

AVALIAÇÃO DO TEMPO DE ARMAZENAGEM SOBRE A
MICROBIOTA DE INOCULANTES ENCAPSULADOS

Daniela Konrad

PALOTINA
2016

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, que com suas palavras e ensinamentos deu-me sabedoria, perseverança e iluminou meus caminhos para chegar onde estou.

A minha família, em especial ao meu pai Luis Arthur Konrad, a minha mãe Sueli Genero Konrad e meu irmão Mateus Konrad, que investem em mim todas as suas forças e expectativas, e que, apesar de qualquer dificuldade, sempre se mantiveram unidos e felizes. Por todo apoio e excelentes exemplos de vida que representam para mim. Ao meu namorado Pedro, que tem toda paciência do mundo comigo, e demonstrou apoio desde o começo, mesmo com tanta ausência minha por compromissos relacionados a minha formação.

A minha grande orientadora Eliane C. G. Vendruscolo, agradeço por todos os seus incentivos e tempo dedicado para que eu me desenvolvesse não só como aluno e orientado, mas também como profissional e como pessoa.

Em especial ao pessoal do LABIOGEN, aonde passei os últimos dois anos da graduação realizando diferentes atividades, aonde tive a oportunidade de expressar meu potencial de trabalho, agradeço também a todos integrantes do grupo pela confiança e pela ajuda nesse trabalho, principalmente a Sharlini Zago e tenho certeza que se não fosse o empenho de vários eu não chegaria até aqui. Agradeço também a todos professores do curso pelos seus ensinamentos e tempo gasto em minha formação.

Da vida não levamos bem materiais ou dinheiro, mas sim lembranças de uma vida com muitos amigos e bons momentos, por isso não poderia deixar de agradecer todos os amigos que os momentos da Universidade me proporcionaram. Minha companheira de curso, e eterna dupla em trabalhos e provas, Ana Laura, sempre deixando as tardes e noites de trabalho mais animadas, e que deixou fazer do seu apartamento minha segunda casa. As amigas de outros cursos, e de fora na faculdade, sempre presentes em todos os momentos bons e ruins, Cíntia, Bárbara, Priscila, Marlova, Vanessa, Esther, Nina, Milena, Adri, Samara e demais. Todos os amigos também, não posso citar todos aqui, por isso quero deixar evidente que meus amigos foram essenciais para a minha formação pessoal e profissional.

Resumo

As bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) colonizam a rizosfera das espécies vegetais e conferem benefícios às plantas. Um dos métodos mais bem sucedidos é o uso dos inoculantes, que consistem basicamente de um meio de crescimento bacteriano envolto por um carreador ou veículo, cujo objetivo é estender a viabilidade bacteriana. Na tentativa de aumentar a taxa de sobrevivência bacteriana pela proteção contra estresses ambientais, a encapsulação de células em matrizes de gel biodegradável parece ser uma biotecnologia viável. O objetivo deste trabalho foi determinar um protocolo de obtenção de encapsulamento de células bacterianas, usando o alginato de cálcio como material suporte da bactéria *Azospirillum brasilense* e avaliar comparando dois tratamentos, alginato e turfa, o efeito do tempo de armazenamento em termos da sobrevivência e viabilidade da população bacteriana na associação com plantas de trigo *in vitro*. A bactéria *A. brasilense* foi cultivada e mantida em meio NFb – Lactato. O protocolo usado para o encapsulamento do inóculo com alginato de cálcio foi retirado da literatura, com modificações. Foram avaliadas em 3 períodos de armazenamento, aspectos físicos das esferas, concentração de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) pelo método da microgota e viabilidade celular pela inoculação em sementes de trigo. Como resultados obtidos, o protocolo de encapsulamento foi eficiente para gerar esferas de formato e tamanho homogêneos. O encapsulamento pelo alginato e a turfa apresentaram uma maior redução na população bacteriana aos 15 dias de armazenamento e a população em ambos os carreadores foi estabilizada em 10^6 ao 45º dia. Em relação a viabilidade bacteriana, a inoculação não promoveu aumentos significativos na altura ou comprimento de raiz, porém nos pesos frescos da parte aérea e radicular a turfa promoveu os maiores incrementos possivelmente pela maior concentração de UFC.mL⁻¹.

Palavras-chave: Bioinoculante, BPCV, encapsulação.

Abstract

Storage time evaluation on the microbiota of encapsulated inoculants. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) colonize the rhizosphere of plant species and confer benefits to plants. One of the most successful methods in agriculture is the use of inoculants, which consist of a bacterial growth medium enveloped by a carrier or vehicle, with the purpose of increase bacterial viability. An attempt to increase the survival rate of bacteria through protection against environmental stress, is the encapsulation of cells in biodegradable gel matrices which appears to be a viable biotechnology. The objective of this work was to obtain a protocol to obtain bacterial cell encapsulation using calcium alginate as a support material of *Azospirillum brasilense* and to evaluate the effect of the storage time in terms of survival and the viability of the bacterial population in association with wheat plants *in vitro*. *A. brasilense* was cultivated and maintained in NFb - lactate medium. The protocol used for encapsulation of inoculum with calcium alginate was withdrawn from the literature, with modifications. Three storage periods were checked in terms of physical aspects of spheres, the concentration of colony forming units (CFU) by microbeads method and the viability of the cells by inoculation of wheat seeds. As obtained results, the encapsulation protocol was efficient to generate spheres of homogeneous size and shape. The encapsulation of alginate and peat showed a greater reduction in the bacterial population at 15 days of storage and the population in both carriers was stabilized in 10^6 at the 45th day. In relation to bacterial viability, inoculation did not promote significant increases in root height or length, but in fresh shoot and root, peat promoted the greatest increases probability by the higher UFC population.

Keywords: Bioinoculant, encapsulation, PGPR.

1 INTRODUÇÃO

As bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) colonizam a rizosfera de diversas espécies de plantas. Os mecanismos de promoção de crescimento conferem benefícios às plantas hospedeiras, estimulando o crescimento pela produção de fitohormônios, fixação de nitrogênio, oportunizando maior disponibilização de macro e micronutrientes. Além disso, conferem indução de resistência nas plantas, de forma a suprimir doenças causadas por patógenos. Porém, a resposta associativa de plantas x bactérias depende de vários fatores, entre os quais, do genótipo vegetal, da estirpe bacteriana, das condições de cultivo e da inoculação entre outros (BHATTACHARYYA & JHA, 2011; SIVAKUMAR *et al.*, 2014).

A produção mundial de alimentos está alicerçada no uso massivo de fertilizantes químicos que podem poluir o ambiente e tem alto custo, uma vez que, as fontes destes recursos não são renováveis, além de necessitar do gasto de combustíveis fósseis para a sua exploração, transporte e aplicação em grande escala. Alternativas menos poluidoras e econômicas são demandadas por parte dos agricultores. Dentre algumas destas alternativas, os biofertilizantes na forma de inoculantes, se caracterizam por serem eco-sustentáveis, terem baixo custo, porém, necessitam de formulação específica para o seu uso (BARDI & MALUSÀ, 2012; MALUSÀ & VASSILEV, 2014; OWEN *et al.*, 2015).

Bashan *et al.* (2014) citam que os inoculantes devem apresentar três características fundamentais: 1- promover o crescimento bacteriano; 2- manter viáveis as células por um certo período de tempo e 3- garantir a liberação de uma população bacteriana que certamente será benéfica para as plantas na qual encontram-se associadas.

A sobrevivência microbiana após a introdução por inoculação no solo depende tanto de fatores abióticos como bióticos (VAN VEEN *et al.*, 1997; SIVAKUMAR *et al.*, 2014). A população das bactérias inoculadas declina progressivamente com o tempo impedindo o acúmulo de um pool bacteriano na rizosfera suficiente para promover efeitos benéficos (BASHAN, 1998). Condições nutricionais, de umidade, temperatura, pH da solução no solo são fatores que comprometem a sobrevivência bacteriana na rizosfera. Além disso, a sobrevivência das bactérias inoculadas depende em grande parte da disponibilidade de nicho específico sem competição por nutrientes e substratos;

da resistência à predação e/ou convivência mutualística com a microflora nativa, frequentemente melhor adaptada, entre outros (REETHA *et al.*, 2014).

Um dos métodos mais bem-sucedido, seguro e eficaz para a introdução bacteriana no solo é o encapsulamento de células em matrizes de gel biodegradáveis (VASSILEV *et al.*, 2001). Um desses géis é formado pelo alginato de sódio, um polímero natural composto de dois ácidos: D-manurônico e ácido L-glucurônico, produzido pelas algas marrons (*Macrocystis pyrifera*) além de bactérias (*Pseudomonas sp* e *Azotobacter sp*) (HAY *et al.*, 2010; NEHRA & CHOUDHARY, 2015). O encapsulamento com o alginato de sódio ajuda a aumentar a taxa de sobrevivência e facilita a maior disponibilização bacteriana pela manutenção de um número maior de células viáveis nesta matriz gelatinosa para as plantas. Após inoculação, esta matriz gelatinosa se degrada no ambiente lentamente liberando as bactérias e não causando perturbação ao ecossistema (CASSIDY *et al.*, 1996; REETHA *et al.*, 2014; VASSILEV *et al.*, 2015).

As inconstâncias nos resultados da utilização de bactérias promotoras de crescimento vegetal através de inoculantes, pela especificidade de interação entre a bactéria x planta, condições físicas e químicas das diferentes formulações, assim como tempo de armazenamento, fazem com que os estudos de obtenção de novas formas de manutenção de inóculo, bem como sua performance, sejam cruciais para a recomendação e uso em escala comercial dos inoculantes.

Diante do exposto acima, o objetivo deste trabalho foi determinar um protocolo de obtenção de encapsulamento de células bacterianas, usando o alginato de cálcio como material suporte da bactéria *Azospirillum brasilense* e avaliar comparando dois tratamentos, alginato e turfa, o efeito do tempo de armazenamento em termos da sobrevivência e viabilidade da população bacteriana na associação com plantas de trigo *in vitro*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Bactérias promotoras de crescimento

A interação entre bactérias e plantas pode ser benéfica, prejudicial ou neutra e, o efeito de uma determinada bactéria pode variar à medida que as condições do solo mudam (LYNCH, 1990; GLICK, 2005). As bactérias que trazem benefícios para as plantas podem ser de dois tipos: aquelas que formam uma relação simbiótica, que envolve a formação de estruturas especializadas ou nódulos nas raízes da planta hospedeira e aquelas que vivem livremente no solo. As que vivem livremente no solo podem ser encontrados próximos, sobre ou até mesmo dentro das raízes (ZAHIR *et al.*, 2004).

As bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) colonizam a rizosfera das espécies vegetais e conferem benefícios às plantas hospedeiras, entre os quais estão: (1) produção de fitohormônios como o ácido abscísico, ácido giberélico, citocininas e auxinas, que alteram a morfologia das raízes, aumentando o número, o comprimento, o desenvolvimento de um maior número de raízes laterais e a capacidade de absorver nutrientes (SALA *et al.*, 2005; SPAEPEN *et al.*, 2008). As bactérias que produzem a enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminase (ACCd) podem degradar o 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC), controlando os níveis endógenos de etileno na raiz durante o desenvolvimento de plantas e períodos de estresse, pelo fato do ACC ser precursor do gás etileno (KHALID *et al.*, 2004; GLICK, 2005); (2) Solubilização de fósforo (P) pela produção de ácidos que atuam sobre o P insolúvel (PEDRAZA, 2008), contribuindo para uma maior disponibilidade deste macronutriente na nutrição vegetal (BHATTACHARJEE *et al.*, 2008; BHATTACHARYYA & JHA, 2011; GLICK, 2012); (3) Solubilização do ferro (Fe), envolvendo a produção de sideróforos, compostos de baixo peso molecular secretados pelas raízes das plantas e bactérias, que atuam “sequestrando” o Fe na rizosfera e disponibilizando-o para as plantas (KATIYAR & GOEL, 2004; LOREDO-OSTI *et al.*, 2004); (4) Indução de resistência sistêmica por compostos produzidos por bactérias sinalizadores da resposta imune vegetal (RYAN *et al.*, 2007); (5) Formação de biofilme bacteriano ou matriz extracelular, que pela presença de macromoléculas (açúcares, oligossacarídeos e polissacarídeos) aumentam a hidratação e nutrição da raiz. A capacidade de retenção de água de alguns polissacarídeos pode exceder várias vezes a sua massa (YANG *et al.*, 2009; TIMMUSK *et al.*, 2014); (6) Melhoria na estrutura e textura dos solos (MAPELLI *et al.*, 2012) e (7) indução à tolerância e estresses abióticos, entre outros (TIMMUSK *et al.*, 2014). Uma

mesma bactéria poderia afetar o crescimento de uma planta através de um ou mais mecanismos, inclusive, proporcionando diversos benefícios em vários momentos durante o ciclo de vida da planta.

2.2 Inoculantes

Inoculantes podem ser definidos como: um produto que contém micro-organismos com ação benéfica para o desenvolvimento das plantas (EMBRAPA, 2016) ou como uma formulação contendo um ou mais estirpes bacterianas (ou espécies) benéficas em um veículo econômico, de fácil manuseio, de origem orgânica ou inorgânica ou ainda de moléculas sintetizadas (BASHAN, 1998). Os inoculantes consistem basicamente de um meio de crescimento bacteriano envolto por um carreador ou veículo, cujo objetivo é estender a viabilidade bacteriana. Inoculantes podem apresentarem-se na formulação sólida (pó, gel, granular) ou líquida, definido pelo tipo de carreador usado (EMBRAPA, 2016). Dentre todos os sólidos, o mais utilizado na agroindústria é a turfa por ser barata e ainda abundante na natureza. Constitui-se de um material biodegradável no solo, não-tóxico, portanto não poluidor. Todavia, nos inoculantes à base de turfa, os micro-organismos tem menor tolerância ao estresse físico, especialmente as variações de temperatura, além de serem vulneráveis às contaminações por micro-organismos indesejáveis (BASHAN, 1998).

Basicamente, um inoculante deve conter um meio de cultura específico para a(s) cepa(s) bacteriana(s). Na literatura estão descritos diversos meios: DYGS (RODRIGUES NETO *et al.*, 1986) NFb, JNFb, LG, LGD, LGI, LGI-P (DÖBEREINER *et al.*, 1995), e o crescimento deve ocorrer na temperatura ótima de crescimento bacteriano (25- 35°C), sob agitação, até que a cultura bacteriana atinja a fase exponencial de crescimento.

Inoculantes líquidos podem ter aditivos para o aumento da viabilidade e tempo de estocagem. Entre os aditivos são descritos: carboxi-metil celulose (CMC), goma arábica, glicerol, PVP (polivinilpirrolidona), sacarose (VIJI *et al.*, 2003; WANI *et al.*, 2007; ALBAREDA *et al.*, 2008; TAURIAN *et al.*, 2010).

O carreador e/ou veículo é utilizado com a finalidade de aumentar a viabilidade celular e promover boas condições fisiológicas até o momento das bactérias se associarem com o alvo (no caso, na rizosfera). O carreador, na formulação de

inoculantes, apresenta-se em maior proporção (volume ou peso). Porém, para ser considerado adequado, o carreador deverá apresentar: 1- Características químicas e físicas- deverá ser estéril ou facilmente esterilizável; de estrutura química e física uniforme; consistente em qualidade. O veículo deverá permitir a troca de gases, particularmente o oxigênio, ter um elevado teor de matéria orgânica e uma elevada capacidade de retenção de água também; 2- Características de produção- deverá ser barato, embalável, facilmente utilizado, disponível e miscível. Deverá permitir a adição de nutrientes e ter pH quase neutro ou prontamente ajustável; 3- Características de manuseio- deverá facilmente liberar controladamente os micro-organismos no solo e ser de fácil manuseio em relação ao maquinário agrícola; 4- Características ambientais- o carreador não poderá ser tóxico tanto para as células bacterianas como também para a própria planta, bem como não deverá oferecer riscos ao homem, animais ou plantas e 5- Características de armazenamento- deverá apresentar uma vida útil ou de prateleira de 1 a 2 anos no mínimo (BASHAN, 1998; BEN REBAH *et al.*, 2002; EL-FATTAH *et al.*, 2013; MARCELINO *et al.*, 2016).

Os carreadores sólidos podem ser classificados em: carreadores orgânicos (produto de vermicompostagem, palha, bagaço, carvão) e carreadores inorgânicos, como a turfa, argila, talco, vermiculita e os polímeros sólidos (BASHAN *et al.*, 2014).

Além do tipo do carreador, diversos fatores devem ser considerados na otimização da formulação dos inoculantes: os métodos de crescimento e obtenção do inóculo, tempo de armazenagem, condições de armazenagem e transporte entre outros (REKHA *et al.*, 2007; VASSILEV *et al.*, 2015).

O encapsulamento de micro-organismos em uma matriz polimérica é ainda experimental no campo da biotecnologia de inoculação. Até o momento, não existem produtos comerciais à base de polímeros. Diversos polímeros podem ser usados no processo de encapsulamento bacteriano: poliacrilamida, ágar, agarose, goma xantana, polissacarídeos, alginas etc. (CASSIDY *et al.*, 1996). Dentre estes polímeros, os compostos inorgânicos na forma de géis biodegradáveis, formado a partir do alginato de sódio, seriam uma alternativa por proporcionar nichos de proteção e fornecimento de nutrientes por um período maior de tempo (REKHA *et al.*, 2007), uma vez que estudos verificaram que uma variedade de materiais utilizados como transportadores

melhoraram a sobrevivência e a eficácia biológica dos inoculantes, protegendo as bactérias contra tensões bióticas e abióticas (VAN VEEN *et al.*, 1997).

2.3 Alginato de sódio

O alginato de sódio foi descoberto pelo químico inglês E. C. C. Stanford, em 1880, foi obtido através da extração/digestão de folhas de determinadas algas marrons com um álcali diluído, carbonato de sódio, gerando uma massa gelatinosa, que quando evaporada apresentava um aspecto semelhante ao de uma goma, conhecida como algina, derivado de alga. Esse termo foi usado em princípio para designar a substância *in situ* na planta, enquanto que aos produtos industriais obtidos posteriormente foram dados outros usos, como ácido algínico, alginatos solúveis, compostos algínicos em geral (LIMA, 2006; FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2013).

As algas marrons da família das feofíceas são a principal fonte de matéria prima para a produção do alginato, uma vez que é um componente da parede celular de tais organismos, formando um complexo insolúvel de ácido algínico e seus sais de cálcio, magnésio e de metais alcalinos em várias proporções. O alginato pode constituir até 40% da massa seca destas algas. Essas algas crescem em todas as regiões de águas frias do mundo, e as espécies podem variar em tamanho, forma, porcentagem e qualidade do alginato que produzem. Assim, a escolha das algas para produção comercial não é apenas influenciada pelo seu preço, mas pelo tipo de ácido algínico presente na alga, desde que a sua estrutura determina algumas propriedades (LIMA, 2006; FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2013).

O alginato também pode ser extraído da superfície de algumas bactérias. Foram identificadas bactérias do gênero *Azotobacter* e *Pseudomonas* como produtoras deste biopolímero (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2013).

O alginato é um heteropolissacarídeo de ocorrência natural, pertencente à família dos polissacarídeos lineares não-ramificados, constituído de ácidos α -L-glucorônicos e β -D-manurônicos que são unidos por ligações 1-4. O material está disposto em blocos alternados e variam extensamente em termos de sua composição (proporção entre os ácidos), estrutura sequencial ao longo da cadeia polimérica e grau de polimerização. Desta forma, o material pode apresentar sequências alternadas de resíduos dos ácidos glucorônicos (G) e manurônicos (M) e blocos constituídos de dois

ou mais resíduos M ou G determinando as propriedades do ácido algínico (LIMA, 2006; NEHRA & CHOUDHARY, 2015).

A capacidade de geleificação depende da proporção M/G e do número de ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas. Os géis são formados na presença de cátions divalentes como Ca^{++} ou Mg^{++} e a presença de sequências de resíduos glucorônicos é necessária para que apresentem esta capacidade. As características estruturais do material afetam significativamente seu comportamento reológico em função de suas características é também utilizado como espessante, estabilizante de emulsões e de espuma, agente de encapsulação, agente de geleificação, agente de formação de filmes e de fibras sintéticas, entre outras possibilidades (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2013).

A preparação ou obtenção das esferas ou grânulos de inoculante encapsulado com alginato envolve um procedimento de vários passos onde a ideia é imobilizar uma concentração de células em uma matriz polimérica, seguida da sua fermentação em um meio de crescimento bacteriano (BASHAN, 1986). Na literatura foram citadas diversas formulações desenvolvidas usando o encapsulamento por alginato de sódio com ou sem aditivos (REETHA *et al.*, 2014; SIVAKUMAR *et al.*, 2014; NEHRA & CHOUDHARY, 2015; ROY *et al.*, 2015; SCHOEBITZ, 2016). O tamanho das esferas pode variar de 1 a 6 mm e podem apresentar uma concentração de células bacterianas variando entre 10^8 a 10^{11} UFC.mL⁻¹.

2.4 Turfa

A turfa é uma substância organo-mineral, fóssil, originada do atrofiamento e decomposição de restos vegetais em condições de umidade excessiva (até 95%), além de materiais inorgânicos, e pode ser encontrada em áreas alagadiças como planícies costeiras, várzeas de rios e regiões lacustres (INSTITUTO DE PESQUISAS TECNOLÓGICAS (IPT), 1979; FRANCHI, 2000). Sob o ponto de vista físico-químico, é um material poroso, com elevada capacidade de adsorção para metais de transição e moléculas orgânicas, altamente polar (FRANCHI, 2004). Segundo Martino e Kurth (1982), a coloração da turfa varia dependendo da presença de sedimentos e do grau de deterioração biológica e mecânica das fibras, do amarelo ao marrom escuro.

Formada em antigos lagos das regiões frias do Hemisfério Norte, no Brasil a turfa é encontrada em regiões de inundação ou charcos segundo o Instituto de Pesquisas Tecnológicas (1979). Segundo Castro *et al.* (2003), existem turfeiras em volume significativo no Rio de Janeiro (região norte do estado), no sul de Santa Catarina e no Mato Grosso do Sul.

Formulações de turfa são as mais comumente utilizadas para a inoculação de estirpes de *Rhizobium sp.* As bactérias permanecem metabolicamente ativas em turfa pela disponibilização de nutrientes suficientes, temperatura e umidade corretas, continuando o crescimento celular e a multiplicação por um maior período de armazenamento (BASHAN, 1998). Sua popularidade vem do fato de que, além de ter sido adotado décadas atrás, acostumando os agricultores com seu uso, apresentam resultados bem sucedidos à campo e no aspecto qualitativo e comercial e, as agências governamentais monitoraram eficientemente (GUIMARÃES *et al.*, 2013).

Por ser um material orgânico complexo e indefinido, a turfa apresenta alguns inconvenientes devido à grande variabilidade na qualidade, que depende da fonte proveniente, a qual afeta muito o produto final, e causa dificuldades principalmente para o armazenamento tornando difícil manter a mesma qualidade entre lotes (VAN ELSAS & HEIJNEN, 1990; BASHAN, 1998). Além disso, o armazenamento da turfa requer um grande espaço, e mesmo a 5° C, a vida útil é limitada (cerca de 1 ano para turfa não esterilizada, e 2 anos para turfa esterilizada), uma vez que é facilmente contaminada sob armazenagem inadequada, susceptível a flutuações de umidade, entre outras (BASHAN, 1998).

Neste contexto, foi objetivo deste trabalho determinar um protocolo de obtenção de encapsulamento de células bacterianas, usando o alginato de cálcio como material suporte da bactéria *Azospirillum brasilense* e avaliar comparando dois tratamentos, alginato e turfa, o efeito do tempo de armazenagem em termos da sobrevivência e viabilidade da população bacteriana na associação com plantas de trigo *in vitro*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica e Genética (LABIOGEN) da Universidade Federal do Paraná - Setor Palotina

3.1 Manutenção, cultivo e crescimento bacteriano

A bactéria *Azospirillum brasilense* Ab-V5, da coleção bacteriana do Labiogen, foi mantida por sucessivas passagens em meio sólido NFb – Lactato em placas de Petri, em estufa de crescimento a 28°C. O inóculo foi preparado retirando-se uma colônia e transferindo-a para um pré-inóculo, que constituiu de 5 mL de meio NFb - Lactato (MOUTIA *et al.*, 2003) em tubos cônicos de 50 mL, e mantidos a 28°C em uma incubadora tipo Shaker a 120 rotações por minuto (rpm). Após 24 horas, o crescimento foi quantificado por turbidimetria em 600 nanômetros (nm). Para o preparo do inóculo, 1 mL de pré-inóculo, com aproximadamente 1 unidade de densidade ótica (D.O), foi transferido para um erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio NFb – Lactato e a cultura mantida sob agitação por aproximadamente 22 h.

Após 22h, e ocorrida a quantificação da D.O. (0,553), uma alíquota ajustada para uma população bacteriana de 1×10^{11} foi tomada do inóculo total para ser anexada aos carreadores usados neste experimento. Esta porção foi centrifugada durante 10 min à 10000 rpm à 20°C por 2 vezes e o pellet foi cuidadosamente ressuspensionado em 9 mL de solução peptonada a 1%.

3.2 Preparo e encapsulamento das bactérias a base do gel alginato de sódio

A encapsulação de células de *A. brasilense* dentro de grânulos foi realizada sob condições estéreis num exaustor de fluxo de ar laminar, com solução de alginato de sódio (2,5% w / v) segundo o protocolo proposto por Reetha *et al.* (2014), com modificações. Uma proporção de 2:1 foi utilizada, onde 300 mL do aditivo alginato de sódio foi misturado com 150 mL de peptona + suspensão de bactérias do inóculo de *Azospirillum* (pellet de células-descrito no item acima), gerando um total de 450mL que permaneceu sob agitação suave em agitador eletromagnético (Biomixer) durante 1h dentro do fluxo laminar. Em seguida, a mistura foi extrudida através de pipetas Pasteur dentro de um recipiente contendo CaCl_2 0,1 M estéril mantida em suave agitação, em temperatura ambiente. Os grânulos ou esferas encapsuladas formadas foram mantidos na solução de CaCl_2 à temperatura ambiente durante 2 h até a obtenção de esferas/grânulos sólidos regulares. Esta solução foi drenada e as esferas lavadas 2 vezes com água corrente esterilizada.

Em seguida, as esferas foram incubadas em meio de crescimento fresco (caldo de nutrientes – meio NFB- Lactato, sem fosfato e sem o corante Azul de Bromotimol (ABT), contendo antibiótico e fungicida) por mais 24 h em agitador incubadora a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ para permitir que as bactérias se multiplicassem no interior dos grânulos.

Após as 24 h, as esferas foram lavadas 2 vezes com água destilada, e depois de escorrer o excesso de água, a produção de esferas encapsuladas foi empacotada em alíquotas de aproximadamente 10 g cada, usando sacos plásticos previamente esterilizados sob luz ultra violeta (UV) e seladora elétrica. Os pacotes ou alíquotas foram armazenados sob refrigeração em temperatura de 21°C .

3.3 Inocuidade das esferas encapsuladas

Em testes preliminares foi observado um nível alto de contaminação por fungos e outras bactérias nas alíquotas durante o armazenamento, mesmo em condições assépticas (fluxo laminar). Por isso, optou-se por acrescentar tanto o antibiótico- Ácido nalidíxico (20 $\mu\text{g/mL}$), adequado para *Azospirillum brasilense* Ab-V5, como o fungicida Maxim's (0,01% v/v) de amplo espectro.

3.4 Preparo e inoculação da turfa

A turfa esterilizada foi alíquotada em frações de 10 g, seladas com selador elétrico sob condições estéreis em exaustor de fluxo de ar laminar. A suspensão de bactérias do inóculo de *Azospirillum* foi preparada de modo similar ao alginato de sódio e foi inserida dentro do pacote com uma seringa e agulhas assépticas (1 mm). O inóculo foi suavemente homogeneizado para que a turfa pudesse incorporar o meio líquido peptonado. Após, o término desta homogeneização, no local da inserção da agulha foi adicionada uma fita super-adesiva e as alíquotas foram armazenadas sob refrigeração em temperatura de 21°C .

3.5 Avaliação da viabilidade microbiológica

O experimento consistiu de 2 tratamentos: turfa e o alginato de cálcio, usados como carreadores da bactéria *A. brasilense*, avaliados quanto a sobrevivência e viabilidade da população bacteriana e em associação com plantas de trigo *in vitro* em 3 datas de avaliação (15, 30 e 45 dias após alíquotagem), com 3 repetições cada uma.

Foram avaliados a população microbiana pelo teste da microgota (ROMEIRO, 2001) e a viabilidade bacteriana foi avaliada pelos parâmetros morfológicos de plântulas de trigo previamente inoculadas com os respectivos carreadores. Para aferir a população microbiana inicial foi realizado o controle, que consistiu do inóculo sem nenhum carreador (dia 0), para ambos os tratamentos.

Em cada data de avaliação, 3 pacotes foram separados e destes, aproximadamente 10 grânulos de esferas e/ou 0,050g de turfa foram dissolvidos separadamente em 10 mL de tampão de fosfato de potássio (0,25 M, pH $6,8 \pm 0,1$) em tubos cônicos de 15 mL durante 24h a 30 ± 2 °C.

Diluições seriadas foram feitas a partir de 100 µL da solução fosfatada pelo método de Romeiro (2001). Esses 100 µL foram colocados em microtubos contendo 900 µL de solução salina estéril (diluição 1:10 ou 10^{-1}) até atingir 10^{-8} . De cada diluição, microgotas (5µL cada) foram tomadas e incubadas em placas de Petri contendo meio NFb- Lactato em triplicata. A contagem das bactérias viáveis foi realizada após 30h de crescimento, sob estereomicroscópio (Quimis).

A avaliação do dia 0 – controle (dia respectivo ao encapsulamento), a população bacteriana foi realizada a partir da diluição direta de 100 µL do inóculo utilizado sem o uso da solução fosfatada.

3.6 Avaliação do crescimento vegetal pela inoculação de sementes com esferas encapsuladas

Nessa etapa, em cada uma das avaliações (15, 30 e 45 dias) 30 sementes CD 104 (Coodetec) para cada tratamento foram assepsiadas segundo o protocolo de Doumit *et al.*, (2014). Para a inoculação com o alginato, as sementes foram transferidas para um tubo cônico de 50 mL contendo 1,5 mL de solução fosfatada + 10 grânulos encapsulados, e mantido em repouso na B.O.D a 30°C por 4 h. O mesmo procedimento foi realizado para a turfa, usando 0,050g do carreador. Em seguida, as 30 sementes de cada tratamento foram dispostas em 3 em folhas de papel Gernitex cada. As folhas foram enroladas e mantidas em B.O.D a 30°C com fotoperíodo controlado de 16 h/ 8 h luz/escuro sob umidade constante por 7 dias, seguindo recomendações do manual de Regras para Análise de Sementes, do MAPA (2009) e Canadian Food Inspection Agency (2005).

3.7 Medidas morfológicas das plântulas inoculadas

Decorrido os 7 dias da germinação das sementes, 12 plântulas de cada tratamento foram separadas. A parte aérea foi separada da parte radicular e ambas foram medidas (cm) com régua graduada, para obtenção da altura e comprimento de raiz e em seguida estas foram pesadas (mg) através de balança analítica, para a determinação da massa fresca de parte aérea e de raiz.

4 RESULTADOS

4.1 Aspectos morfológicos das esferas encapsuladas

Com o protocolo proposto para a produção e obtenção do encapsulamento da cultura bacteriana, foi possível observar a formação das esferas ou grânulos padronizados alguns segundos após a mistura ser extrudada e entrar em contato com o CaCl_2 0,1 M estéril, sob agitação constante (Figura 1).

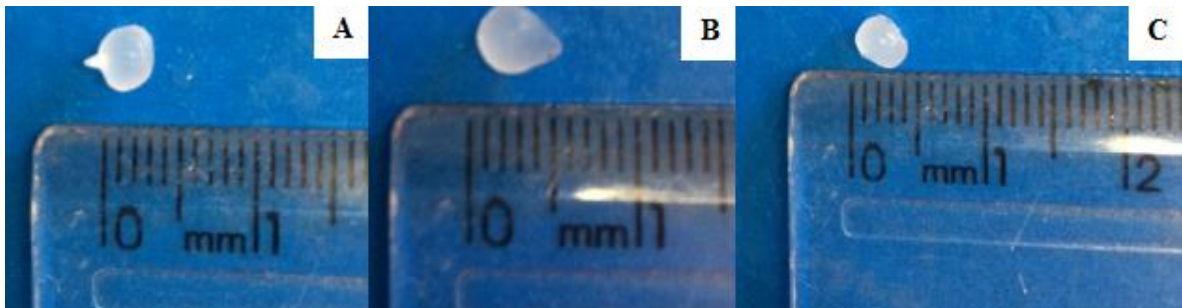


Figura 1. Aspecto das esferas formadas a partir do encapsulamento de meio de cultura bacteriano contendo *Azospirillum brasilense* com alginato de cálcio. Tamanho aproximado em mm A- Esferas encapsuladas após 15 dias, B- Esferas encapsuladas após 30 dias e C- Esferas encapsuladas após 45 dias.

As esferas encapsuladas e empacotadas mantiveram o mesmo aspecto morfológico ao longo do período de avaliação, mantendo a cor e o formato até o 45º dia de avaliação. As alíquotas de turfa conservaram o mesmo aspecto durante todo o experimento (Figura 2).

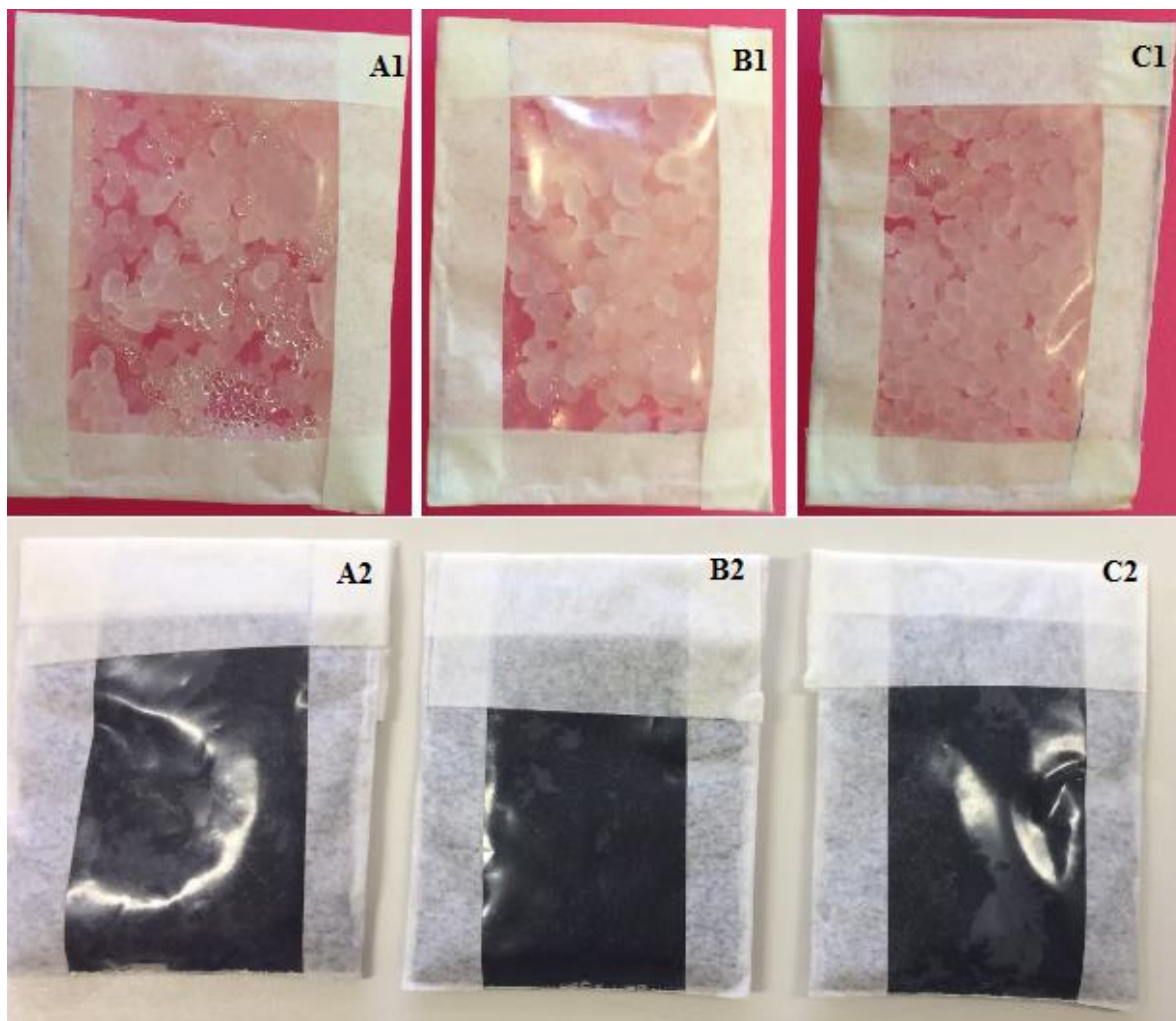


Figura 2. Aspecto visual das alíquotas (10 g) contendo os diferentes carreadores nos diferentes períodos de avaliação. **A1**- Esferas de alginato encapsuladas aos 15 dias; **A2**- Turfa aos 15 dias; **B1**- Esferas de alginato encapsuladas aos 30 dias; **B2**-Turfa aos 30 dias; **C1**- Esferas de alginato encapsuladas aos 45 dias; **C2**- Turfa aos 45 dias; com *Azospirillum brasilense*.

Na tabela 1, estão demonstradas as estimativas do tamanho e peso médios em triplicata das esferas encapsuladas, durante os períodos de avaliação, demonstrando que não houve alteração na morfologia e/ou peso dos grânulos ao longo dos 45 dias de armazenamento. Foi observado que o diâmetro individual das esferas variou de 3 à 6 mm e o peso médio individual de esfera foi de 3 mg.

Tabela 1. Aspectos físicos das esferas encapsuladas obtidas durante o tempo de armazenagem.

Dias de Armazenamento	Peso das alíquotas (g)	Peso unitário da esfera (mg)	Tamanho diametral (mm)
0	12.63 ± 2.76 a	3 ± 0.3 a	4,3 ± 0.15 a
15	10.01 ± 0.19 a	3.1 ± 0.26 a	5,0 ± 0.1 a
30	12.16 ± 3.09 a	2.93 ± 0.21 a	3,4 ± 0.05 a
45	10.07 ± 2.80 a	3.07 ± 0.40 a	4,0 ± 0.1 a

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey em nível de 5% de probabilidade. (N=3).

4.2 Avaliação da população bacteriana

Nas avaliações do efeito do tempo de armazenagem sobre a microbiota das alíquotas, usando diferentes carreadores, foi observada a presença de células bacterianas viáveis (UFC.mL⁻¹) em todos os períodos de avaliação, sugerindo que o encapsulamento em alginato de cálcio não afetou drasticamente o crescimento celular. Porém, foi observada uma diminuição na população bacteriana ao longo do tempo de armazenagem nos dois carreadores avaliados neste experimento (Figura 3).

Durante a instalação do experimento houve um acréscimo de 2% na população bacteriana quando o carreador foi o alginato de cálcio. Porém, foram observadas perdas de UFC.mL⁻¹ em relação a turfa nos demais dias de avaliação (16%, 9% e 6%, respectivamente). Aos 45 dias, ambos os carreadores apresentaram 10⁶ UFC.mL⁻¹.

Amostras retiradas randomicamente das bactérias na contagem de microgota, foram positivas para o PCR específico para o primer AZ16-AR, demonstrando que as bactérias são realmente *Azospirillum brasilense* (Dados não mostrados).

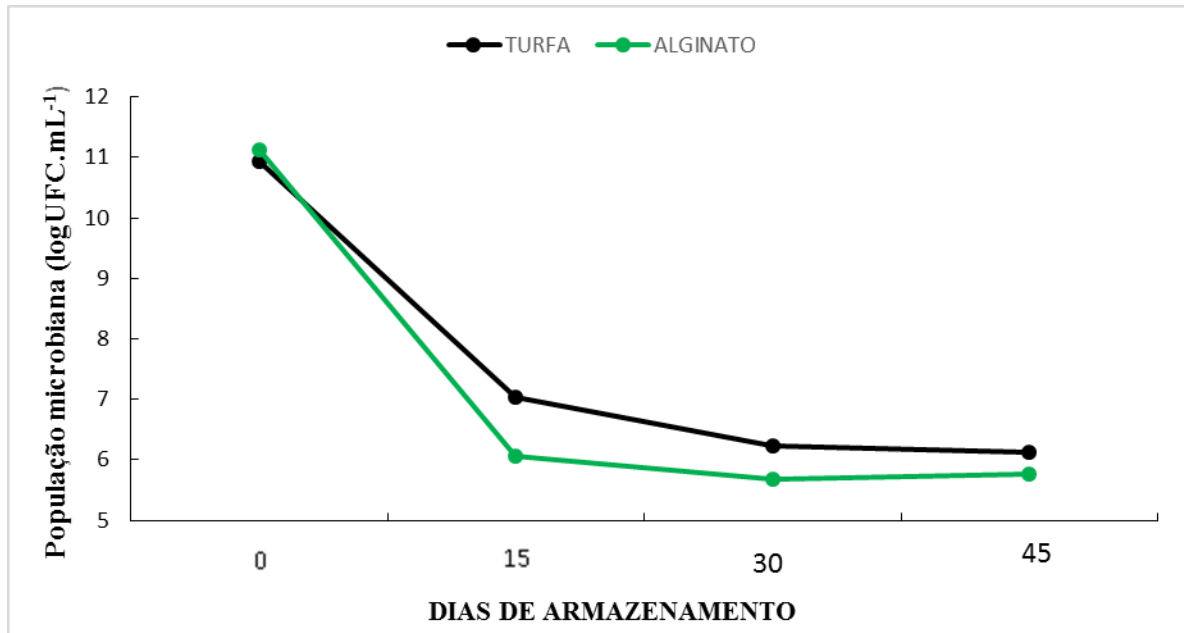


Figura 3. Efeito do tempo de armazenagem sobre a população microbiana de *Azospirillum brasilense* nos diferentes carreadores. Valores do eixo Y foram transformados em log₁₀.

4.3 Avaliação da viabilidade bacteriana pela promoção de crescimento vegetal

Os dados obtidos para o comprimento da parte aérea e comprimento de raiz das plântulas obtidas a partir de sementes inoculadas com as diferentes formulações estão demonstrados na Figura 4. Todas as plântulas foram avaliadas após 7 dias de inoculação. Como resultados obtidos, não foram observadas diferenças significativas na altura e comprimento de raiz pela inoculação das diferentes alíquotas do inoculado em relação ao tempo de armazenagem, com o carreador alginato de sódio (Figura 4A).

Porém, ao avaliar o peso da parte aérea e peso radicular também das plântulas inoculadas com o alginato, foram observadas diferenças significativas entre as diferentes alíquotas do inoculado em relação ao tempo de armazenagem. As alíquotas provenientes dos 30 dias foram as que promoveram os maiores pesos frescos tanto da parte aérea, como da raiz (Figura 4B).

Como resultados obtidos, para a Turfa, não foram observadas diferenças significativas na altura das plântulas, porém em relação ao comprimento de raiz, houve variação significativa. Alíquotas do preparado com turfa de 15 dias de armazenagem foram superiores aos de 45 dias, promovendo maior crescimento radicular (Figura 4C).

A mesma tendência foi observada para peso da parte aérea e peso das raízes. Sendo que a alíquota de 15 dias promoveu o maior peso de raízes em relação ao período inicial e ao controle.

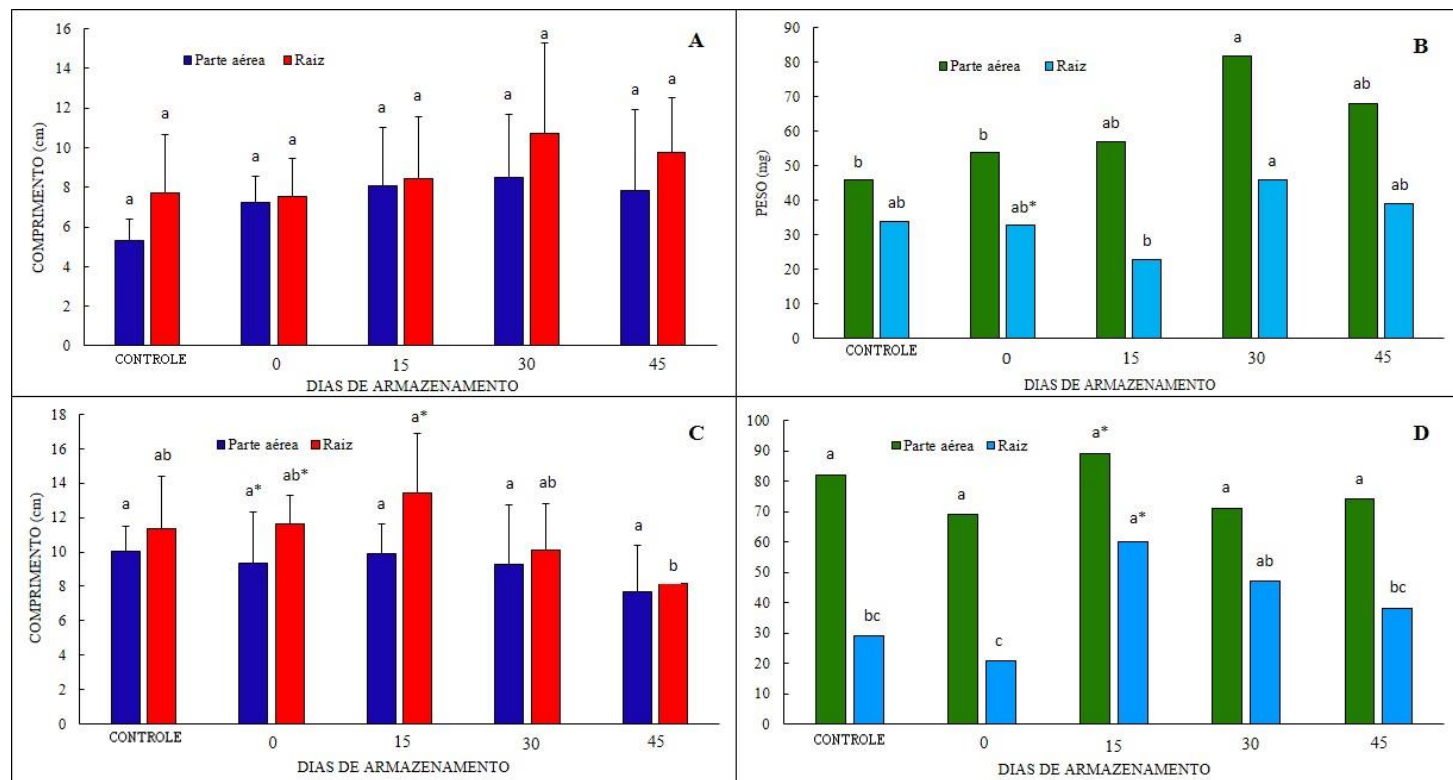


Figura 4. Dados da avaliação fenotípica das plântulas de trigo obtidas a partir de sementes inoculadas com as diferentes formulações contendo *Azospirillum brasilense*. **A-** Altura e comprimento de raiz de plântulas inoculadas com esferas de alginato de cálcio. **B-** Peso da parte aérea e da raiz de plântulas inoculadas com esferas de alginato de cálcio. **C-** Altura e comprimento de raiz de plântulas inoculadas com turfa. **D-** Peso da parte aérea e da raiz de plântulas inoculadas com turfa. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey em nível de 5% de probabilidade, comparando-se diferentes datas de armazenagem. (N=12). Médias seguidas de asterisco (*) diferem estatisticamente pelo teste Tukey em nível de 5% de probabilidade, comparando-se as diferentes formulações de carreadores (N=12).

Ao compararmos os dois carreadores nos mesmos períodos de armazenagem foi observada superioridade da turfa no período inicial e de 15 dias para a promoção do crescimento da parte aérea e radicular no tempo (Figuras 4A e 4C). Quando o peso fresco da parte aérea e da raiz foram comparados, demonstrou-se a superioridade do alginato na promoção do maior peso das raízes no período inicial (0) e da turfa, aos 15 dias, promovendo maior peso das raízes e das folhas (Figura 4B e 4D).

5 DISCUSSÃO

Atualmente, a inoculação de BPCV como uma biotecnologia na agricultura tem ocorrido usando a mistura de uma solução bacteriana líquida ou turfosa

(inoculante) incorporado ou misturado junto às sementes da cultura antes do plantio das mesmas. Pode ainda, dependendo da cultura, envolver o banho de mudas em uma solução líquida (frutíferas, entre outras espécies) e ou ainda a aplicação foliar por irrigação (ROY *et al.*, 2015). Na literatura, já está bem caracterizado a importância do *Azospirillum brasilense* como bactéria promotora de crescimento vegetal e diversos produtos comerciais contendo esta bactéria são amplamente recomendados (MARCELINO *et al.*, 2016; SCHOEBITZ, 2016).

Diversos trabalhos têm relatado protocolos para o encapsulamento de células bacterianas em matriz de géis biodegradáveis (SIVAKUMAR *et al.*, 2014; ROY *et al.*, 2015; SCHOEBITZ *et al.*, 2016). Os protocolos variam basicamente quanto ao equipamento e concentração do alginato de sódio usado. Neste trabalho foram obtidas esferas contendo células viáveis bacterianas encapsuladas por alginato de sódio com formato estável, homogêneo e padronizado.

No entanto, trabalhos caracterizando a população bacteriana encapsulada ao longo do tempo de armazenagem são escassos. Um dos poucos trabalhos, Reetha *et al.* (2014) relataram a manutenção da concentração bacteriana (10^9 UFC.mL⁻¹) ao longo de 360 dias. Ivanova *et al.* (2005) observaram que aumentando o tamanho da esfera a porcentagem de sobrevivência das bactérias foi aumentada em 36%. Também observaram a presença de viabilidade celular até 6 meses após armazenagem usando diferentes concentrações de alginato como carreador.

Neste trabalho foram observadas a presença de células bacterianas viáveis até o 45º dia de armazenagem, sugerindo que o encapsulamento em alginato de sódio, não afetou o crescimento celular. Porém, foi observada uma diminuição maior na população bacteriana no 15º dia de armazenagem nos dois carreadores avaliados neste experimento. Este resultado concorda com os obtidos por Ivanova *et al.* (2005) que observaram diminuições maiores na fase inicial pós extrusão (7 dias).

Neste trabalho, a concentração bacteriana inicial do meio foi ajustada para conter 10^{11} UFC.mL⁻¹ tendo por base a concentração bacteriana de empresas fornecedores de inoculantes. Diferentes concentrações de UFC.mL⁻¹ no inoculante são registradas na literatura: 10^9 (REETHA *et al.*, 2014); 10^{10} (YOUNG *et al.*, 2006); 10^6 (MARCELINO *et al.*, 2016). Bashan (1998) comenta que na América Latina a concentração bacteriana é irregular pela falta de leis regulatórias para o mercado.

Ivanova *et al.* (2005) relataram tamanhos de esferas formadas pelo protocolo seguido variando entre 1 e 5 mm, e uma população bacteriana obtida de $2,2 \times 10^9$ UFC.mL⁻¹ (total). Neste trabalho, o protocolo obteve tamanhos de esferas similar aos de outros autores, variando de 3 a 6 mm, sendo a média inicial de $1,32 \times 10^{11}$ UFC.mL⁻¹, comprovando que as adaptações feitas no protocolo usado foram suficientes para gerar uma excelente concentração bacteriana.

Em relação ao tempo de armazenamento, a população bacteriana diminuiu em média 16% entre a inicial e a final (45° dia). Contrário ao observado neste trabalho, na literatura diversos autores relatam o aumento na população bacteriana em esferas encapsuladas após armazenamento. Schoebitz *et al.* (2016) relataram um aumento de 0,3% para *Azospirillum brasilense* e 6,1% para *Raoultella terrigena* quando adjuvantes como o amido foram adicionados. Sivakumar *et al.* (2014) citam densidades bacterianas estáveis após 5 meses de armazenamento quando a concentração de alginato foi de 2% carreando *Bacillus megaterium*. Reetha *et al.* (2014) em estudo comparativo da sobrevivência de *Azospirillum lipoferum* (MAZ-3) entre dois carreadores, a Lignita e o alginato de sódio, observaram que a população bacteriana inicial nos encapsulados foi de $4,81 \times 10^9$ UFC.g⁻¹ maior que no carreador controle (lignita). Os autores citam que armazenamento de 30 dias reduziu em 8% a população bacteriana quando o alginato de sódio foi usado como carreador, por outro lado, observaram um acréscimo de 24% na lignita.

Krell *et al.* (2016) observaram em esferas de alginato contendo esporos fúngicos (*M. brunneum*) desidratados por liofilização que a sobrevivência dos mesmos foi significativamente aumentada em alíquotas mantidas a 5-18°C. Bashan e Gonzalez (1999) relataram períodos de até 14 anos de conservação na viabilidade. Neste trabalho, a concentração bacteriana aos 30 dias foi da ordem de 10^5 UFC.mL⁻¹ e permaneceu deste modo até o 45° dia de avaliação. Esta diminuição pode ser possivelmente explicada pelo fato da ausência de adjuvantes ao carreador como ácido húmico, lactose ou amido, que poderiam contribuir para o aumento na sobrevivência bactéria (IVANOVA *et al.*, 2005; BASHAN *et al.*, 2014; MARCELINO *et al.*, 2016).

Neste trabalho também foi realizada a avaliação da viabilidade celular inoculada diretamente em plantas. Este método consiste da inoculação *in vitro*, isto é, extrair a população bacteriana diretamente do inoculante e colocá-la em contato com a

semente, e sem interferência de outros fatores, de modo a estimar se o período de armazenamento do inóculo afetou a microbiota que efetivamente colonizará a rizosfera da planta (CANADIAN FOOD INSPECTION AGENCY, 2016). Como resultados obtidos, a inoculação não promoveu aumentos significativos na altura ou comprimento de raiz, porém nos pesos frescos da parte aérea e radicular, a turfa promoveu os maiores incrementos. Estes resultados discordam dos obtidos por Sivakumar *et al.* (2014), que relataram aumentos significativos na parte aérea e radicular em sementes inoculadas com esferas contendo *Bacillus megaterium* em relação ao controle, demonstrando que o maior efeito na promoção do crescimento seja a estirpe bacteriana usada. No entanto, o encapsulamento não reduziu a viabilidade das UFC ao longo do período de armazenamento.

O processo de obtenção e a formulação de inoculantes são importantes passos na tecnologia de biofertilização. A obtenção de alternativas que possam estender o tempo de prateleira de inoculantes certamente reduzirá os custos desta biotecnologia, favorecendo o agricultor e o meio ambiente. Guimarães *et al.* (2013) evidenciam a necessidade de estudos quanto à viabilidade e qualidade dos inoculantes a partir de bactérias associativas devido ao fato de que apenas os inoculantes de leguminosas tem legislação própria aferindo a qualidade dos mesmos.

6 CONCLUSÃO

O protocolo usado de encapsulamento do inóculo pelo alginato de cálcio foi eficiente para gerar esferas de formato e tamanho homogêneos. O encapsulamento pelo alginato e a turfa apresentaram uma maior redução na população bacteriana a partir dos 15 dias de armazenamento e a população em ambos os carreadores foi atingiu 10^6 ao 45º dia. Em relação a viabilidade bacteriana, a inoculação não promoveu aumentos significativos na altura ou comprimento de raiz, porém nos pesos frescos da parte aérea e radicular a turfa promoveu os maiores incrementos possivelmente explicadas pela maior concentração de UFC.mL⁻¹.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBAREDA, M.; RODRIGUEZ-NAVARRO, D. N.; CAMACHO, M. TEMPRANO, F. J. Alternatives to peat as a carrier for rhizobia inoculant: solid and liquid formulations. **Soil Biol Biochem**, v. 40, p. 2771-2779. 2008.
- BARDI, L.; MALUSÀ, E. Drought and nutritional stresses in plant: alleviating role of rhizospheric microorganisms. In: Haryana N., Punj S (eds) Abiotic stress: new research. **Nova Science Publishers Inc**, Hauppauge, p. 1-57. 2012.
- BASHAN, Y. Inoculants of plant growth promoting bacteria for use in agriculture. **Biotechnology Advances**, v. 16, p. 729-770. 1998.
- BASHAN, Y.; Gonzalez, L.E. Long-term survival of the plant growth-promoting bacteria *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* in dry alginate inoculant. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, p. 262–266. 1999.
- BASHAN, Y.; de-BASHAN, L. E.; PRABHU, S. R. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). **Plant Soil**, v. 378, p. 1-33. 2014.
- BEN REBAH, F.B.; TYAGI, R.D.; Prevost, D. Wastewater sludge as a substrate for growth and carrier for rhizobia: the effect of storage conditions on survival of *Sinorhizobium meliloti*. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 145–151. 2002.
- BHATTACHARJEE, R. B.; SINGH, A.; MUKHOPADHYAY, S. N. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. **Applied Microbiological and Biotechnology**, v. 80, p. 199-209. 2008.
- BHATTACHARYYA, P.N. and JHA D.K. Plant growth -promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World J. Microbiol. Biotechnol**, v. 28, p. 1327–1350. 2011.
- CANADIAN FOOD INSPECTION AGENCY. Methods for Testing Legume Inoculant and Pre-Inoculated Seed Products (2005). Disponível em: <<http://www.inspection.gc.ca/plants/fertilizers/sampling-and-testing/methods-for-testing/eng/1308033966900/1308034369347>>. Acesso em: 22/11/2016.
- CANADIAN FOOD INSPECTION AGENCY. Disponível em: <<http://www.inspection.gc.ca/eng/1297964599443/1297965645317>>. Acesso em: 26/11/2016.

CASSIDY, M.B.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Environmental application of immobilized cells. **Journal of Industrial Microbiology**. v. 16, n. 2, p. 79–101. 1996.

CASTRO, L. H.; CURSINO, A. R.; BIAGGIO, R. M. BELTRAME JR, M. **Estudo dos componentes químicos da turfa**. In: X ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E VI ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO, Universidade do Vale do Paraíba, p. 198-200. 2003.

DÖBERREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Seropédica: Embrapa, p. 60. 1995.

DOUMIT, C. N.; BONATO, P.; WASSEN, R. *et al.* **Dual RNA-seq transcriptional analysis of wheat roots colonized by *Azospirillum brasilense* reveals up-regulation of nutrient acquisition and cell cycle genes**. Disponível em: <<http://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-15-378>>. Acesso em: 18/11/2016.

EL-FATTAH, D. A. A.; EWEDA, W. E.; ZAYED, M. S.; HASSANEIN, M. K. Effect of carrier materials, sterilization method, and storage temperature on survival and biological activities of *Azotobacter chroococcum* inoculant. **Annals of Agricultural Science**, v. 58, n. 2, p. 111–118. 2013.

EMBRAPA. XAVIER, G. R.; RUMJNEK, N. G.; GUEDES, R. E. Agência EMBRAPA de Informação Tecnológica. **Inoculante**. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/fejaoaupi/arvore/CONTAG01_2_2882007171552.html>. Acesso em: 19/11/2016.

FRANCHI, J. G. **Aplicação de turfa na recuperação de solos degradados pela mineração de areia**. 105 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mineral) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

FRANCHI, J.G. **A utilização de turfa como adsorvente de metais pesados**. 198 f. Dissertação (Doutorado) - Instituto de geociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. Os alginatos e suas múltiplas aplicações. **FOOD INGREDIENTS BRASIL**, v. 14, n. 26, p. 44-48. 2013.

- GLICK, B. R. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. **FEMS Microbiology Letters**, v. 251, n.1, p.1-7. 2005.
- GLICK, B. R. "Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications." **Scientifica 2012**. 2012.
- GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, V. L. D.; NETO, J.J. Viabilidade do inoculante turfoso produzido com bactérias associativas e molibdênio. **Revista Ciência Agronômica**, v. 44, n. 1, p. 10-15. 2013.
- HAY, I. D.; REHMAN, Z. U.; GHAFOR, A.; REHM, B. H. A. Bacterial biosynthesis of alginates. **J. Chem. Technological Biotechnology**, v. 85, p. 752-759. 2010.
- INSTITUTO DE PESQUISAS TECNOLÓGICAS DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Estudo das possibilidades de aproveitamento de turfa no Estado de São Paulo**. São Paulo, IPT, 1979. (Relatório 12761)
- IVANOVA, E.; TEUNOU, E.; PONCELET, D. **Alginate based macrocapsules as inoculants carriers for production of nitrogen biofertilizers**. In: BALKAN SCIENTIFIC CONFERENCE OF BIOLOGY IN PLOVDIV, 2005. Bulgaria. Department of Food Process Engineering - National High School of Food Technology: ENITIAA, 2005. p. 90-108.
- KATIYAR, V. e GOEL, R. Siderophore mediated plant growth promotion at low temperature by mutante of fluorescente pseudomonad. **Plant Growth Regulation**, v. 42, n. 3, p. 239-244. 2004.
- KHALID, A.; ARSHAD, M.; ZAHIR, Z. A. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, n. 3, p. 239-244. 2004.
- KRELL, V.; JAKOBS-SCHOENWANDT, D.; VIDAL, S.; PATEL, A. V. Encapsulation of endophytic *M. brunneum* for biological crop protection. **Bioencapsulation Research Group**, Bielefeld University of Applied Sciences, Germany, p. 10 e 11. Nov 2016.
- LIMA, A. M. F. **Estudo de propriedades físico-químicas de alginato de sódio, pectina e blendas em solução e no estado sólido com aplicação em sistema de liberação de fármacos**. 227 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

LOREDO-OSTI, C.; LÓPES-REYES, L.; ESPINOSA-VICTORIA, D. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas com gramíneas: Uma revisión. **TERRA Latinoamericana**, v. 22, n. 2, p. 225-239. 2004.

LYNCH, J.M. *The Rhizosphere*. Wiley-Interscience, Chichester, UK. (1990).

Disponível

em:<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470015902.a0000403.pub2/abstract?userIsAuthenticated=false&deniedAccessCustomisedMessage>>.

Acesso em:

11/11/2016.

MALUSÀ, E.; VASSILEV, N. A contribution to set a legal framework for biofertilizers. **Applied Microbiological and Biotechnology**, v. 98, p. 6599-6607. 2014.

MAPELLI, F.; MARASCO, R.; BALLOI, A., ROLLI, E.; CAPPITELLI, F.; DAFFONCHIO, D.; BORIN, S. Mineral-microbe interactions: biotechnological potential of bioweathering. **Journal of biotechnology**, v. 157, n. 4, p. 473-481. 2012.

MARCELINO, P. R. F.; MILANI, K. M. L.; MALI, S.; SANTOS, O. J. A. P. dos; OLIVEIRA, A. L. M. de. Formulations of polymeric biodegradable low-cost foam by melt extrusion to deliver plant growth-promoting bacteria in agricultural systems. **Applied Microbiological and Biotechnology**, v. 100, p. 7323-7338. 2016.

MARTINO, F. S.; KURTH, G. M. Turfa – um combustível à espera de utilização. **Energia – Fontes Alternativas**, v. 20, n. 4, p. 64-71. 1982.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Regras para Análise de Sementes**, 399 p. 2009.

MOUTIA, J. F. Y.; UMRIT, G.; SAUMTALLY, A. S. et al. The role of diazotrophic bacteria in the nitrogen nutrition of sugar cane in Mauritius: Preliminary results. **AMAS 2003. Food and Agricultural Research Council, Réduit, Mauritius.**, p. 29-39. 2003.

NEHRA, V.; CHOUDHARY, M. A review on plant growth promoting rhizobacteria acting as bioinoculants and their biological approach towards the production of sustainable agriculture. *Journal of Applied and Natural Science*, v. 7, n. 1, p. 540-556. 2015.

OWEN, D.; WILLIAMS, A. P.; GRIFFITH, G. W.; WITHERS, P. J. A. Use of commercial bio-inoculants to increase agricultural production through improved phosphorus acquisition. **Appl Soil Ecol**, v. 84, p. 41-54. 2015.

- PEDRAZA, R. O. Recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, n. 1, p. 25-35. 2008.
- REETHA. D., KUMARESAN. G AND JOHN MILTON. D. Studies to improve the shelf life of *Azospirillum lipoferum* immobilized in alginate beads. **International Journal of Recent Scientific Research**, v. 5, n. 12, p. 2178-2182. 2014.
- REKHA, P.D.; LAI, W.-A.; ARUN, A.B.; YOUNG, C.C. Effect of free and encapsulated *Pseudomonas putida* CCFR2- 4 and *Bacillus subtilis* CC-pg104 on plant growth under gnotobiotic conditions. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 447-451. 2007.
- RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA Jr., V. A.; VICTOR, O. Meio simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *Citri* Tipo B. **Summa Phytopatologica**, v.12, p. 16. 1986.
- ROMEIRO, R. S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa (UFV), 2001. 279 p.
- ROY, M.; SAHA, S.; DAS, J.; SRIVASTAVA, R.C. Technologies of microbial inoculation in rice – A Review. **Agricultural Review**, v. 36, n. 2, p. 125-132. 2015.
- RYAN, R. P.; GERMAING, K.; FRANKS, A.; RYAN, D. J.; DOWLING, D. N. Bacterial endophytes: recent developments and applications. **FEMS – Microbiology Letters**, v. 278, p. 1-9. 2007.
- SALA, V. M. R.; FREITAS, S. D. S.; DONZELI, V. P. et al. Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, p. 345-352. 2005.
- SHOEBITZ, M.; BELCHI, M. D. L. Immobilization of soil-beneficial microorganisms. **Bioencapsulation Research Group**, Facultad de Agronomía, Universidade de Concepción, Chile, p. 10 e 11. May 2016.
- SIVAKUMAR, P. K., PARTHASARTHI, R.; LAKSHMIPRIYA, V. P. Encapsulation of plant growth promoting inoculant in bacterial alginate beads enriched with humic acid. **International Journal of Currenty Microbiology Applied Sciences**, v. 3, n. 6, p. 415-422. 2014.

- SPAEPEN, S.; DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A. et al. Effects of *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. **Plants and Soil**, v. 312, n. 1, p. 15-23. 2008.
- TAURIAN, T.; ANZUAY, M. S.; ANGELINI, J.G. et al. Phosphate-solubilizing peanut associated bacteria: screening for plant growth-promoting activities. **Plant Soil**, v. 329, p. 421-431. 2010.
- TIMMUSK, S.; EL-DAIM, I. A. A.; COPOLOVICI, L.; TANILAS, T.; KÄNNASTE, A.; BEHERS, L., et al. Drought-tolerance of wheat improved by rhizosphere bacteria from harsh environments: enhanced biomass production and reduced emissions of stress volatiles. **Plos one**, v. 9, n. 5, p. 13. 2014.
- VAN ELSAS, J. D. & HEIJNEN, C. E. Methods for the introduction of bacteria into soil: a review. **Biol. Fertil. Soils**, v. 10, p. 127-133. 1990.
- VAN VEEN, J.A.; OVERBEEK, L.S.; VAN ELSAS, J.D. Fate and activity of microorganisms introduced into soil. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** v. 61, n. 2 p. 121-135. 1997.
- VASSILEV, N.; VASSILEVA, M.; AZCON, R.; MEDINA, A. Application of free and Ca-alginate entrapped *Glomus deserticola* and *Yarrowia lipolytica* in soil-plant system. **Journal of biotechnology**, v. 91, p. 237-242. 2001.
- VASSILEV, N.; VASSILEVA, M.; LOPEZ, A. MARTOS, V.; REYES, A.; MAKSIMOVIC, I.; EICHLER-LÖBERMANN, B.; MALUSÀ, E. Unexploited potential of some biotechnological techniques for biofertilizer production and formulation. **Applied Microbiological and Biotechnology**, v. 99, p. 4983-4996. 2015.
- VIJI, G.; UDDIN, W.; ROMAINE, C.P. Suppression of gray leaf spot (blast) of perennial ryegrass turf by *Pseudomonas aeruginosa* from spent mushroom substrate. **Biol. Control.**, v. 26, p. 233-243. 2003.
- WANI, P. A.; KHAN, M. S.; ZAIDI, A. Effect of metal tolerant plant growth promoting *Bradyrhizobium sp.* (vigna) on growth, symbiosis, seed yield and metal uptake by greengram plants. **Chemosphere**, v. 70, p. 36-45. 2007.
- YANG, J.; KLOEPPER, J. W.; RYU, C. M. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. Trends in **Plant Science**, v. 14, p. 1-4. 2009.

YOUNG, C. C.; REKHA, P. D.; LAI, W. A.; ARUN, A. B. Encapsulation of plant growth-promoting bacteria in alginate beads enriched with humic acid. **Biotechnology Bioeng**, v. 95, p. 76-83. 2006.

ZAHIR, Z.A.; ARSHAD, M.; FRANKENBERGER, W. T. Jr. Plant growth promoting rhizobacteria: applications and perspectives in agriculture. **Advances in Agronomy**, v. 81, p. 97–168. 2004.