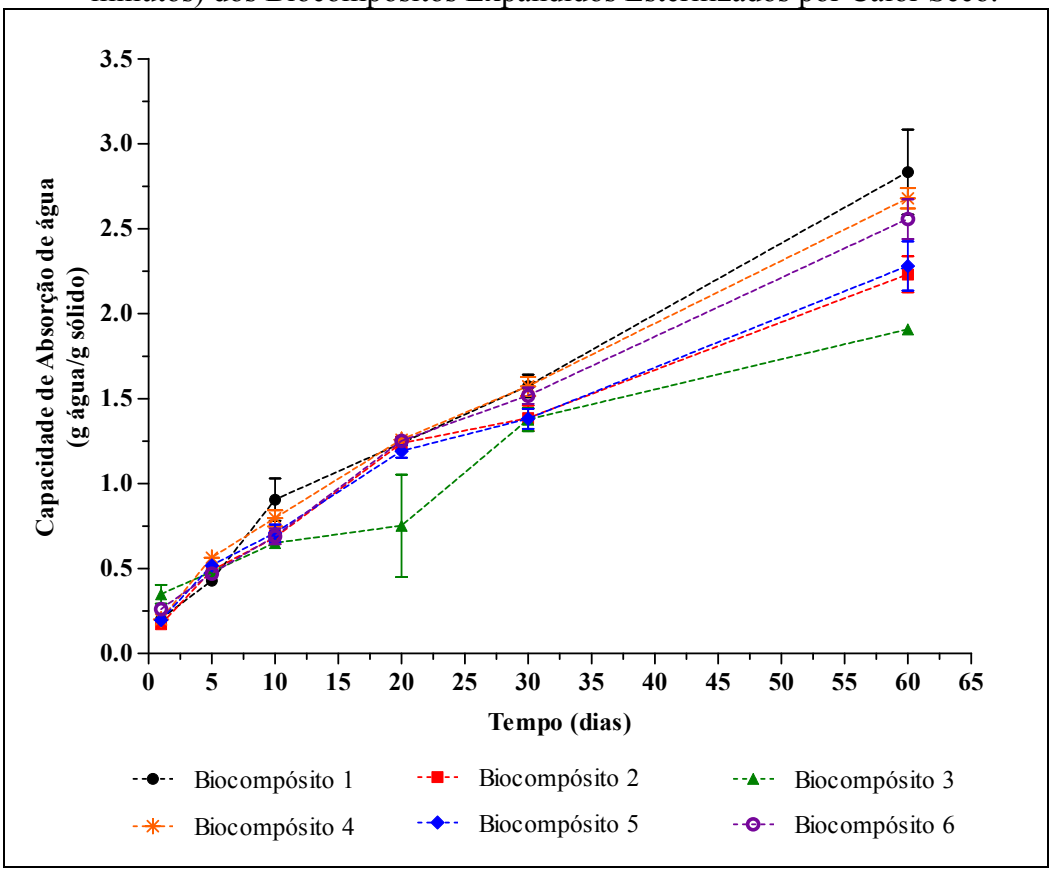
Cabe ressaltar que os testes de absorção de água utilizados no presente estudo não permitem distinguir entre absorção por capilaridade e da hidratação do material à base de amido em si. Provavelmente ambos os processos ocorrem.

Figura 18 -Cinética de Absorção de Água em Diferentes Tempos (1, 5, 10, 20, 30 e 60 minutos) dos Biocompósitos Expandidos Autoclavados.



*Média de 5 repetições.

Figura 19 - Cinética de Absorção de Água em Diferentes Tempos (1, 5, 10, 20, 30 e 60 minutos) dos Biocompósitos Expandidos Esterilizados por Calor Seco.



*Média de 5 repetições.

O maior escurecimento dos biocompósitos autoclavados quando comparados aos esterilizados por calor seco sugere a presença de produtos de reações de Maillard, que podem ocasionar danos ao microrganismo, conforme já discutido anteriormente.

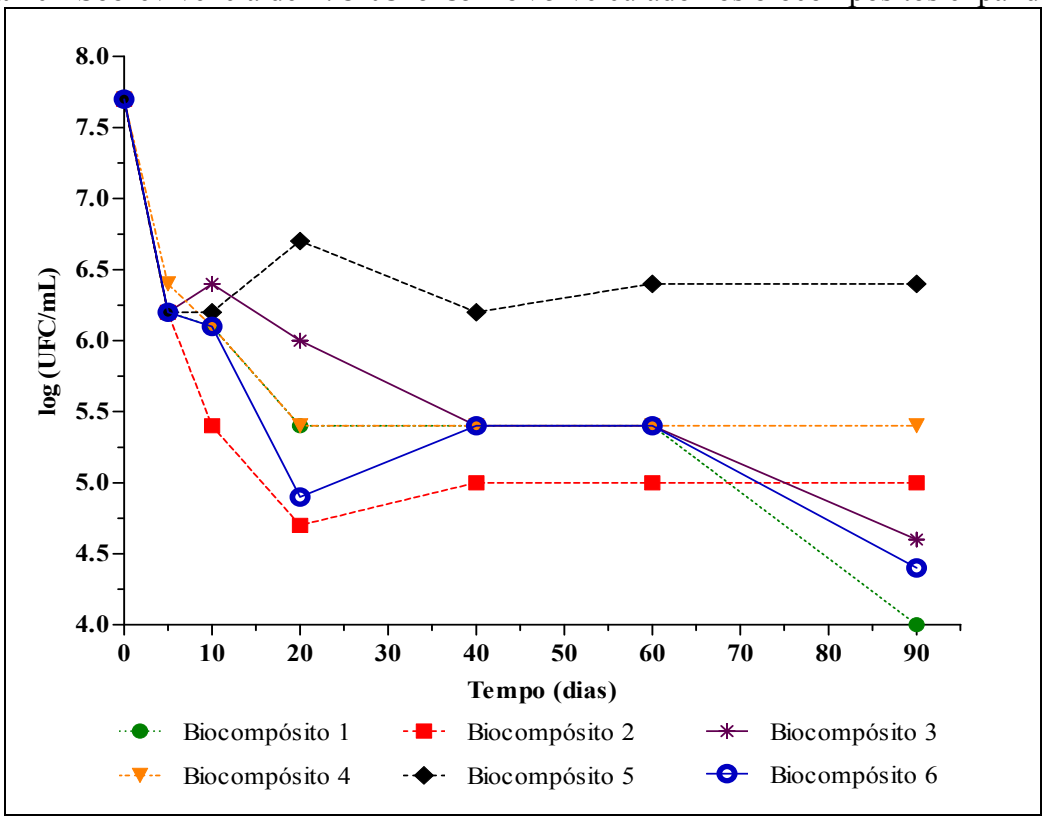
Devido ao maior IE e um menor escurecimento a adoção do método de esterilização por calor seco para os biocompósitos mostrou-se como a melhor solução.

5.6 AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA DE *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* ABV5 VEICULADO NOS BIOCOMPÓSITOS EXPANDIDOS

A análise das curvas de sobrevivência de *A. brasilense* AbV5 nos biocompósitos (Figura 20) indica que apenas a formulação 5 é potencialmente capaz de manter a viabilidade celular elevada (10^6 UFC/g) por até 90 dias de armazenamento em condições ambientais. Nos primeiros 10 dias de experimento, os dados das contagens, segundo o método NMP, mostram uma queda acentuada de $5{,}0x10^7$ UFC/g para $1{,}7x10^6$ UFC/g, porém após, esse período observou-se a estabilização da população microbiana. A

redução inicial das células de *Azospirillum* imobilizadas mostrou-se normal, conforme relatado por Bashan, 1986, em experimentos de imobilização em pellets de alginato.

Figura 20 - Sobrevivência de *A. brasilense* AbV5 veiculado nos biocompósitos expandidos.

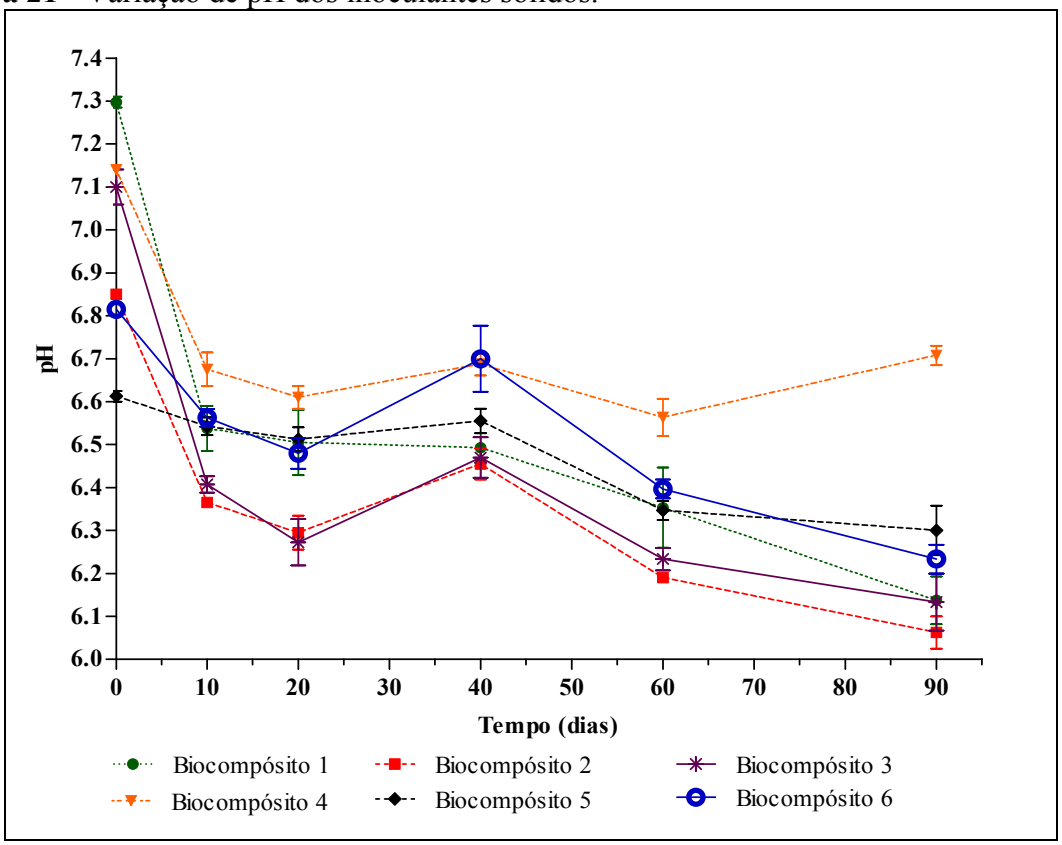


*Contagens segundo o NMP para 4 repetições.

Quando comparado aos inoculantes turfosos, comumente utilizados no meio agrícola, o biocompósito 5 mostra-se eficiente como veículo, pois, em experimentos com *A. amazonense* em turfa, Silva et. al. (2009), notou queda drástica da viabilidade celular, de 10^7 para 10^4 UFC/g, após 70 dias de armazenamento a 4 ºC. O mesmo foi relatado por Ferreira et al. (2010), em testes com *A. brasilense* Sp109, onde a viabilidade também foi afetada, de 10^9 para 10^7 UFC/g nas mesmas condições de armazenamento.

Fatores como o pH, a umidade e a temperatura de armazenamento podem ter afetado a viabilidade celular no decorrer do experimento. Na Figura 21, é notável a variação do pH no decorrer do experimento, resultante da ação dos ácidos orgânicos e outros metabólitos produzidos pelo microrganismo. Feng et al. (2002), relatou que a permeabilidade das embalagens, favorece as trocas gasosas, porém, influencia a perda da umidade. A dessecação é o principal fator de influência na sobrevivência microbiana em veículos inoculantes. Em rizóbios, por exemplo, os processos de desidratação e reidratação lentos resultam numa maior viabilidade (CARR et al., 2005).

Figura 21 - Variação de pH dos inoculantes sólidos.



*Média de 4 repetições.

Já a temperatura do armazenamento é responsável pela velocidade de todas as reações bioquímicas da célula bacteriana, e as variações destas, altera todo o metabolismo microbiano podendo inviabilizar as células microbianas.

Sugere-se ainda avaliar a influência dos produtos de reação de Maillard presentes no biocompósito, tóxicos aos microrganismos, podendo interferir na viabilidade celular.

5.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DOS INOCULANTES SÓLIDOS

A avaliação da veiculação das células de *A. brasilense* AbV5 nos biocompósitos após 10 dias de inoculação também foi realizada mediante microscopia eletrônica de varredura (MEV), conforme pode ser observado nas eletromicrografias apresentadas nas Figuras 22 e 23.

A adesão de microrganismos a superfícies é um fenômeno que ocorre naturalmente e depende das propriedades superficiais (tensão superficial, entalpia superficial por unidade de área, composição da superfície, etc.) das interfaces dos suportes de adesão e

das membranas dos microrganismos. Além disso, as propriedades microbiológicas e as características do meio circundante, tais como temperatura, pH, força iônica e disponibilidade de nutrientes, determinam, em muitos sistemas, o processo de adsorção (UBBINK E SCHAR-ZAMMARETTI, 2007).

Foi possível observar nas Figuras, que os biocompósitos apresentam uma superfície irregular, com a presença de protuberâncias e cavidades (Figura 22.A) e de material extracelular, possivelmente exopolissacarídeos produzidos pelas células (Figuras 22.B, 22.D, 23.A, 23.B, 23.C e 23.D). A literatura sugere que esse EPS contribui de maneira importante nos processos de agregação e floculação celular e nos estágios iniciais e finais da formação do biofilme oferecendo-o estabilidade (LEWIS, 2001; DAVIES et al., 1993; BURDMAN et al., 1998; GACESA, 1998), além disso, como já citado anteriormente a irregularidade superficial e presença de poros nos biocompósitos pode favorecer o desenvolvimento do biofilme e afetar a velocidade de colonização microbiana.

A formação de biofilme é composta por diferentes estágios, iniciando-se pela adesão na superfície, proliferação bacteriana dentro de microcolônias e expansão, formando estruturas altamente organizadas e resistentes, já que é uma estratégia para poderem suportar variações de condições ambientais, tais como, o pH e temperatura. Porém, a presença excessiva de biofilmes sobre a superfície do suporte pode dificultar a absorção de nutrientes do meio resultando em condições heterogêneas de crescimento celular e a troca gasosa (XAVIER et al., 2003).

Analisando as eletromicrografias, pode-se perceber que as células colonizaram, possivelmente, a superfície, alguns poros e cavidades dos biocompósitos. Siess e Divies (1981) relataram que em experimentos com células de *S. cerevisiae* imobilizadas em gel de poliacrilamida, verificou-se que no interior das partículas do gel a viabilidade celular apresentou-se heterogênea. Em contrapartida, as células que se encontravam na superfície do gel mantiveram a capacidade de formar colônias. Em experimentos com células de *C. sorokiniana* e *A. brasilense* imobilizadas em grânulos de alginato para o tratamento de resíduos, Bashan et al. (2011), percebeu agregados celulares e a formação de um espesso biofilme sobre toda a superfície do suporte.

Para Ortega e colaboradores (2001), a dinâmica de colonização dos suportes parece apresentar uma relação direta com a porosidade e, sobretudo, com o tamanho dos poros. Em experimentos utilizando espumas de Alumina (Al_2O_3) e Caulim, Argila Expandida e Borracha de EPR como suportes para imobilização celular, constataram que o primeiro obteve um melhor desempenho, apresentando excelente capacidade de imobilização biológica

e alta velocidade de colonização, já que este tinha uma alta porosidade e permeabilidade e poros com tamanho médio de 80 μm. Já a espuma de caulim, por apresentar uma menor porosidade e poros na faixa de 28 μm, teve uma velocidade de colonização e quantidade de biomassa aderida inferior. Quanto a argila expandida e à borracha EPR, apesar da alta porosidade do material, houve também uma baixa taxa de colonização e também um baixo nível de retenção de biomassa, o que pode ser explicado pelo tamanho dos poros, aproximadamente 28 μm.

Outro mecanismo importante de adesão celular são as interações dos microrganismos com a interface do substrato, que podem ser de específicas ou não específicas. As interações específicas envolvem o reconhecimento de um determinado sítio, de uma molécula receptora, que se encontra na interface do microrganismo, enquanto a interação não específica é dirigida por propriedades físico-químicas das duas interfaces interatuantes: microrganismo e superfície de adesão. As duas propriedades de maior importância, neste caso, são a hidrofobicidade celular e o potencial zeta. Essas propriedades regem o processo de adesão não específica da bactéria ao substrato (ABBASNEZHAD et al., 2008) e também podem ser utilizadas para explicar as causas da adesão de *Azospirillum brasilense* AbV5 nos biocompósitos. Estes dois parâmetros são reflexos de inúmeras interações intermoleculares (eletrostática, covalente, de hidrogênio e de dispersão) que ocorrem entre as moléculas da interface bacteriana e da interface do substrato, sendo todas estas formas de interação fundamentais para o processo de adsorção/adesão (SOMASUNDARAN et al., 2003).

Alguns exemplos de interações não específicas entre microrganismos e suportes foram retratados nos estudos de Ortega et. al (2001) com imobilização bacteriana em argila expandida, Marshall (1967), na produção de inoculantes para leguminosas utilizando montimorilonita como um dos suportes. No primeiro trabalho, a seletividade de colonização na argila foi explicada devido ao seu potencial zeta (diferença de potencial entre a partícula com a sua camada adsorvida na superfície e na solução) fortemente negativo que quando em contato com a superfície bacteriana também negativa pode ter formado uma barreira repulsiva muito forte para a maioria das bactérias, proporcionando a colonização da superfície do material por uma única espécie, que possivelmente foi capaz de ultrapassar esta barreira. Marshall (1967), relata que a imobilização de *R. meliloti* em montimorilonita se deve ao fato da superfície microbiana apresentar cargas positivas oriundas dos grupamentos amino e estas serem atraídas pelas cargas negativas da montimorilonita.

No presente trabalho, a imobilização das células de *A. brasilense* AbV5 não pode ser explicada somente por um mecanismo. Como foi brevemente explanado, a aderência e a imobilização dos microrganismos, assim como o desenvolvimento do biofilme são fenômenos complexos que dependem de vários fatores combinados, não sendo suficiente apresentar apenas uma ou outra característica favorável. Diversas interações ocorrem entre a superfície do suporte, os substratos e o microrganismo, e todos os fatores que interferem neste processo influenciam a imobilização microbiológica.

Figura 22 -Micrografias eletrônicas de varredura dos inoculantes sólidos: (A) Estrutura do biocompósito (formulação 1); (B) Matriz extracelular/biofilme sobre o biocompósito (formulação 1); (C) Colônia de *A. brasilense* AbV5 no biocompósito (formulação 1); (D) Matriz extracelular/biofilme sobre o biocompósito (formulação 2).

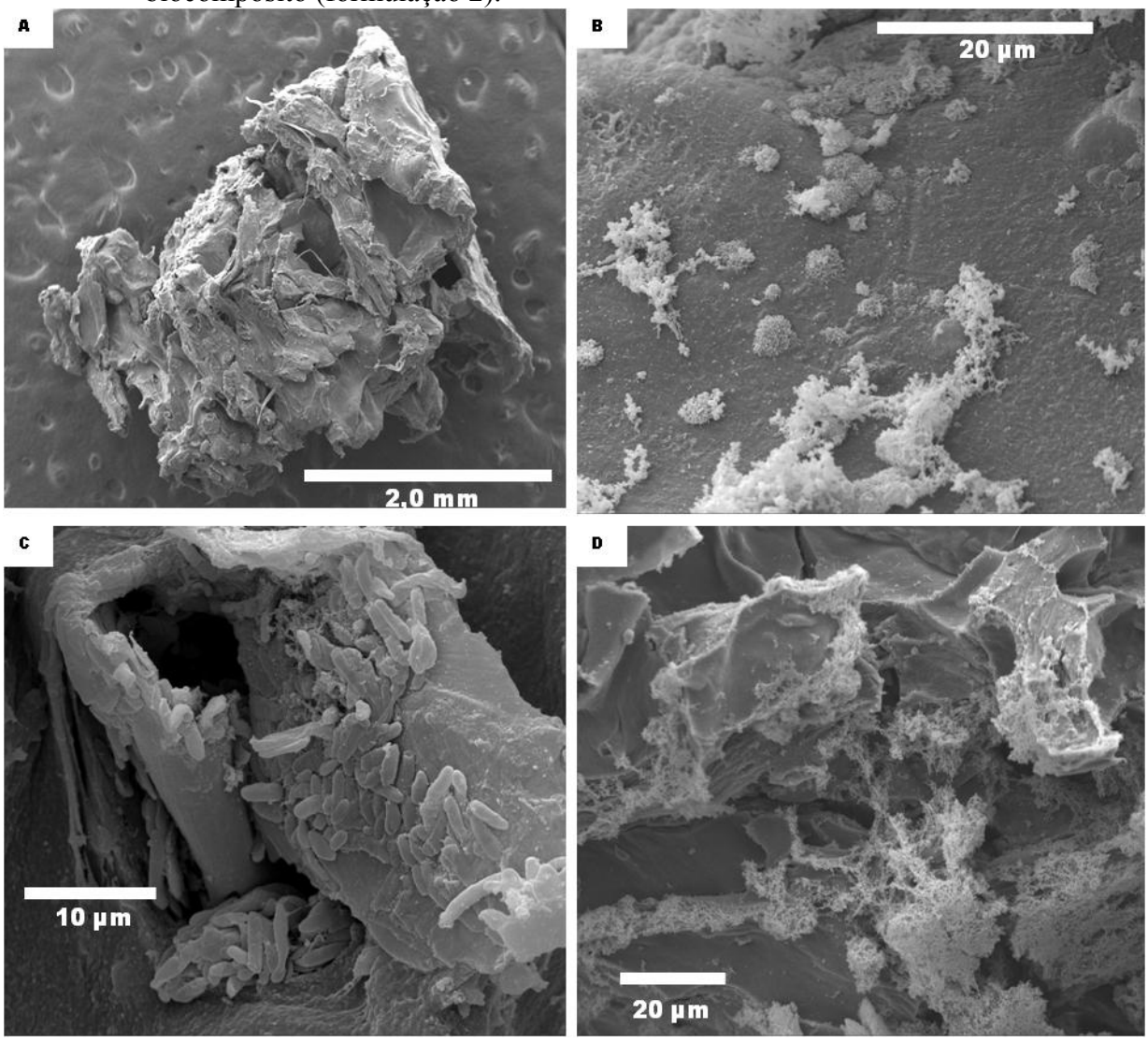
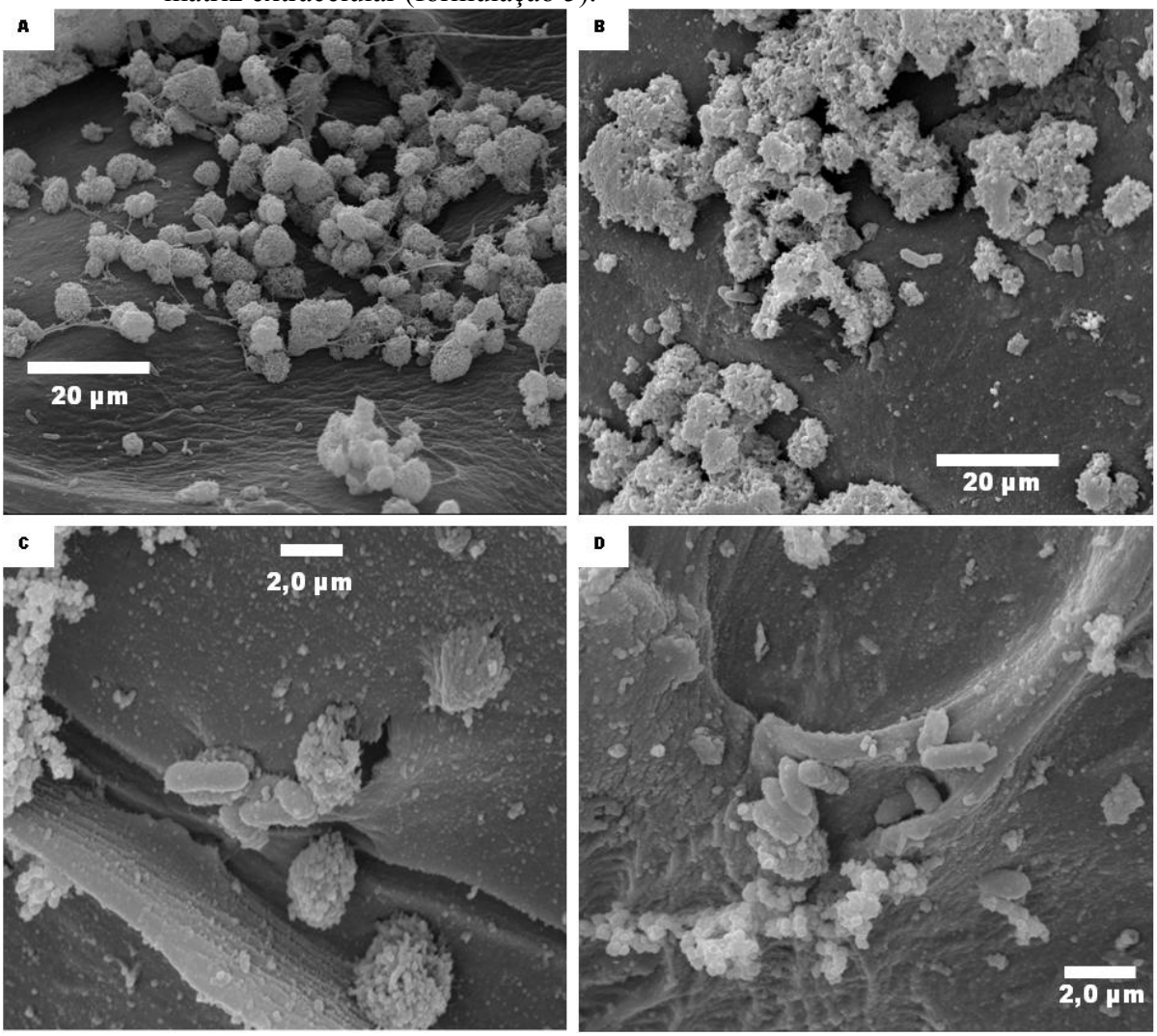


Figura 23 - Micrografias eletrônicas de varredura dos inoculantes sólidos: (A) e (B) Matriz extracelular sobre o bicompósito e microcolônias de AbV5 (formulações 3 e 4); (C) e (D) Colônia de *A. brasilense* AbV5 no biocompósito e a presença de matriz extracelular (formulação 5).



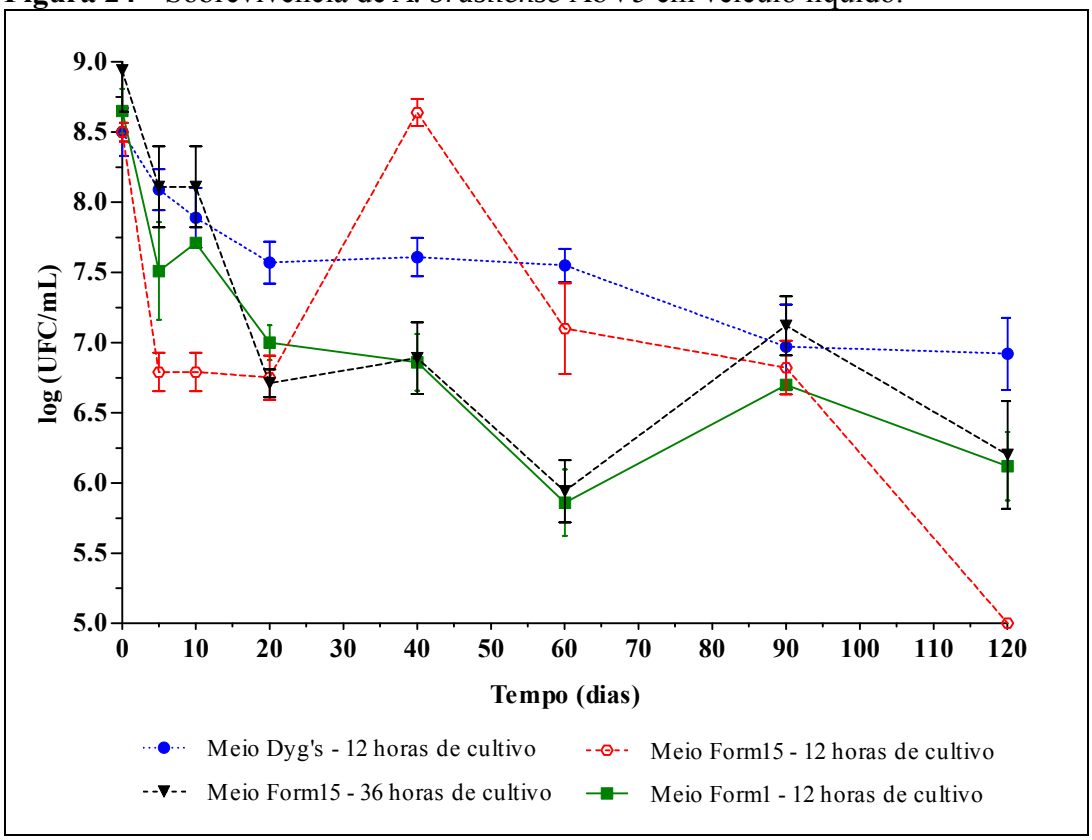
5.8 AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA DE *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* ABV5 NOS VEÍCULOS LÍQUIDOS

Através da análise das curvas de sobrevivência para A. brasilense AbV5 nos veículos líquidos pode-se constatar que a formulação que utiliza Dyg's como meio de crescimento foi a que obteve melhor performance quando comparado aos outros. No final de 120 dias de experimento, esta foi a única formulação capaz de sustentar uma densidade celular de 10^7 células/mL. O número de células viáveis nesta formulação também não se apresentou oscilatório, como nas outras.

Uma característica comum a todas as formulações foi a queda acentuada da população bacteriana após 20 dias de inoculação. Como citado anteriormente, variáveis como

pH e temperatura podem ter influenciado a sobrevivência microbiana. Na literatura, trabalhos como o de Kumaresan e Reetha (2011), relatam que *Azospirillum brasilense* AZ15 em veículos líquidos suplementados com PVP e Glicerol tiveram desempenhos apreciáveis na sobrevivência bacteriana, já que após 6 meses de armazenamento o número de células diminui apenas 10 vezes (inicialmente a observava-se 10^{10} UFC/mL após 6 meses 10^{9} UFC/mL). Schuh (2005) e Denardin (1997), em seus experimentos, observaram que os inoculantes líquidos a base de biopolímeros utilizando estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, apresentam-se superiores aos inoculantes turfosos. Nestas formulações, observou-se também oscilações e a queda lenta e gradual do número de células viáveis (não ultrapassando 10^{8} células/mL) após 180 dias de inoculação.

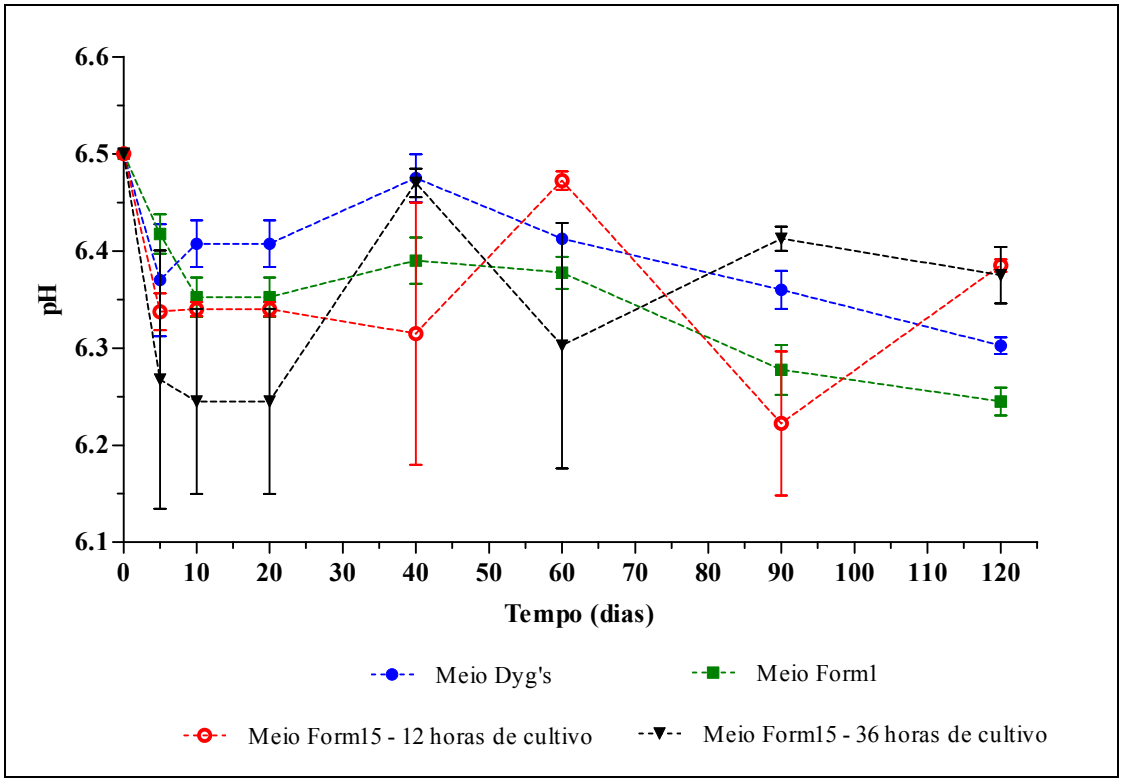
Figura 24 - Sobrevivência de *A. brasilense* AbV5 em veículo líquido.



*Média de 4 repetições.

O pH dos inoculantes a base de biopolímeros permaneceu praticamente estável durante o período de avaliação conforme pode ser observado na Figura 25.

Figura 25 - Variação de pH dos inoculantes líquidos.



*Média de 4 repetições.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

As formulações inoculantes sólidas desenvolvidas a partir de biocompósitos extrusados mostram-se eficientes na veiculação e sobrevivência de *A. brasilense* AbV5 durante os 90 dias de experimento, porém, estudos para melhorar ainda mais o desempenho destes inoculantes nestes quesitos ainda devem ser realizados, já que para a comercialização como produto agrícola a legislação do MAPA, exige um tempo de prateleira mínimo de 6 meses e que a densidade celular não seja menor que 10^8 células/mL. As mesmas considerações devem ser feitas para os inoculantes líquidos.

Como sugestões para os próximos trabalhos, além do já citado acima, podem ser realizados:

- experimentos para a otimização das formulações de meio de cultivo a partir dos dados obtidos pelo planejamento fatorial e a análise das superfícies de resposta para a obtenção de elevado número de células viáveis com menores custos;
- caracterização dos exopolissacarídeos, já que esses metabólitos são importantes para a sobrevivência microbiana;
- experimentos em campo para testar a eficiência destes produtos na produtividade das mais variadas gramíneas.

7 CONCLUSÕES

Dos experimentos e análises realizadas no presente trabalho, as seguintes conclusões puderam ser obtidas:

- Os meios Form1 e Form15 proporcionaram a produção de biomassa de *A. brasilense* AbV5 com densidade de células maiores do que 1 x 10^{10} UFC/mL, superiores à densidade de células obtida por cultivo em meio Dyg's (acima de 1 x 10^{9} UFC/mL), utilizando de processo fermentativo descontínuo por 36 horas;

- Os cultivos de *A. brasilense* AbV5 realizados nos meios Form1 e Form15 apresentaram características desejáveis para a produção de inoculantes agrícolas de alta eficiência, como elevadas concentrações de exopolissacarídeos e poli-β-hidroxibutirato;

- É viável a utilização de biocompósitos a base de amido produzidos por extrusão a quente para a veiculação de bactérias promotoras do crescimento vegetal com finalidade de uso como inoculante agrícola. Foi desenvolvida uma formulação capaz de manter a viabilidade de células de *A. brasilense* AbV5 por até 90 dias.

- As células de *A. brasilense* AbV5 veiculadas nos biocompósitos apresentam-se imobilizadas ao veículo inoculante, formando microcolônias cobertas por exopolissacarídeos;

- O método adequado para a esterilização dos biocompósitos desenvolvidos é o uso de calor seco (160 ^{o}C por 4 horas), levando em consideração a eficiência do processo de esterilização e a manutenção das propriedades físico-químicas (cor, índice de expansão, densidade e capacidade de absorção de água) dos biocompósitos;

- Dentre as 4 formulações líquidas de inoculantes testadas, a que apresentou células crescidas em meio Dyg's suportou uma maior densidade celular (10^{7}cél/mL) durante 120 dias.

REFERÊNCIAS

ABBASNEZHAD, H.; GRAY, M.R.; FOGHT, J.M. Two different mechanisms for adhesion of Gram-negative bacterium *Pseudomonas fluorescens* LP6a to an oil-water interface. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 62, 36-41, 2008.

ABNT – Associação Brasileira de normas Técnicas. NBR NM ISO 535. Papel e Cartão. Determinação da capacidade de absorção de água . Método de Cobb, 1999.

ALVES, M.M.; PEREIRA, M.A.; NOVAIS, J.M.; POLANCO, F.F.; MOTA, M. A new devide to select microcarriers for biomass immobilization: application to na anaerobic consortium. **Water Environ. Res**, v. 1, p. 209 – 217, 1999.

AMORIM, E. P. R. e MELO, I. S. Ação antagônica de rizobactérias contra Phytophthora parasítica e P. citrophthora e seu efeito no desenvolvimento de plântulas de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 24, p. 565-568, 2002.

ASH, C.; PRIEST, F.G.; COLLINS, M.D. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. **App. Environ. Microbiol.**, v. 19, p.253-260, 1993.

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI JUNIOR, W.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, 3, 2000.

BALATTI, A. P. Produccion de inoculantes para leguminosas. Facultad de Ciencias Exatas y Naturales de La Universidad Nacional de La Pampa. La Pampa, Argentina, p. 152, 1992.

BALATTI, A. P. Tecnología de las fermentaciones. In: FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; STAMFORD, N. P.; SANTOS, C. E. R. S. (Eds). Microrganismos e Agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura. Guaíba, 2008. p. 119-142.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L.; DOBEREINER, J. Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat. **Canadian Journal of Microbiology**, 29, p.924-929, 1983.

BALDANI, V.L.D.; OLIVEIRA, E.; BALOTA, E.; BALDANI, J.I.; KIRCHHOF, G. e DÖBEREINER, J. *Burkholderia brasilensis* sp. nov., uma nova espécie de bactéria diazotrófica endofítica. **An. Acad. Bras. Ci**., 69, 1997.

BARBOSA, H. R.; MORETTI, M. A.; THULER, D. S.; AUGUSTO, E. F. P. Nitrogenase activity of *Beijerinckia derxii* is preserved under adverse conditions for its growth. **Braz. J. Microbiol**., São Paulo, v. 33, 2002.

BARBOSA, H. R.; TORRES, B. B. Microbiologia básica. São Paulo: Atheneu, 1998.

BARRAQUIO, W.L.; LADHA, J.K.; WATANABE, I. Isolation and identification of N_2-fixing *Pseudomonas* associated with wetland rice. **Can. J. Microbiol.**, v. 29, p.867-873, 1983.

BARRIOS, H., B. VALDERRAMA, et al. Compilation and analysis of sigma(54)-dependent promoter sequences. **Nucleic Acids Res**., v.27 p.4305-4313, 1999.

BASHAN, Y. Alginate beads as synthetic inoculant carriers for the slow release of bacteria that affect plant growth. **Appl Environ Microbiol**, 51, p.1089-1098, 2010.

BASHAN, Y.; TREJO, A.; BASHAN, L. E. Development of two culture media for mass cultivation of *Azospirillum* spp. and for production of inoculants to enhance plant growth. **Biol. Fertil. Soils**, 47, p. 963 – 969, 2011.

BASHAN, Y., LEVANONY, H. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: Azospirillum as a challenge for agriculture. **Canadian Journal of Microbiology**, 36, p. 591-608, 1990.

BASTOS, R. G. Tecnologia das Fermentações: fundamentos de bioprocessos. São Carlos, EdUFSCar, 2010. p.160.

BELLHOUSE, B.J.; BELLHOUSE, F.H.; CURL, F.H. ; MACMILLAN, C.M.; GRUNNING, T.L.; SPRATT, A.I.; MACMURRAY, E.H.; NELANS, J.M.A. A high efficiency membrane oxygenator and pulsatile pumping system and its application to animal trials. **Trans. Am. Soc. Artif. Int. Organs**, 19, 72-79, 1973.

BOBBIO, F.O. BOBBIO, P.A. Química do processamento de alimentos. SP, Livraria Varella, 1992. p. 151.

BOUCHONNEAU, Nadège et al . Análise da absorção de água em dois polímeros expandidos: desenvolvimento do módulo de flutuabilidade de um mini-robô submarino. **Polímeros**, São Carlos, 20, 3, Sept. 2010.

BRANDL, H., GROSS, R. A., LENZ, R. W., *et al.* "Plastics from bacteria and for bacteria: poly(β-hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible, and biodegradable polyesters", ***Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology***, v. 41, pp. 77-93. 1990.

BROCKWELL, J. Manipulation of rhizobia microflora for improving legume productivity and soil fertility: a critical assessment. **Plant and Soil,** Dordrecht, 174, p.143 -180, 1995.

BUAINAIN, A. M.; SOUZA FILHO, H. M.; SILVEIRA, J. M. Inovação tecnológica na agricultura e a agricultura familiar. In: LIMA, D. M. A.; WILKINSON, J. (Orgs.). Inovação nas tradições da agricultura familiar. Brasília: CNPq/Paralelo 15, 2002. p. 47-81.

BUCK, M., M. T. GALLEGOS, et al. The bacterial enhancer-dependent sigma 54 (sigma N) transcription factor. **J.Bacteriol**., v.182, p.4129-4136. 2000.

BURDMAN, S.; JURKEVITCH, E.; SCHWARTSBURD, B.; HAMPEL, M; OKON, Y. Agregation in *Azospirillum brasilense*: effects of chemical and physical factors and involvement of extacellular components. **Microbiology**, New York, 144, p. 1989 – 1999, 1998.

BURRIS, R. H. Nitrogenases. **J. Biol. Chem**. 266, p. 9339-9342, 1991.

BUSHBY, H.V.A.; MARSHALL, K.C. Some factors affecting the survival of rootnodulebacteria on dissecation. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, 9, p. 143 - 147, 1977.

CAKMAK, I.; RÖMHELD, V. Boron deficiency-induced impairments of cellular functions in plants. **Plant and Soil**, The Hague, v. 193, n. 1/2, p. 71-83, 1997.

CÂMARA, G.M.S. Inoculação das sementes de soja. In: CÂMARA, G.M.S. Soja: tecnologia de produção. Piracicaba: [s.n.], p. 278-293, 1998.

CAMILIOS NETO, D.; PINOTTI, M. H. P. Exopolissacarídeos de cianobactérias. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, 25, p. 43-52, 2004.

CAMIRE, M. E.; CAMIRE, A.; KRUMAR, K. Chemical and nutritional changes in foods during extrusion. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 29, 1, p. 35-57, 1990.

CAPÓ, Y. Contaminación microbiana en el cultivo in vitro de plantas. In: CAPÓ, Y.; KOSKY, R.; GONZALES, E.; PERES, P. (Eds.). Propagacion y mejora genetica de plantas por biotecnologia. Santa Clara: s.n., 1998. p. 80-102.

CASTAÑEDA, A.R. Utilização de aditivos em inoculantes a base de turfa não estéril de *Bradyrhizobium japonicum* estirpe semia 587. 1989. p. 125. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1989.

CHANWAY, C.P.; SHISHIDO, M.; NAIRN, J.; JUNGWIRTH, S.; MARKHAM, J.; XIAO, G. e HOLL; F.G. Endophytic colonization and field responses of hybrid spruce seedlings after inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria. **For. Ecol. Manag**., 133:81-88, 2000.

CHEFTEL, J. C. Nutritional effects of extrusion cooking**. Food Chemistry**, 20, 4. p. 263-283, 1986.

CHEN, J., SERAFIN, F. L., PANDYA, R.N. e DAUN, H. Effects of extrusion conditions on sensory properties of corn meal extrudates. **Journal of Food Science**, Chicago, 56, p. 84-89, 1991.

CHINNASWANNY, R. e HANNA, M. A. Optimum extrusioncooking conditons for maximum expansion of corn starch. **Journal of Food Science**, Chicago, 53, 3, p. 834- 836, 840, 1988.

COTTRELL, I.W.; KANG, K. S. Xanthan gum, a unique bacterial polysaccharide for food applications. **Developments in Industrial Microbiology**, Amsterdam, 19, p.117 -131, 1978.

COVIZZI, L. G. Seleção de um suporte sintético para imobilizar células do *Botryosphaeria rhodina* e comparação da produção de lacase por células livres e imobilizadas. 2007. p. 82. Dissertação de Mestrado. Universidade de Estadual São Paulo, São José do Rio Preto, 2007.

CUQ, B.; GONTARD, N.; GUILBERT, S. Thermal properties of fish myofibrillar protein-based films as affected by moisture content. Polymer. 38, p. 2399-2405, 1996.

DATE, R.A. Advances in inoculant technology – a brief review. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, 41, p. 321-325, 2001.

DAVIES, G.; CHAKRABARTY, A. M.; GEESEY, G. G. Exopolysaccharide production in biofilms: substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa*, **Applied Environmental Microbiology**, 59, p. 1181-1186, 1993.

DEBIAGI, F.; MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; YAMASHITA, F. Efeito de fibras vegetais nas propriedades de compósitos biodegradáveis de amido de mandioca produzidos via extrusão. Ciência e Agrotecnologia, Lavras, 34, p. 1522-1529, 2010.

DEL GALLO, M., FENDRIK, I. The rhizosphere and *Azospirillum*. In: Okon, Y. (Ed.). Azospirillum plant association. **CGC Critical Reviews in Plant Science**. Boca Raton. p. 57-75, 1994.

DEY, R., PAL, K.K., BHATT, D.M. e CHAUHAN, S.M. Growth promotion and yield enhancement of peanut (Arachis hypogaea L.) by application of plant growthpromoting rhizobacteria. **Microbiological Research**, 159, p. 371-394, 2004.

DIAS, J. M. C. S. Cultivo de *Azospirillum brasiliense* Sp 245 em frutose ou glicerol como fontes de carbono para produção de inoculantes agrícolas. 1988. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 1988.

DIXON, R. E D. KAHN. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nat. Rev. Microbiol**., v.2, p.621-631. 2004.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Science**, 22, p. 107-149, 2003.

DÖBEREINER, J. Nitrogen-fixing bacteria of the genus *Beijerinckia* Derx in the rhizosphere of sugarcane. **Plant and Soil**, v. 15, p. 211-216, 1961

DOBEREINER, J., 1992. Nitrogen Fixation in Association with Grasses. In: Soil Microbiology, Cardoso, E.J.B.N., S.M. Tsai and M.C.P. Neves (Eds.). SBCS, Campinas, Brazil, pp: 173-180.

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

DOBEREINER, J. e ALVAHYDO, R. Sobre a influência da cana-de- açúcar na ocorrência de "Beijerinckia" no solo. II. Influência das diversas partes do vegetal. **Rev. Bras. Biol.** 19, p. 401-412, 1959.

DÖBEREINER, J. A importância da fixação biológica de nitrogênio para a agricultura sustentável. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento** - Encarte especial, 1, 2-3, 1997.

DÖBEREINER, J., PEDROSA, F.O. Nitrogen - Fixing Bacteria in Non leguminous. **Crop Plants**. Springer-Verlag, New York, 1987.

DUBOIS, M. GILLES, K. A. , HAMILTON, J. K. , REBERS, P. A. , SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analitical Chemistry**, 28, 3, p.350-356, 1956.

EADY, R. R.; J. **Inorg. Biochem**. 86, 42, 2001.

EGORENKOVA, I.V., KONNOVA, S.A., FEDONENKO, YU.P., DYKMAN, L.A., AND IGNATOV, V.V. The Role of the Polysaccharide-containing Capsular Components of *Azospirillum brasilense* in Bacterial Adsorption on Wheat Seedling Roots, **Mikrobiologiya**, 70, 1, p. 45–50, 2001.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A.J. Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas. Londrina: Editora Planta, 2006.

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

FARHAT, I.A.; BLANSHARD, J.M.V. - **Carbohydrate Polymers**., 34, p.263, 1997.

FENG, L.; ROUGHLEY, R. J.; COPELAND, L. Morphological changes of rhizobia in peat cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, 68, p. 1064-1070, 2002.

FERREIRA, Joilson Silva; BALDANI, José Ivo; BALDANI, Vera Lúcia Divan. Seleção de inoculantes à base de turfa contendo bactérias diazotróficas em duas variedades de arroz. **Acta Sci., Agron. (Online)**, Maringá, v. 32, n. 1, Mar. 2010.

GACESA, P. P. Bacterial alginate biosynthesis: recent progress and prospects. **Microbiology**, v. 144, p. 1133-1143, 1998.

GARCIA-GONZÁLES, M.; MATEO, P.; BONILLA, I. Effect of boron deficiency on photosynthesis and reductant sources and their relationship with nitrogenase activity in Anabaema PCC7119. **Plant Physiology**, Rockville, v. 93, p. 560-565, 1990.

GLENN, G.M.; ORTS, W.J.; NOBES, G.A.R. Starch, fiber and CaCO3 effects on the physical properties of foams made by a baking process. **Industrial Crops and Products.** v. 14, p. 201-212, 2001.

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

GUJSKA, E.; KHAN, K. Functional properties of extrudates from high starch fractions of navy and pinto beans and corn meal blended with legume high protein fractions. **Journal of Food Science**, Chicago, 56, p. 431-435, 1991.

GUTKOSKI, L.C.; EL-DASH, A.A. Effect of extrusion process variables on physical and chemical properties of extruded oat products. **Plant foods for human nutrition**, Amsterdam, 54, p.315-325, 1999.

HAAHTELA, K; WAARTIOVAARA, T; SUNDMAN, V e SKUJINS, J. Root-associated N_2 fixation by *Enterobacteriaceae* and *Azospirillum* strains in cold climate spodosols. Applied and Environmental Microbiology, Washington, 41, p. 203-206, 1981.

HARPER, J. M. Extrusion of Food. Boca Raton: CRC Press, 1, p. 212, 1981.

HARPER, J. M. Extrusion texturization of foods. **Food Technology**, Chicago, p. 70-76, 1986.

HARTMANN, A.; BURRIS, R. H. Regulation of nitrogenase activity by ammonium chloride in *Azospirillum* spp. **Journal of Bacteriology**, Washington, 165, p. 864-870, 1987.

HEILDINGERS,. , BRAUN,V ., PECORAROV, . L. & RAYMONDK,. N. Iron supply to *Escherichia coli* by synthetic analog of enterobactin. **Journal of Bacteriology.** 153, 109- 115. 1983.

HUNGRIA, M. The importance of nitrogen fixation to soybean cropping in South America. In: WERNER, D. e NEWTON, W. (Eds). Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology, and the environment. Dordrecht, Springer, 2005. p. 25-42.

HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S,; COLOZZI FILHO, A.; BALOTA, E.L. e SANTOS, J.C. Ecologia microbiana em solos sob cultivo na região sul do Brasil. In: HUNGRIA, M.; BALOTA, E.L.; COLOZZI-FILHO, A. e ANDRADE, D.S., eds. Microbiologia do solo: Desafios para o século XXI. Londrina, IAPAR/EMBRAPA-CNPSo, 1995. p.234-270.

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

IGARASHI, R. Y. E L. C. SEEFELDT. Nitrogen fixation: the mechanism of the Mo-dependent nitrogenase. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.**, 38, p.351-384, 2003.

IPT. Relatório Técnico Parcial 23.210. Desenvolvimento de tecnologia para a produção industrial de inoculantes – Rhizobium spp. p. 102, 1995.

IPT. Relatório Técnico Parcial 30.989/93. Estudo da produção e utilização de inoculante para fixação biológica de nitrogênio em feijão, p. 60, 1993.
http://jornalagricola.wordpress.com/2007/07/16/nitrogenio-n/

KARAM, L.B.; GROSSMANN, M.V.E.; SILVA, R.S.F. Misturas de farinha de aveia e amido de milho com alto teor de amilopectina para produção de "snacks". **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 21, 2001.

KEYA, S.O.; ALEXANDER, M. Regulation of parasitism by host density; the *Bdellovibrio-Rhizobium* interrlationship. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, 7, p.231-237, 1975.

KHAMMAS, K. M., AGERON, E., GRIMONT, P. A. D. e KAISER, P. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. **Res Microbiol** 140, 679–693, 1989.

KLOEPPER, J.W. Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. In: METTING, F.B., ed. Soil microbial ecology. New York, Marcel Dekker, 1993. p.255-274.

KOKINI, J. L. The effect of processing history on chemical changes in single- and twin-screw extruders. **Trends in Food Science and Technology**, 4, 10, p. 324-329, 1993.

KONING, C.; VAN DUIN, M.; PAGNOULLE, C.; JEROME, R. Strategies for compatibilization of polymer blends. **Progress in Polymer Science**, Oxford, 23, p. 707-757, 1998.

KUMARESAN, G. & REETHA, G. Survival of *Azospirillum brasilense* in liquid formulation amended with different chemical additives. **Journal of Phytology**, UAE, 3, nov. 2011.

LADHA, J.K.; BARRAQUIO, W.L.; WATANABE, I. Isolation and identification of nitrogen-fixing *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella planticola* associated with rice plants. **Can. J. Microbiol.**, v. 29, p. 1301-1308, 1983

LE TACON, F.; JUNG, G.; MUGNIER, J.; MICHELOT, P. Efficacité en pépiniére forestière d'un inoculum de champignon ectomycorhizien produit en fermenteur et inclus dans une matrice de polymères. **Annual Science**, 40, p. 165-176, 1983.

LEHNINGER, N. D; Cox, M.M. Princípios de Bioquímica. Quarta edição. São Paulo: Sarvier, 2006.

LEWIS K. Riddle of biofilm resistance, Antimicrob. **Agents Chemother**. 45, p. 999–1007, 2001.

LEWIS, M. J. Propiedades físicas de los alimentos y de los sistemas de procesado. Zaragosa: Acribia, 1993. 494 p.

LIMA, U.A. Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos. São Paulo, Blucher, 2001. p. 593.

LITTER, M. Farmacologia. 3 ed. Buenos Aires, El Ateneo, 1964, p.1495.

LOH, W. H. T., C. I. RANDLES, W. R. SHARP, AND R. H. MILLER.Intermediary carbon metabolism of Azospirillum brasilense. **J. Bacteriol.** 158, p.264-268. 1984.

LUGTENBERG, B. e KAMILOVA, F. Plant-growth-promoting rhizobacteria. **Annual Review of Microbiology**, 63, p. 541-556, 2009.

LUSTOSA, B.H.B.; LEONEL, M.; MISCHAN, M.M. Efeito de parâmetros operacionais na produção de biscoitos extrusados de farinha de mandioca. **Brazilian Journal of Food Technology,** Campinas, 11, p.12-19, 2008.

MADIGAN, T. M.; MARTINKO, M. J.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. Microbiologia de Brock. 12 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 531.

MANO, E. B. Polímeros como materiais de engenharia. 3º edição:São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 2000.

MARSHALL, K.C., Eletrophoretic properties of fast and slow-growing species of *Rhizobium*. **Australian Journal of Biological Science**. 20, p. 429-439, 1967.

MARTINEZ-ARGUDO, I., R. LITTLE, et al. The NifL-NifA System: a multidomain transcriptional regulatory complex that integrates environmental signals. **J.Bacteriol**., v.186, p.601-610. 2004.

MARTINEZ-DRETS, G., M. DEL GALLO, C. L. BURPEE, AND R. H. BURRIS. Catabolism of carbohydrates and organic acids by the Azospirilla. J. Bacteriol. 159, p.80-85. 1984.

MATHEWS, C. K.; VAN HOLDE, K. E.; AHERN, K. G. Bioquímica. Madri, Pearson Education S.A., 2002.

McCLUNG, C.R.; PATRIQUIN, D.G. Isolation of a nitrogen fixing *Campylobacter* species from the roots of *Spartina alterniflora* Loisel. **Can. J. Microbiol.**, v. 26, p.881-886, 1980

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

MEDEIROS, M. B.; ALVES, S. B.; BERZAGHI, L. M. Effect of liquid biofertilizer on fecundity and survival of *Tetranychus urticae*. **Journal of Animal, Plant and Environmental Protection.** 68, p.66, 2001.

MELO, I.S. Rizobactérias promotoras de crescimento em plantas: descrição e potencial de uso na agricultura. In Ecologia microbiana (I.S. Melo & J.L. Azevedo, coords.). Editora Embrapa, CNPMA, Jaguariúna p.117-137, 1998.

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

MERCIER, C. e FEILLET, P. Modification of carbohydrate components by extrusion-cooking of cereal products. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, 52, 3, p. 283-297, 1975.

MILLER, G. Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, 31, p. 426-428. 1959.

MILLER, R.C. Extrusion cooking of pet foods**. Cereal Foods World**, Saint Paul, 30, p. 323-327. 1985.

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

MUGNIER, J.; JUNG, G. Survival of bacteria and fungi in relation to water activity and the solvent properties of water in biopolymer. **Applied and Enviromental Microbiology**, Washington, 50, p. 108 - 114, 1985.

NOVAK, J. From laboratory to applications: challenges and progress with in vitro dual culture of potato and beneficial bacteria. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 52, p. 97-103, 1998.

OKON, Y., LABANDERA-GONZALEZ, C. A. (1994): Agronomic applications of *Azospirillum*: An evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biol. Biochem.** , 26, 1591–1601, 1994.

OLIVEIRA, A.L.M.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J.; BALDANI, J.I. The effect of inoculating endophytic N_2-fixing bacteria on micro-propagated sugarcane plants. **Plant and Soil.** 24, 205 - 215, 2002.

PANDEY, P.; MAHESHWARI, D.K. Bioformulation of *Burkholderia* sp. MSSP with a multispecies consortium for growth promotion of Cajanus cajan. **Canadian Journal of Microbiology**, v.53, p.213‑222, 2007.

PARKER, A.; GUNNING. P.A.; ROBINS, M.M. How does xanthan stabilize salad dressing ? **Food Hydrocolloids**, Oxford, 9, p. 33 - 342, 1995.

PELCZAR, M., REID, R. Microbiología. Ciudad Del Mexico, McGraw-Hill, 1978. p. 664.

POLICARPO, V. M. N. et al. Green umbu (Spondias Tuberosa Arr. Cam.) preserve: physical, chemical and microbiological changes during storage. **Journal of Food Processing and Preservation**, 31, 2, p. 201-210, 2007.

POTHAN, L A, THOMAS, S, Effect of hybridization and chemical modification on the water-absorption behavior of banana fiber-reinforced polyester composites, **Journal of Applied Polymer Science**, vol. 91, p.3856-3865, 2004.

PRADELLA, J. G. C.; ZUCCOLO, M.; LOPES, S.A.R; OLIVEIRA, M.S. Pisolithus tinctorius vegetative myceli production: effects of nitrogen sources and cultivation in stirred tank fermenter. **Revista de Microbiologia**, 22, p. 7-11, 1990.

PRASAD, K. K.; MOHAN, S. V.; BHASKAR, Y. V.; RAMANAIAH, S. V.; BABU, V. L.; PATI, B. R.; SARMA, P. N. Laccase production using *Pleurotus ostreatus* 1804 immobilized on PUF cubes in batch and packed bed reactors: influence of culture conditions. **Journal of Microbiology**, v. 43, p. 301-307, 2005.

RADWAN, T., EL-S., EL-D.; MOHAMED, Z., K.; REIS, V. M. Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* em plântulas de milho e arroz. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, 39, 10, p. 987-994, 2004.

RAJKUMAR, T. V., B. M. WOODFIN, AND W. J. RUTTER. Aldolase B from (adult) rabbit liver. **Methods Enzymol**. 9. p.491-498. 1966.

REHDER, D.; J. **Inorg. Biochem**. 133, 2000.

POT, B., GILLIS, M., KERSTERS, K., THIELEMANS, S. e DE LEY, J. *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogen fixing organism associated with roots of kallar grass (Leptochloa fusca (L.) Kunth). **Int J Syst Bacteriol** 37, 43–51, 1987.

RENNIE, R. J. Dinitrogen-fixing bacteria: computer-assisted identification of soil isolates. **Canadian Journal of Microbiology**, 26, p.1275-1283. 1980.

RIBBE, M.; GADKARI, D.; MEYER, O.; **J. Biol. Chem**. 272, 26627, 1997.

RISSI, L. Produção experimental de inoculantes agrícolas a base de Azospirillum spp. para fixação biológica de Nitrogênio em gramíneas e forrageiras. 2006. p. 137. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

ROCKLAND, L.B. Saturated salt solutions for static control of relative humidity between 5° C and 40° C. **Analytical Chemistry**, 32, p. 1375-1376, 1960.

ROJAS, D. F., GARRIDO, M. F., BONILLA, R. R. Estandarización de um médio de cultivo complejo para La multiplicación de La cepa C50 de *Rhizobium* sp. **Revista Corpoica – Ciencia y tecnologia agropecuária**, 10, p. 70-80, 2009.

ROMANI, V.L. 1989. Otimização de condições para produção de inoculante de alta qualidade para feijão (Phaseolus vulgaris L.). Tese de doutorado. ESALQ, Piracicaba-SP, 166p.

ROUGHLEY, RJ. Legume inoculants: their technology and application. In: salad dressing ? **Food Hydrocolloids**, Oxford, 9, p. 33 - 342, 1995.

SANGKHARAK, K. and PRASERTSAN, P. Nutrient optimization for production of polyhydroxybutyrate from halotolerant photosynthetic bacteria cultivated under aerobic-dark condition. **Electronic Journal of Biotechnology**, 3, 2008.

SANTOS, O.J.A.P. Eficiência de metodologias para inoculação de bactérias promotoras do crescimento vegetal em milho. 2011. p.38. TCC. Universidade Estadual de Londrina, Paraná, 2011.

SCHMIDT, V. C. R.; LAURINDO, J. B. Characterization of Foams Obtained from Cassava Starch, Cellulose Fibres and Dolomitic Limestone by a Thermopressing Process. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 53, Nº 1, p185-192, 2010.

SHOGREN, R. L.; LAWTON, J. W.; DOANNE, W. M.; TIEFENBACHER, F. K. Structure and morphology of baked starch foams. **Polymer**. 39, p. 6649-6655, 1998.

SIESS, M. H. AND DIVIES, C. European **J. Appl. Microbiol. Biotechnol**. 12, 10-15, 1981.

SILVA, M. F.; OLIVEIRA, P. J.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G.; REIS, V. M. Inoculantes formulados com polímeros e bactérias endofíticas para a cultura da cana-de-açúcar. Pesq. agropec. bras., Brasília, 44, p.1437-1443, 2009.

SJÖQVIST, M.; BOLDIZAR, A.; RIGDAHL, M. Processing and Water Absorption Behaviour of Foamed Potato Starch. **Journal of Cellular Plastics**. P.1-22, 2010.

SOUZA, R. C. R.; ANDRADE, C. T. Investigação dos processos de gelatinização e extrusão de amido de milho. **Polímeros**, São Carlos, 10, 2000.

SOUZA, F.B.M. Caracterização de Cerâmicas Porosas de Alumina Reforçadas com Zircônia Produzidas pelo Método da Réplica. 2008. p.66 . Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte, 2008.

SRINATH, J., BAGYARAJ, D.J. e SATYANARAYANA, B.N. Enhanced growth and nutrition of micropropagated *Ficus benjamina* to *Glomus mosseae* co-inoculated with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus coagulans*.**World Journal of Microbiology e Biotechnology**, 19, p. 69-72, 2003.

STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J. (1992) **Biological Nitrogen Fixation**. New York, Chapman and Hall, 943p

STEENHOUDT, O. E J. VANDERLEYDEN. Azospirillum, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiol.Rev**., v.24, p.487-506. 2000.

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

TRIVEDI, P.; PANDEY, A.; PALNI, L. M. S. Carrier-based preparations of plant growth-promoting bacterial inoculants suitable for use in cooler regions. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 21, p. 941-945, 2005.

TSUJI K, LIJIMA M, MATSUZAWA H, SAKAMOTO S. Over-production of Thermus protease in dense culture of Escherichia coli using two carbon sources. **Biothecnology Techniques**, 11, p. 395-398, 1997.

UBBINK, J., e SCHAR-ZAMMARETTI, P. Colloidal properties and specific interactions of bacterial surfaces. **Current Opinion in Colloid e Interface Science**, 12, 263–270, 2007.

VAN ELSAS, J. D. E; HEIJNEN, C. E. Methods for the introduction of bacteria into soil: a review. **Biology and Fertility of Soils**, 10, p. 127-133, 1990.

VENDAN, R. T.; THANGARAJU, M. Development and standardization of liquid formulation for *Azospirillum* bioinoculant. **Indian Journal of microbiology**, 46, p. 379-387, 2007.

VILELA, E. R. e EL-DASH, A. A. Extrusão de farinha de gandu (Cajanus cajan, Mill sp.). I. Efeitos das variáveis do processo nas características químicas, físicas e físico-químicas dos produtos extrusados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 7, p. 97-116, 1987.

WELLER, D.M. Biological control of soilborne plant pathogens in the rizosphere with bacteria. **Annual Review of Phytopatology**, Palo Alto, v. 26, p. 379-407, 1988.

WESTBY, C. A.; CUTSHALL, D.S.; VIGIL, G.V. Metabolism of various carbon sources by *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology,** 156, p. 1369–1372.

http://www.agricultura.gov.br/legislacao. (Acessado 2010).

http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/milho (Acessado 07/12/2011).

http://www.agriculura.gov.br/vegetal/culturas/trigo (Acessado 07/12/2011).

http://www.anda.org.br/estatisticas.aspx. (Acessado 14/06/2010).

http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2009/agosto/1a-semana/embrapa-e-ufpr-desenvolvem-primeiro-inoculante-para-milho-e-trigo (Acessado 05/12/2011).

http://www.ibge.gov.br/home/ (Acessado 01/12/2010).

http://www.valefertilizantes.com/mda/modulos/conteudo/relInvestidores/fispq/docs/FISPQ_NH4NO3_%20NITRATO%20DE%20AM%C3%94NIO%20-%20ULTRAPRILL.pdf (Acessado 06/03/2012).

ANEXOS

ANEXO A

Meio DYG'S

Composição	g/L
Dextrose	2
Peptona Bacteriológica	1,5
Monoidrogenofosfato de potássio (K_2HPO_4)	0,5
Extrato de Levedura	2
Sulfato de magnésio heptaidratado ($MgSO_4 . 7 H_2O$)	0,5

Ajustar o pH para 7,0, adicionando HCl 1 mol/L para acidificar o meio e NaOH 1 mol/L para elevar o pH;

Adicionar água destilada q.s.p. 1 litro de solução.

*No caso de meio sólido, deve-se adicionar 15 g de ágar.

ANEXO B

Solução de micronutrientes para A.brasilense

Composição	g/L
Molibdato de sódio diidratado (Na_2MoO_4. $2H_2O$)	1
Sulfato de manganês diidratado ($MnSO_4$. H_2O)	1,18
Ácido Bórico (H_3BO_3)	1,4
Sulfato de cobre pentaidratado ($CuSO_4$. $5H_2O$)	0,04
Sulfato de zinco heptaidratado ($ZnSO_4$. $7H_2O$)	1,2

Adicionar água destilada q.s.p. 1 litro de solução.

ANEXO C

Solução de FeEDTA

Composição	g/L
EDTA dissódico (Na_2H_2EDTA)	1,2
Cloreto férrico hexaidratado (FeCl3. 6H2O)	0,6

Adicionar água destilada q.s.p. 0,1 litro de solução.

ANEXO D

Solução salina 0,9% (m/V)

Composição	g/L
Cloreto de Sódio (NaCl)	0,9
Tween-80	0,01

Adicionar água destilada q.s.p. 0,1 litro de solução.

ANEXO E

Pedido de patente

FORMULÁRIO DE DECLARAÇÃO DE INVENÇÃO

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

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

AINTEC/UEL

Escritório de Propriedade Intelectual – EPI

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

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

Havendo dúvidas no preenchimento da FDI contate o EPI da Aintec

pelo e-mail: aintecepi@uel.br

1. INFORMAÇÃO PESSOAL	
Nome para contato: ANDRÉ LUIZ MARTINEZ DE OLIVEIRA	
Depto. na UEL./Empresa: CCE/BBTec	
Tel: (43) 33714270	**e-mail: almoliva@uel.br**

2. TÍTULO PROPOSTO PARA A INVENÇÃO: MÉTODO DE PREPARO DE UM BIOCOMPÓSITO PARA A IMOBILIZAÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL PARA USO COMO INOCULANTE EM CULTIVOS AGRÍCOLAS.

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

4. CAMPO DA INVENÇÃO. ESTA INVENÇÃO DIZ RESPEITO FUNDAMENTALMENTE A: (máximo 3 linhas). A presente invenção refere-se a um sistema de veiculação de bactérias promotoras do crescimento vegetal, dito inoculante, constituído por um biocompósito obtido pelo processo de extrusão a quente a partir de biopolímeros e nutrientes minerais.

5. ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

5.1. Descreva o problema ou desafio técnico que a presente invenção se propõe a solucionar: A agricultura brasileira possui importância na garantia da segurança alimentar mundial, sendo voraz no consumo de fertilizantes e outros insumos químicos. A produção, comercialização e distribuição destes insumos onera o produtor agrícola e contribui significativamente para a definição dos custos de produção e consequentemente para o custo final dos produtos agrícolas. Além disso, existe uma correlação direta entre o custo dos insumos agrícolas industrializados e o preço do petróleo e seus derivados. O cenário atual da agricultura apresenta-se em transição, na busca de novas estratégias de produção capazes de diminuir a dependência de insumos químicos, e aliada à garantia de manutenção e/ou do aumento dos parâmetros atuais de produtividade, necessários para prover a crescente demanda mundial por produtos agrícolas. Uma das alternativas que se apresenta a este cenário é o desenvolvimento de tecnologias fundamentadas em interações benéficas entre as diferentes espécies agrícolas cultivadas e micro-organismos pertencentes a grupos taxonômicos distintos, os quais favorecem o desenvolvimento vegetal provendo completa ou parcialmente a necessidade nutricional das culturas, ou a sua proteção contra estresses bióticos e abióticos.

A tecnologia de inoculação de cultivos comerciais com bactérias promotoras do

crescimento vegetal ainda é subaproveitada no Brasil, e está longe de ter todo o seu potencial utilizado pelo setor agropecuário nacional. A utilização de inoculantes microbianos em cultivos comerciais no Brasil fundamenta-se majoritariamente na relação rizóbio-soja, onde trabalhos de melhoramento de cultivares e seleção de estirpes microbianas levaram à eliminação do uso de fertilizantes nitrogenados na sojicultura. Entretanto pesquisas realizadas em todo o mundo demonstram o uso potencial de micro-organismos para o fornecimento de nitrogênio, fósforo, a proteção dos cultivos contra fungos fitopatogênicos, para as mais importantes espécies agrícolas. Estes micro-organismos são geralmente denominados de **Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal** (BPCV), e não formam associações simbióticas clássicas como observadas entre os pares rizóbio-leguminosa. BPCVs em geral colonizam a rizosfera, a superfície de diferentes tecidos vegetais (raízes, folhas), ou podem habitar tecidos internos das plantas às quais se associam (ambiente endofítico). A localização específica de uma BPCV sobre sua hospedeira é dependente de fatores ainda pouco conhecidos, entretanto dependente de compatibilidade genótipo-genótipo (BPCV-hospedeira) e fatores edafoclimáticos. As técnicas desenvolvidas para a inoculação de BPCVs em plantas não-leguminosas derivam do conhecimento adquirido para a inoculação de rizóbios em leguminosas. A capacidade de colonização destas BPCVs inoculadas depende em parte de sua sobrevivência em elevadas populações junto ao propágulo vegetal, até que este último se desenvolva e proporcione as condições necessárias para uma associação eficiente.

Diversos fatores influenciam a ocorrência de uma associação eficiente entre os microrganismos promotores do crescimento vegetal e seus respectivos hospedeiros. A heterogeneidade e variabilidade, encontrada nos diferentes ambientes agrícolas, dificultam a colonização e o estabelecimento de bactérias exóticas, que devem competir com microrganismos nativos, portanto melhor adaptados, além de sobreviver ao ataque de outros organismos predadores. Esta variabilidade na capacidade de estabelecimento de uma estirpe inoculante depende do tipo de solo e sua microbiota nativa, das espécies vegetais presentes, da densidade de inóculo e das condições edafoclimáticas. Tais fatores atuam no declínio progressivo da densidade populacional dos microrganismos introduzidos, e podem levar ao insucesso na elicitação das respostas pretendidas (Kim et al, 1997; Bashan, 1998; O'Callaghan et al., 2001; Strigul e Kravchenko, 2006). Os métodos utilizados para a identificação da compatibilidade entre pares associativos ainda são empiricamente determinados através de ensaios de inoculação, aonde são estudadas principalmente as variáveis agronômicas, em detrimento das microbiológicas e ambientais. Neste contexto, o desenvolvimento de formulações inoculantes para a veiculação de BPCVs que favoreçam a sobrevivência dos micro-organismos selecionados em elevada densidade sob condições de campo, que apresentem um tempo de

armazenamento prolongado e proteção contra os fatores deletérios do solo, associando ainda baixo custo e facilidade de produção com o uso de materiais renováveis e biodegradáveis, pode aumentar a eficiência desta tecnologia em cultivos comerciais (Bashan et al., 2008).

5.2. Descreva as conhecidas soluções já existentes ao problema ou desafio, seus limites e deficiências: Os inoculantes comercializados no Brasil são produzidos a partir de estirpes que apresentam elevada eficiência econômica, basicamente em duas formulações: inoculantes líquidos e inoculantes turfosos. Este mercado de inoculantes é bastante seletivo, concentrando cerca de 99% das doses comercializadas para a cultura da soja em formulações líquidas (MAPA). Historicamente as formulações inoculantes vem sendo preparadas em veículos sólidos, basicamente a partir da turfa. A turfa é um material escuro, esponjoso, formado pela decomposição anaeróbica lenta de restos vegetais de diferentes origens e em diferentes estádios de decomposição, apresentando mais de 90% de matéria orgânica em sua composição. A sua produção comercial ocorre através da extração em jazidas turfosas, sendo que a composição química da turfa extraída pode ser bastante variável. É portanto um produto oriundo de fonte não renovável, e que requer tratamento prévio ao uso como veículo carreador de células microbianas com finalidade de uso como inoculante agrícola. Por outro lado, os inoculantes líquidos apresentam problemas de transporte e armazenamento, além de existirem evidências sobre a ocorrência de baixa eficiência destas formulações em certas condições edafoclimáticas, como as encontradas no cerrado brasileiro, por exemplo (Hungria et al., 2005).

Uma das estratégias mais recorrentes apresentadas como alternativa ao uso de inoculantes líquidos e turfosos é o uso de misturas poliméricas. Dentre os biopolímeros apresentados, estão carboximetilcelulose, alginato, e amido. Estes polímeros são utilizados para a formação de microcápsulas utilizando diferentes processos, incluindo a extrusão a frio. A imobilização de células microbianas em uma matriz polimérica apresenta vantagens consideráveis sobre a inoculação direta no solo ou nas sementes, entretanto alguns fatores devem ser considerados, principalmente aqueles relacionados ao custo da formulação (Bashan et al., 2008). O principal objetivo a ser alcançado pela encapsulação de PGPB, é a proteção das células de um ambiente desfavorável como o solo, reduzindo a predação e a competição com os microrganismos nativos, promovendo sua liberação gradual e contínua, facilitando assim a colonização das raízes das plantas cultivadas (Bashan, 1986; Young et al., 2006). Desta forma, ao se buscar o desenvolvimento de um novo veículo inoculante, é necessário considerar a sua funcionalidade para diferentes espécies microbianas, buscando materiais de baixo custo e obtidos de fontes renováveis, que não apresentem toxidez ao ser humano e ao meio

ambiente, biodegradável, apresentar eficiência e versatilidade para diferentes condições de solo e clima, podendo ser transportado e armazenado sob temperatura ambiente.

Uma das formas de se alcançar o desenvolvimento de uma formulação inoculante próxima do ideal é a utilização de misturas de materiais, pela baixa probabilidade de encontrar todas as características desejáveis em uma única substância. A mistura em proporções adequadas de diferentes materiais que possam apresentar propriedades aditivas, quando às características desejáveis em uma formulação inoculante, pode levar ao desenvolvimento de um produto de baixo custo, cujas propriedades sinérgicas das substâncias participantes da mistura levem a uma maior eficiência funcional ao produto, e conseqüentemente a melhoria dos efeitos promotores do crescimento vegetal pelo uso de insumos microbianos (van Elsas e Heijnen, 1990). Entretanto, a utilização de diferentes substâncias para a produção de uma mistura homogênea apresenta algumas dificuldades. Moléculas de elevado peso molecular, ou com características contrastantes quanto à solubilidade em água, tendem a ser imiscíveis, o que pode resultar na instabilidade da mistura obtida. A utilização de tecnologias ou processos que permitam a compatibilização de diferentes substâncias em uma mistura homogênea, apresentando características diferentes das observadas para os componentes da mistura separadamente, pode possibilitar a produção de misturas estáveis e adequadas à utilização como veículo inoculante direcionado ao ambiente agrícola.

5.3. Descreva como sua invenção supera estes limites e deficiências, destacando suas vantagens e ganhos: Entre as estratégias para a compatibilização de misturas complexas está o processo de extrusão de materiais sólidos a alta temperatura. Algumas vantagens podem ser obtidas através do processo de extrusão à quente (Chokshi e Zia, 2004), como a obtenção de um material de composição homogênea, a partir de substâncias que dificultam a reticulação de polímeros biológicos. Este processo vem sendo aplicado com sucesso na obtenção de espumas biodegradáveis produzidas a partir de amido, com aplicações direcionadas à substituição de derivados de petróleo (Chiellini et al., 2009). A aplicação de polímeros biodegradáveis com base no amido possui entretanto aplicação restrita, devido à elevada capacidade de interação deste polissacarídeo com moléculas de água, que enfraquecem e deterioram as propriedades funcionais destes materiais. A utilização de materiais de reforço como fibras vegetais, minerais na fração argila, glicerol entre outros vem demonstrando um grande potencial para a melhoria das propriedades funcionais das espumas biodegradáveis baseadas no amido obtidas por extrusão (Mali et al., 2010). O processo industrial de moldagem por extrusão a quente possibilita assim a produção de misturas estáveis contendo fibras vegetais (cana-de-açúcar), glicerol, amido, pó de rocha, óleos vegetais e outras substâncias, que podem ser exploradas na obtenção de uma matriz para a imobilização de micro-organismos promotores do crescimento de

plantas, servindo como veículo inoculante de alta eficiência. O veículo inoculante assim obtido pode ainda ser adicionado de micronutrientes e outros fatores nutricionais que possam levar ao aumento da produtividade das plantas tratadas com tal mistura polimérica inoculante.

Diferentemente dos processos de imobilização de micro-organismos inoculantes em matrizes de alginato e carboximetilcelulose, a utilização de um compósito obtido pelo processo de extrusão não se caracteriza como um veículo inerte para a entrega de micro-organismos selecionados em um ambiente agrícola. A utilização de materiais de fácil decomposição como o amido, glicerol e sacarose, em uma formulação para a imobilização de células bacterianas promove a multiplicação celular dos micro-organismos veiculados quando condições adequadas de umidade são disponibilizadas, essencialmente quando de seu uso em campo agrícola. A formulação biocompósito proporciona a estabilidade e viabilidade das células bacterianas imobilizadas nesta matriz previamente ao seu uso como inoculante, e oferece uma fonte de nutrientes que favorecem a pronta proliferação das células veiculadas quando aplicado como inoculante agrícola, aumentando a eficiência da inoculação e diminuindo a necessidade de aplicação de fertilizantes. A densidade de células viáveis por unidade de peso da formulação biocompósito é diminuída em 1000 vezes em comparação à turfa, o veículo sólido mais utilizado em formulações inoculantes agrícolas, sem diminuir a eficiência da inoculação, uma vez que ocorre a proliferação de células bacterianas após a introdução do inoculante no ambiente de cultivo. O uso do processo de extrusão a quente para a formação de um veículo que imobilize as células da estirpe inoculante, favorecendo a sua sobrevivência junto à planta hospedeira e consequentemente aumentando a eficiência da inoculação com BPCV, não foi ainda descrito na literatura.

6. DESCRIÇÃO DETALHADA

6.1. Descreva detalhadamente a invenção de forma que um técnico ou pessoa com conhecimento técnico no assunto consiga reproduzi-la: O biocompósito descrito abaixo foi obtido a partir da mistura dos seguintes materiais:

- 76 g de amido de mandioca para alimentação (polvilho azedo);
- 10 g de glicerol;
- 30 g de bagacilho de cana-de-açúcar, seco em estufa a 60° C por 24 horas, e peneirado em tamis de malha 0,69.
- 10 g Fosfato de rocha (ou pó de basalto);
- 2 g de açúcar cristal para alimentação,
- 1 g de leite em pó desnatado;
- 5 g de extrato de levedura;
- 11,7 mL de solução de K_2HPO_4 1,0 M, pH = 7,0.

Para o preparo da formulação, primeiro adicionou-se os componentes sólidos: amido de mandioca, bagacilho de cana-de-açúcar, fosfato de rocha (ou pó de basalto), açúcar cristal, leite em pó desnatado e extrato de levedura. Estes materiais são misturados através de movimentos circulares por 10 minutos. Em seguida, são adicionados os componentes líquidos da formulação: tampão Fosfato K_2HPO_4 1,0 M, pH = 7,0 e o glicerol, misturando novamente por 10 minutos até sua completa homogeneização. A formulação contendo todos os materiais homogeneamente misturados é deixada em repouso por 1 hora sob temperatura ambiente e protegida do calor e incidência de luminosidade, dentro de recipiente impermeável. Após este período de repouso, a mistura segue para o processo de extrusão a quente.

Empregou-se uma extrusora monorosca da marca BGM (modelo EL-25, Brasil), com temperatura de 120 °C nas suas quatro zonas; velocidade do parafuso de 70 rpm e matriz cilíndrica de 4,0 mm de diâmetro. O material extrusado foi obtido na forma de "*pellets*" cilíndricos com aproximadamente 1,0 cm de comprimento e 0,5 cm de diâmetro. O biocompósito produzido apresenta as seguintes características: pH = 6,8; densidade = 0,24 g/cm^3; índice de expansão IE = 0,94; Porosidade ε = 0,60; índice de absorção de água = 1,10 g H_2O/g biocompósito.

Para o preparo dos inoculantes, o biocompósito expandido foi embalado em plástico celofane e selado com o auxílio de uma seladora térmica. As embalagens contendo os biocompósitos devem ser esterilizadas sob calor seco de 160 ^oC por 4 horas previamente a adição dos micro-organismos. As bactérias promotoras do crescimento vegetal devem ser adicionadas às embalagens já esterilizadas na forma de suspensão celular na concentração de 10^7 células/mL, utilizando-se 100 mL de suspensão por kg de material introduzido nas embalagens esterilizadas, com auxílio de uma seringa esterilizada, resultando em uma densidade de células de 10^6 células/g biocompósito.

7. DESENHOS E ESQUEMAS

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

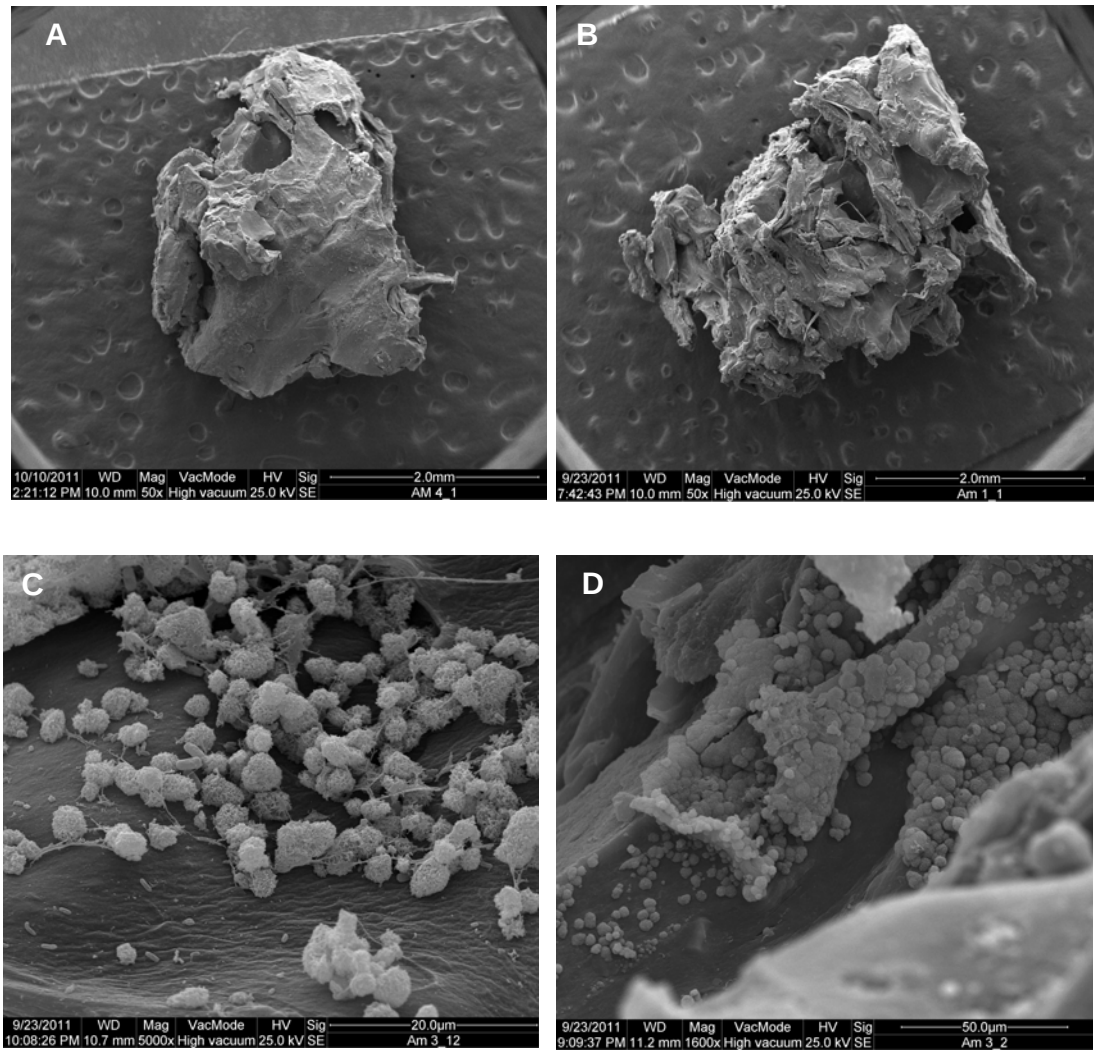


Figura 1. Micrografias eletrônicas de varredura do biocompósito inoculante. A) Aspecto geral do produto formado, superfície externa. B) Aspecto geral do produto formado, superfície interna. C) Detalhe do produto após a veiculação de suspensão de células de *Azospirillum brasilense* AbV5, apresentando a imobilização das células veiculadas sobre a superfície externa do biocompósito. D) Detalhe do produto após a veiculação de suspensão de células de *Azospirillum brasilense* AbV5, apresentando a imobilização das células veiculadas sobre a superfície interna do biocompósito.

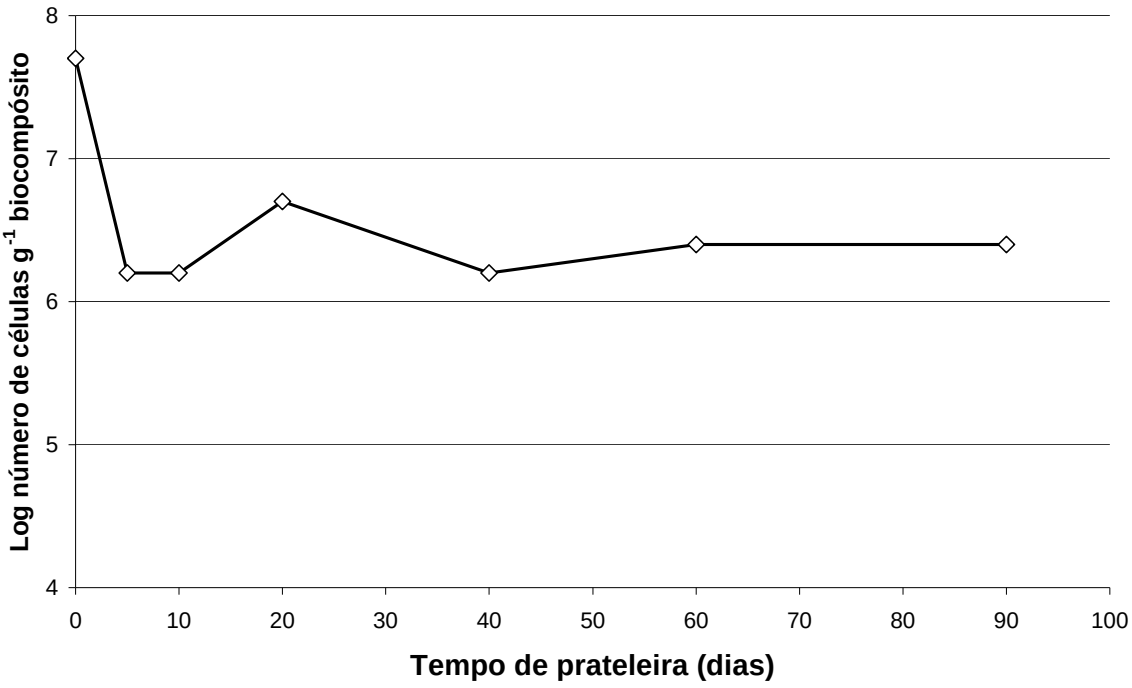


Figura 2. Viabilidade de *Azospirillum brasilense* AbV5 em embalagens inoculantes de celofane preparadas com o biocompósito expandido. As embalagens foram mantidas a temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

8.1. INVENTOR 1
Nome completo: André Luiz Martinez de Oliveira
Depto. da UEL onde atua: Departamento de Bioquímica e Biotecnologia
Endereço residencial completo: Rua Sucre número 55, Bairro Santa Rosa, CEP 86050-030, Londrina, Paraná
Tel:43 3328 9101 e-mail: almoliva@uel.br
Atividade na UEL: Professor Adjunto
Percentual da participação na invenção: 34 Tempo de participação: 24 meses

8.2. INVENTOR 2
Nome completo: Suzana Mali de Oliveira
Depto. da UEL onde atua: Departamento de Bioquímica e Biotecnologia
Endereço residencial completo: Rua Sergipe número 1774, apto 501, CEP 86020-330, Centro, Londrina, Paraná.
Tel: 43 3339 8449 e-mail: smali@uel.br
Atividade na UEL: Professor Adjunto
Percentual da participação na invenção: 33 Tempo de participação: 24 meses

8.3. INVENTOR 3
Nome completo: Paulo Ricardo Franco Marcelino
Depto. da UEL onde estuda: Departamento de Bioquímica e Biotecnologia
Endereço residencial completo: Rua Gonçalo Monterio, número 579, CEP 86066-070, Jardim Sabará I, Londrina, Paraná
Tel: 43 3356 1600 e-mail: paulorfm1@hotmail.com
Atividade na UEL: Estudante Mestrado em Biotecnologia
Percentual da participação na invenção: 33 Tempo de participação: 24 meses

(anexar item 8, caso haja outros inventores)

9. CONCEPÇÃO DA INVENÇÃO
9.1. Quando a invenção foi concebida? 2011
9.2. Ela já foi descrita ou documentada? Sim ☒ Não ☐
9.3. Se sim, onde e de que forma (escrita, oral) foi realizada a primeira descrição? Escrita, como dissertação de mestrado em Biotecnologia.
9.4. A invenção está finalizada e com protótipo? Sim ☒ Não ☐

10. DIVULGAÇÃO EXTERNA DA INVENÇÃO
10.1. Houve alguma divulgação pública da invenção? Sim ☐ Não ☒
10.2. Se sim, quando e como?
10.3. Neste caso, foi assinado um acordo de sigilo ou de não-divulgação? Sim ☐ Não ☒
Obs: Se possível, anexe uma cópia da divulgação realizada

11.DIVULGAÇÃO INTERNA DA INVENÇÃO
11.1. Houve alguma divulgação interna da invenção, por exemplo, para alunos, funcionários, docentes, palestra, eventos? Sim ☐ Não ☒
11.2. Se sim, a divulgação foi tecnicamente detalhada? Sim ☐ Não ☐
Obs: Se possível, anexe uma cópia da divulgação realizada.

12. PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS E TÉCNICAS
12.1. Foram publicados artigos, no quais um dos inventores aparece com como autor, contendo informações suficientes para que uma pessoa com conhecimentos na área possa reproduzir a invenção? Sim☐ Não☒
Obs: Se sim, anexe cópias dos artigos.

13. COMUNICAÇÕES

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

Sim ☐ Não ☒

Obs: Se sim, anexe cópias das comunicações.

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

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

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

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

15. DIVULGAÇÕES FORA DA EMPRESA (APLICÁVEL ÀS EMPRESAS)

15.1. Houve alguma divulgação da invenção fora da empresa, nas formas escrita, oral ou expositiva? **Sim☐ Não ☒**

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

15.2. As divulgações foram realizadas sob algum instrumento legal de sigilo ou confidencialidade? **Sim ☐ Não☒**

16. PATENTES RELACIONADAS

16.1 Se tiver disponível, liste quaisquer publicações ou patentes que descrevam invenções similares a esta, para a qual está sendo solicitada a propriedade: Processos constantes no INPI relacionados ao desenvolvimento de formulações inoculantes para uso agrícola: C10506338-8; PI0517713-8, PI 0519258-7, PI0506338-8, PI0404749-4, PI0312543-2, PI0301447-9, PI0200142-0, PI0103922-9, PI0001535-0, PI0001409-5, PI9916134-6, PI9809367-3, C19103618-6, PI9103905-3, PI9006345-7, PI8906372-4, PI8708011-7, PI8606028-7, PI8604811-2, PI8604810-4, PI8604111-8, PI8601804-3.

17. Declaração

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

INVENTOR 1

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

INVENTOR 2

_____
Nome: Suzana Mali de Oliveira
CPF: 579.985.231-15

INVENTOR 3

_____
Nome: Paulo Ricardo Franco Marcelino
CPF: 052.319.919-88

Londrina, 09 de fevereiro de 2012.