

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SHARLINI LAÍS ZAGO



**EFEITO DO ENCAPSULAMENTO NA CONSERVAÇÃO DE *Azospirillum*
*brasilense***

PALOTINA

2017

SHARLINI LAÍS ZAGO

**EFEITO DO ENCAPSULAMENTO NA CONSERVAÇÃO DO *Azospirillum*
*brasilense***

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Tecnologia de Bioprodutos Agroindustriais, no Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Bioprodutos Agroindustriais, Setor de Palotina, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Eliane Cristina Gruszka Vendruscolo

PALOTINA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Z13 Zago, Sharlini Laís
Efeito do encapsulamento na conservação de
Azospirillum brasilense / Sharlini Laís Zago
-- Palotina, 2017
70f.

Orientadora: Eliane Cristina Gruszka Vendruscolo
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do
Paraná, Setor Palotina, Programa de Pós-graduação em
Bioprodutos Agroindustriais, no Curso de Pós- Graduação
em Tecnologia de Bioprodutos Agroindustriais.

1. BPCV. 2. Encapsulamento. 3. Inoculação.
I. Vendruscolo, Eliane Cristina Gruszka. II. Universidade
Federal do Paraná. III. Título.

CDU 631.5



TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em TECNOLOGIAS DE BIOPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **SHARLINI LAIS ZAGO** intitulada: **EFEITO DO ENCAPSULAMENTO NA CONSERVAÇÃO DE *Azospirillum brasilense***, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua Aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

PALOTINA, 30 de Junho de 2017.

ELIANE CRISTINA GRUSZKA VENDRUSCOLO

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

FABIANO BISINELLA SCHEUFELÉ

Avaliador Externo (UFPR)

ROBSON FERNANDO MISSIO

Avaliador Interno (UFPR)

Aos meus pais e irmãos, e ao meu namorado, que estiveram sempre ao meu lado, me ajudando e incentivando, e acreditaram em mim.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, criador de tudo e que me abençoa a cada dia com a dádiva da vida, que me dá forças para continuar seguindo em frente, sempre renovando meus ânimos e fortalecendo-me. Muito obrigada Senhor!

À minha família, mãe Tânia, pai Vanderlei, irmãos Marlova, Tanivan e Milena, agradeço por estarem sempre ao meu lado, rezando por mim, me apoiando, dando-me forças e me incentivando para que eu pudesse atingir meus objetivos. Muito obrigada família querida, sem vocês nada disso seria possível, amo muito todos vocês!

Ao meu namorado Rubens Sthêfan Castilho dos Santos, por estar sempre ao meu lado, sendo sempre um grande ajudante, companheiro e amigo, nos bons e maus momentos. Muito obrigada, você é muito importante para mim, te amo muito. Aproveito também, para agradecer toda a sua família, que mesmo de longe tem me acompanhado nessa trajetória e me incentivado sempre.

A dupla dinâmica, orientadora Prof.^a Dra. Eliane Cristina Gruszka Vendruscolo e Prof.^a Dra. Marise Fonseca dos Santos pela ajuda fornecida, sempre muito atenciosas, orientando-me de forma muito competente, para que o desenvolvimento do trabalho fosse sempre o melhor possível. Muito obrigada professoras, vocês são profissionais exemplares!

As companheiras e amigas que o mestrado me trouxe Aline Snak, Adeline Neiverth, Fernanda Cripa, e tantos outros que passaram pelo Labiogen que direta ou indiretamente contribuíram para que esse projeto fosse cumprido com êxito. Agradeço pela ajuda sem medir esforços, por fazerem parte da minha vida, sendo sempre ótimas companheiras e por me proporcionarem momentos únicos, que sempre serão lembrados. Muito obrigada por tudo, sem vocês, com certeza, nada teria sido possível!

Aos meus queridos amigos e professores Adriana Fiorini e Fabio Rosado, por terem a paciência e boa vontade de me ensinar os procedimentos ligados a sua rotina e estarem sempre dispostos a me ajudar, agradeço também, aos conselhos que vão além do conhecimento técnico, que levarei para a minha vida. Vocês são extraordinários!

A Nitro 1000, empresa parceira, em especial aos senhores Amarildo J. Rozetti, Iris A. Guindani e Rubens E. V. Munhoz, pela ajuda, disponibilidade e confiança que depositaram em mim, muito obrigada. Obrigada por abrirem as portas da empresa e me proporcionarem aprender a rotina da indústria de inoculantes, dando suporte a pesquisa, enriquecendo e acrescentando muito ao meu período como mestranda.

Por ultimo, mas não menos importante, agradeço a equipe Laborcentro, por sempre me apoiar e me ajudar a fazer dar certo, muito obrigada. À UFPR – Setor Palotina e todos os seus funcionários, em especial ao laboratório LABIOGEN, por abrir suas portas, e dar todo o suporte necessário para minha pesquisa. Muito obrigada.

“Deus dá as batalhas mais difíceis
aos seus melhores soldados.”

(Papa Francisco, 2016)

RESUMO

As bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) colonizam a rizosfera das espécies vegetais e conferem benefícios às plantas como, produção de fitohormônios, maior disponibilização de macro e micronutrientes e redução na susceptibilidade a doenças causadas por patógenos. A resposta associativa de plantas x bactérias depende de vários fatores entre os quais, genótipo vegetal, estirpe bacteriana, condições de cultivo e inoculação entre outros. Um dos métodos mais bem sucedidos, para a introdução de bactérias no solo são os inoculantes, que consistem na unificação de um carreador com o micro-organismo, que além de introduzir os microrganismos no solo ainda ajudam a aumentar a taxa de sobrevivência, protegendo-os contra muitos estresses ambientais. Atualmente, vários carreadores têm sido estudados, a turfa é o mais comum. Uma outra alternativa que vem sendo estudada é a utilização de encapsulamento com alginato de sódio e a associação deste com alguns aditivos, a fim de melhorar a eficiência da inoculação de plantas com as BPCV. O presente trabalho teve como objetivo estudar e desenvolver a formulação de bioinoculantes à base de alginato de sódio com *Azospirillum brasilense* avaliando a associação do alginato de sódio com alguns aditivos como o ácido húmico e a trehalose a fim de descobrir estirpes que sejam mais competentes na associação planta x bactéria e identificar o aditivo que confira melhor desempenho as bactérias na inoculação das plantas. O encapsulamento de *Azospirillum brasilense* foi realizado pelo método de gelificação ionotrópica por extrusão. As esferas confeccionadas foram avaliadas em 7 datas após o encapsulamento. Foram inoculadas plantas de trigo cv. CD 104 da COODETEC para comprovar a eficiência do processo de encapsulamento na proteção das bactérias e liberação das mesmas para associação com as plantas. O protocolo de encapsulamento de alginato de sódio a 3% foi capaz de gerar grânulos homogêneos e sustentar o crescimento e a viabilidade celular de *A. brasilense* por 30 dias. A turfa continua sendo um excelente carreador para a população bacteriana permitindo uma melhor a sobrevivência das células bacterianas. O uso de aditivos na composição dos formulados foi eficiente para melhorar a viabilidade celular durante o armazenamento. Destaca-se a trealose 1M que promoveu a maior população epifítica até o 7º dia de encapsulamento. O ácido húmico foi eficiente para melhorar a viabilidade celular até o 14º dia de armazenamento. Após 30 dias de armazenamento, a densidade populacional das diferentes formulações estabilizou em aproximadamente 10^7 UFC mL⁻¹. Nenhum dos tratamentos obteve diferenças significativas em todas as datas de avaliação, para as variáveis comprimento e peso de raiz demonstrando que a promoção de crescimento vegetal diretamente avaliada na planta é passível de ser modificada por outras variáveis, não correspondendo efetivamente à população bacteriana disponível no solo. O processo de encapsulamento por meio do uso de alginato de sódio apesar de promover as maiores perdas na sobrevivência bacteriana nos primeiros dias de armazenamento, promoveu os maiores aumentos na viabilidade celular durante o armazenamento. O encapsulamento e o uso da trealose como aditivo foram efetivos para garantir a sobrevivência e viabilidade bacteriana, mostrando resultados aproximados e superiores, respectivamente, aos obtidos na turfa.

Palavras-chave: BPCV. Encapsulamento. Inoculação.

ABSTRACT

Plant growth promoting bacteria (PGPB) colonize the rhizosphere of plant species and confer benefits to plants such as phytohormones production, greater availability of macro and micronutrients and reduction in susceptibility to diseases caused by pathogens. The associative response of plants to bacteria depends on several factors including plant genotype, bacterial strain, culture conditions and inoculation among others. One of the most successful methods for the introduction of bacteria into the soil is inoculants, which consist of the unification of a carrier with the microorganism, which in addition to introducing the microorganisms in the soil still help to increase the survival rate, Against many environmental stresses. Currently, several carriers have been studied, peat is the most common. Another alternative that has been studied is the use of encapsulation with sodium alginate and the association of this with some additives, in order to improve the efficiency of inoculation of plants with PGPB. The present work aimed to study and develop the formulation of bioinoculants based on sodium alginate with *Azospirillum brasilense* evaluating the association of sodium alginate with some additives such as humic acid and trehalose in order to discover strains that are more competent in the association Plant x bacteria and identify the additive that best assures the bacteria in the inoculation of plants. The encapsulation of *Azospirillum brasilense* was performed by the ionotropic gelation method by extrusion. The prepared spheres were evaluated on 7 dates after the encapsulation. Plants of wheat cv. CD 104 from COODETEC to prove the efficiency of the encapsulation process in protecting the bacteria and releasing them for association with the plants. The 3% sodium alginate encapsulation protocol was able to generate homogeneous granules and sustain the growth and cellular viability of *A. brasilense* for 30 days. Peat remains an excellent carrier for the bacterial population allowing better survival of bacterial cells. The use of additives in the formulation composition was efficient to improve cell viability during storage. We emphasize the trehalose 1M that promoted the largest epiphytic population until the 7th day of encapsulation. Humic acid was efficient to improve cell viability until the 14th day of storage. After 30 days of storage, the population density of the different formulations stabilized at approximately 10^7 CFU mL⁻¹. None of the treatments obtained significant differences in all the evaluation dates, for root length and root weight variables, demonstrating that the plant growth promotion directly evaluated in the plant can be modified by other variables, not effectively corresponding to the available bacterial population in the soil. The encapsulation process through the use of sodium alginate despite promoting the greatest losses in bacterial survival in the first days of storage promoted the greatest increases in cell viability during storage. The encapsulation and the use of trehalose as an additive were effective to guarantee the survival and bacterial viability, showing approximate results and superior, respectively, to those obtained in the peat.

Key-words: PGPB. Encapsulation. Inoculation.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESTRUTURA QUÍMICA DO ALGINATO.....	27
FIGURA 2 – ASPECTO DAS ESFERAS DE INOCULANTES OBTIDAS ATRAVÉS DE DIFERENTES CARREADORES.....	38
FIGURA 3 – ELETROMICROFOTOGRAFIAS DO ASPECTO SUPERFICIAL EXTERNO E INTERNO DAS ESFERAS.....	41
FIGURA 4 – ANÁLISE DE REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE CONFIRMANDO A PRESENÇA DE <i>A. brasiliense</i> NAS AMOSTRAS COLETAS EM DIFERENTES PERÍODOS DE ARMAZENAMENTO.....	50

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - DENSIDADE BACTERIANA OBSERVADA NAS ESFERAS DE ALGINATO DE CÁLCIO 3%.....	44
GRÁFICO 2 - DENSIDADE BACTERIANA OBSERVADA NAS ESFERAS ADITIVADAS COM ÁCIDO HÚMICO 0,8%.....	45
GRÁFICO 3 - DENSIDADE BACTERIANA OBSERVADA NAS ESFERAS ADITIVADAS COM TREALOSE 0,1M.....	47
GRÁFICO 4 - DENSIDADE BACTERIANA OBSERVADA NAS ESFERAS ADITIVADAS COM TREALOSE 0,5M.....	48
GRÁFICO 5 - DENSIDADE BACTERIANA OBSERVADA NAS ESFERAS ADITIVADAS COM TREALOSE 1M.....	49
GRÁFICO 6 - DENSIDADE BACTERIANA EPIFÍTICA ADERIDA ÀS PLÂNTULAS DE TRIGO APÓS A INOCULAÇÃO COM ESFERAS DE ALGINATO DE CÁLCIO 3%.....	51
GRÁFICO 7 - DENSIDADE BACTERIANA EPIFÍTICA ADERIDA ÀS PLÂNTULAS DE TRIGO APÓS A INOCULAÇÃO COM ESFERAS ADITIVADAS COM ÁCIDO HÚMICO 0,8%.....	52
GRÁFICO 8 - DENSIDADE BACTERIANA EPIFÍTICA ADERIDA ÀS PLÂNTULAS DE TRIGO APÓS A INOCULAÇÃO COM ESFERAS ADITIVADAS COM TREALOSE 0,1M.....	53
GRÁFICO 9 - DENSIDADE BACTERIANA EPIFÍTICA ADERIDA ÀS PLÂNTULAS DE TRIGO APÓS A INOCULAÇÃO COM ESFERAS ADITIVADAS COM TREALOSE 0,5M.....	54
GRÁFICO 10 - DENSIDADE BACTERIANA EPIFÍTICA ADERIDA ÀS PLÂNTULAS DE TRIGO APÓS A INOCULAÇÃO COM ESFERAS ADITIVADAS COM TREALOSE 1M.....	55

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - EXEMPLOS DE ALGUMAS EMPRESAS BRASILEIRAS E SEUS PRODUTOS À BASE DE <i>Azospirillum brasilense</i>	2
TABELA 2 - ANÁLISES MORFOMÉTRICAS DOS GRÂNULOS GERADOS COM O INÓCULO DE <i>A. brasilense</i> APÓS 1 DIA DE ENCAPSULAMENTO.....	39
TABELA 3 - ESPECTROMETRIA DE RAIOS X POR ENERGIA DISPERSIVA (EDS) DAS ESFERAS ENCAPSULADAS COM ALGINATO DE CÁLCIO E DIFERENTES ADITIVOS.....	42
TABELA 4 - POPULAÇÃO BACTERIANA DAS ESFERAS NO DIA 0.....	43
TABELA 5 - POPULAÇÃO EPÍFITICA DAS RAÍZES DE TRIGO OBTIDAS NO DIA 0.....	50
TABELA 6 - CRESCIMENTO RADICULAR DAS PLÂNTULAS DE TRIGO A PARTIR DA INOCULAÇÃO COM DIFERENTES FORMULAÇÕES EM DIFERENTES PERÍODOS DE ARMAZENAGEM.....	5

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A – Alginato

A + 0,1 M – Alginato aditivado com trealose 0,1 M

A + 0,5 M – Alginato aditivado com trealose 0,5 M

A + 1 M – Alginato aditivado com trealose 1 M

A + A.H – Alginato aditivado com ácido húmico

ACC - 1-aminociclopropano-1-carboxilato

ANPII - Associação Nacional dos Produtores e Importadores de Inoculantes

Azo. – *Azospirillum brasilense*

B.O.D - Estufas Incubadoras para demanda bioquímica de Oxigênio

BPCV - Bactéria Promotora de Crescimento Vegetal

BSE - Backscattering

CD - COODETEC

DNA – Ácido desoxirribonucleico

Dntp – Desoxinucleotídeos

EDS - Espectrometria de Raios X por Energia Dispersiva

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

Nfb-L - Novo Fabio Pedrosa - Lactato

PCR - Reação em cadeia da Polimerase

pH - Potencial hidrogeniônico

rpm – Rotação por minuto

T - Turfa

TBE – Tampão composto por Tris-base, ácido bórico e EDTA

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

LISTA DE SÍMBOLOS

μ - Micro

α - Alfa

β - Beta

$^{\circ}\text{C}$ - Graus celsius

% - Percentagem

® - Marca registrada

™ – Trade Mark

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	JUSTIFICATIVA	15
1.2	OBJETIVOS.....	15
1.2.1	Objetivos Específicos	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO	16
2.2	INOCULANTES	18
2.3	IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DOS BIOFERTILIZANTES E INOCULANTES	21
2.4	IMOBILIZAÇÃO MICROBIANA.....	23
2.5	CARREADORES.....	25
2.6	TURFA.....	26
2.7	ALGINATO.....	27
2.8	ÁCIDO HÚMICO.....	29
2.9	TREALOSE.....	30
2.10	OUTROS ADITIVOS	31
3	MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1	MANUTENÇÃO E CULTIVO DA CEPA BACTERIANA.....	31
3.2	ENCAPSULAMENTO E FORMULAÇÃO DA BASE DO GEL BIOINOCULANTE	32
3.3	INOCUIDADE DAS ESFERAS ENCAPSULADAS	33
3.4	MENSURAÇÃO DE TAMANHO E PESO DOS GRÂNULOS.....	33
3.5	EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO.....	34
3.6	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	34
3.7	ESPECTROMETRIA DE RAIOS X POR ENERGIA DISPERSIVA (EDS)	34
3.8	AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA DAS CÉLULAS VIÁVEIS OU CONTAGEM MICROBIANA.....	34
3.9	CONFIRMAÇÃO MOLECULAR DA PRESENÇA DA ESTIRPE <i>A.</i> <i>brasiliense</i>	35
3.10	VIABILIDADE E LIBERAÇÃO DE <i>A. brasiliense</i> APÓS INOCULAÇÃO DE SEMENTES DE TRIGO	36
3.11	AVALIAÇÃO DA POPULAÇÃO EPIFÍTICA BACTERIANA.....	36

3.12	AVALIAÇÃO DE BIOMASSA FRESCA E MENSURAÇÃO DE TAMANHO DAS PLÂNTULAS	37
3.13	ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1	ENCAPSULAMENTO DE <i>A. brasilense</i> EM MATRIZ DE ALGINATO DE SÓDIO.....	37
4.1.1	ASPECTOS MORFOMÉTRICOS DOS GRÂNULOS FORMADOS.....	37
4.1.2	SOBREVIVÊNCIA DE <i>A. brasilense</i> NAS ESFERAS.....	42
4.2	CONFIRMAÇÃO MOLECULAR DA PRESENÇA DA ESTIRPE <i>A. brasilense</i>	49
4.3	VIABILIDADE DE <i>A. BRASILENSE</i> DURANTE O PERÍODO DE ARMAZENAMENTO.....	50
4.4	PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL PELA INOCULAÇÃO DE PLÂNTULAS DE TRIGO COM <i>A. brasilense</i>	56
5	CONCLUSÕES	59
	REFERÊNCIAS	60

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 (GLICK, 2012; BHATTACHARYYA & JHA, 2012; SIVAKUMAR; PARTHASARTHI; LAKSHMIPRIYA, 2014; VEJAN *et al.*, 2016).

A espécie *Azospirillum brasilense* tem potencial para uma associação benéfica com cereais e é capaz de promover o crescimento das plantas e incrementar a produtividade (ALAMRI *et al.*, 2009; CAMILIOS-NETO *et al.*, 2014; NAIMAN; LATRÓNICO; GARCÍA DE SALAMONE, 2009), inclusive sob condições de estresse abiótico (ARZANESH *et al.*, 2011; CREUS *et al.*, 2004). Deste modo, a inoculação com estirpes de *A. brasilense* Ab-V5 e Ab-V6 é agronomicamente recomendada principalmente para as poaceas.

A produção mundial de alimentos está alicerçada no uso extensivo 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: devem promover o crescimento bacteriano; manter as células viáveis por um certo período de tempo e 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; PARTHASARTHI; LAKSHMIPRIYA, 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 e 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 (REETHA *et al.*, 2014; SCHOEBITZ; LÓPEZ; ROLDÁN, 2013).

Inoculantes turfosos são amplamente comercializados para diversas culturas vegetais. A turfa tem grande capacidade de adsorção de água, promovendo um microambiente favorável ao crescimento e manutenção celular (KALJEET; KEYEO; AMIR, 2011). Porém, tem como desvantagens pouca proteção aos estresses provocados pelo armazenamento ou ainda estresses ambientais causados às bactérias após a inoculação (BASHAN 1998; HUBER *et al.*, 1989)

Alternativas que visem a extensão da viabilidade bacteriana e o tempo de prateleira são importantes para o surgimento de um maior número de tipos de inoculantes carreando diferentes espécies bacterianas promotoras de crescimento vegetal em diferentes espécies. 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). O hidrogel é formado pelo alginato de sódio complexado a íons de Ca^{+2} por meio do processo de gelificação ionotrópica (BUREY *et al.*, 2008). O alginato é um polímero natural composto de ácido β (1 \rightarrow 4) D-manurônico e ácido α (1 \rightarrow 4) 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 pode aumentar a taxa de sobrevivência e facilita a maior disponibilização bacteriana pela manutenção de um número maior de células viáveis nesta matriz gelatinosa por um maior período para as plantas. Após inoculação, esta matriz gelatinosa se degradaria no ambiente lentamente liberando as bactérias e não causando perturbação ao ecossistema (CASSIDY *et al.*, 1996; REETHA *et al.*, 2014; VASSILEV *et al.*, 2015).

Aditivos associados ao encapsulamento poderiam potencializar a sobrevivência e a liberação de bactérias do inoculante. O ácido húmico, com alto peso molecular e aspecto coloidal tem demonstrado ser eficiente na melhoria da sobrevivência dos micro-

organismos encapsulados (REETHA *et al.*, 2014; YOUNG *et al.*, 2006). A trealose, que é um dissacarídeo, pode ser uma provável fonte de energia e proteção para as bactérias, uma vez que já é utilizada com fonte de energia para leveduras e proteção para proteínas e membranas celulares.

1.1 JUSTIFICATIVA

As inconstâncias nos resultados da utilização de BPCV como inoculantes encapsulados, os diversos materiais e mecanismos para a sua produção, a eficiência da unificação entre o carreador e o micro-organismo, a especificidade de interação entre a bactéria x planta, assim como de fatores bióticos e abióticos que interferem na inoculação da planta fazem com que os estudos sobre encapsulamento e a performance dos inoculantes sejam cruciais para a recomendação e uso em escala comercial dos mesmos. A investigação quantitativa e qualitativa das interações bactéria - carreador e inoculante - planta podem contribuir para a melhoria da eficiência de inoculação pelo fato de os que os parâmetros associativos e de viabilidade destes não estarem completamente compreendidos.

1.2 OBJETIVOS

Estabelecer um protocolo de encapsulamento de inóculo bacteriano de *A. brasilense*.

Identificar e avaliar a eficiência de veículos como alginato de sódio e turfa, além de algumas combinações como alginato de sódio e ácido húmico, alginato de sódio e trealose, em 3 diferentes concentrações na viabilidade celular num período de 30 dias..

Identificar e avaliar as condições de sobrevivência da bactéria, *Azospirillum brasilense*, diante da quantidade de dias de armazenagem.

Caracterização das melhores respostas à inoculação de genótipos de trigo com estirpes bacterianas em condições *in vitro* e determinação de parâmetros associativos e de viabilidade.

1.2.1 Objetivos Específicos

- a. Encapsulamento de células bacterianas de *Azospirillum brasilense*.
- b. Avaliação do tempo de prateleira e uso de carreadores das bactérias nas sementes inoculadas.
- c. Avaliação da população epifítica aderida às raízes de plântulas de trigo.
- d. Avaliação da biomassa fresca, das raízes de plântulas de trigo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO

As bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) ou rizobactérias são bactérias vivas isoladas de solos e culturas que colonizam a superfície da raiz ou espaços intercelulares da planta hospedeira. Estas, frequentemente melhoram o estabelecimento da raiz e estimulam o crescimento do hospedeiro, além de conferir alterações físicas ou químicas relativas à indução de resistência na planta de forma a suprimir doenças (BASHAN *et al.*, 2002; PARKETAL, 2005; LUGTENBERG e KAMILOVA 2009; SCHOEBITZ *et al.*, 2009; BHATTACHARYYA & JHA, 2012).

Nesse sentido, as BPCV têm relevante papel no desenvolvimento de uma agricultura sustentável para a produção de culturas (BASHAN *et al.*, 2004; RIVERA-CRUZ *et al.*, 2008). Estes mecanismos de promoção de crescimento vegetal por meio de BPCV permanecem de modo especulativo, porém algumas explicações incluem:

- 1) A produção de hormônios como o ácido abscísico, ácido giberélico, citocininas e auxinas (SOUZA; AMBROSINI; PASSAGLIA, 2015);
- 2) Produção de enzimas essenciais, 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminase para reduzir os níveis de etileno na raiz durante o desenvolvimento de plantas (GLICK, 2005);
- 3) Indução de resistência sistêmica por compostos produzidos por bactérias;
- 4) Solubilização de fosfatos contribuindo com a nutrição vegetal (GLICK, 2012);
- 5) Formação de biofilme bacteriano ou matriz extracelular que pela presença de macromoléculas (açúcares, oligo e polissacarídeos) aumentam a hidratação e nutrição da raiz (TIMMUSK, 2014; YANG, 2009);

6) Melhoria na textura e estrutura dos solos (MAPELLI *et al.*, 2012);

7) Fixação de nitrogênio não-simbiótico (PEDRAZA, 2008).

Uma série de espécies bacterianas pertencentes a vários gêneros estão associadas à rizosfera da planta e são capazes de exercer um efeito benéfico sobre seu crescimento (VEJAN *et al.*, 2016). O nitrogênio é o nutriente mais importante para o crescimento e a produtividade das plantas. No entanto, o N₂ atmosférico não é assimilável pelas plantas e através da fixação biológica de nitrogênio (BNF), realizada por micro-organismos esse N₂ é convertido em amônia (BISWAS e GRESSHOFF, 2014), e então pode ser utilizado pelas plantas. Os organismos de fixação de nitrogênio são geralmente classificados como:

1) Bactérias simbióticas de fixação de N₂, incluindo membros da família de rizobiaceae que forma simbiose com plantas de leguminosas (por exemplo, *Rhizobium*) (AHEMAD e KHAN, 2012) e árvores não leguminosas (por exemplo, *Frankia*);

2) Formas de fixação de nitrogênio não simbióticas (vida livre, associativas e endófitas), como cianobactérias (*Anabaena*, *Nostoc*), *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Gluconoacetobacter diazotrophicus* e *Azocarus* etc. (BHATTACHARYYA e JHA, 2012).

As bactérias diazotróficas de vida livre pertencentes aos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia*, dentre outras, podem ser as responsáveis pela entrada de N₂ nos agroecossistemas, uma vez que estas bactérias podem aumentar o desenvolvimento do sistema radicular e melhorar a aquisição de nutrientes, incluindo N₂.

Azospirillum sp. é uma proteobacteria, de vida livre, com motilidade, Gram variável e aeróbica que pode promover crescimento vegetal através da associação benéfica com plantas (ARZANESH *et al.*, 2011; ILYAS; BANO, 2010; KENNEDY *et al.*, 1997). Diversas espécies deste gênero foram citadas como promotoras de crescimento em plantas: *A. lipoferum*, *A. amazonense*, *A. brasilense*, *A. halopraeferens* e *A. irakense* (BHARDWAJ *et al.*, 2014). Segundo Camilios-Neto (2014), *Azospirillum* é um dos gêneros mais promissores, para uso extensivo na agricultura, na forma de inoculantes comerciais. Hartmann e Bashan (2009) citam que a espécie *Azospirillum brasilense* é a espécie mais utilizada para compor inoculantes recomendados para gramíneas em vários países, incluindo Argentina, México, Índia, Itália, França e Coréia.

2.2 INOCULANTES

Costumeiramente, inoculantes e biofertilizantes são descritos como termos sinônimos na literatura definindo-os como qualquer produto formulado contendo um ou mais micro-organismos e que aumenta o status nutricional (crescimento e produtividade) das plantas pela reposição dos nutrientes do solo ou pela provisão de uma maior disponibilidade de nutrientes para as plantas (BASHAN, 2014; CALLAGHAN, 2016; GARCIA-FRAILE *et al.*, 2015; MALUSÁ & VASSILEV, 2014).

O estado do Paraná emitiu o decreto nº 6710 (Diário Oficial do Paraná, 1990) que faz uma melhor distinção entre os termos, biofertilizante: que é definido como produto que contenha substâncias orgânicas ou minerais, provenientes de atividade biológica, com a finalidade de melhorar direta ou indiretamente o desenvolvimento das plantas. Exemplos de biofertilizantes seriam todos os tipos de resíduos agrícolas, palhada, compostagem, esterco animal, cama de aviário, etc. Inoculante: que é definido como qualquer substância que contenha micro-organismos com atuação favorável ao desenvolvimento vegetal. Em resumo, o inoculante seria basicamente uma população bacteriana carreada em uma matriz compatível que permita a manutenção da viabilidade celular.

Os micro-organismos presentes nos inoculantes quando adicionados ao solo, sofrem um estresse por diversos fatores: falta de água, alagamento, salinidade, pH desfavorável, adsorção às partículas do solo e lavagem pelas águas das chuvas. Além disso, podem sofrer a competição com outros micro-organismos nativos do solo, mais bem adaptados, provocando um declínio na densidade de bactérias inoculadas e diminuindo a resposta positiva na associação com as plantas (BASHAN, 1986; GUO *et al.*, 2012; YOUNG *et al.*, 2006).

A fim de proporcionar um microambiente mais adequado para a sobrevivência das bactérias no solo, a imobilização e o encapsulamento de células bacterianas têm sido amplamente utilizados na indústria (KIM *et al.*, 1996). Desta forma, o inoculante deve proporcionar uma apropriada formulação evitando o rápido declínio dos micro-organismos introduzidos e extendendo o seu tempo de prateleira (JOHN *et al.*, 2011).

Os inoculantes comerciais foram primeiramente introduzidos em 1896 usando culturas de *Rhizobium* que eram crescidos em vidros achatados, contendo uma porção de meio gelatinosos (SMITH, 1992). Outras formulações descritas na

literatura continham solo esterilizado, células secas de *Rhizobium* em algodão ou ainda eram em forma líquida (SMITH,1997).

A formulação do inoculante é crucial para o sucesso do agente biológico (SCHOEBITZ; LÓPEZ; ROLDÁN, 2013). Conceitua-se como formulação, o processo laboratorial ou industrial de unificar o carreador com o agente biológico (bactérias ou micro-organismos) (BASHAN, 1998; O'CALLAGHAN, 2016). Os inoculantes podem ser encontrados no mercado em diversas formas:

1) Pó: forma mais comum utilizada para inoculação das sementes. O tamanho padrão das partículas pode variar de 0.075 a 0.25 mm e a concentração usada na lavoura varia conforme o fabricante. Em média, na mesorregião de Palotina, recomenda-se a utilização de 100 g de inoculante turfoso para 40 kg de semente de trigo, porém na literatura muitas recomendações são encontradas e a dose varia de acordo com o produto e a cultura.

2) Grânulos: aplicado junto à semente durante o plantio, as partículas têm tamanho médio de 0.35 a 1.18 mm.

3) Líquidos: Usam o meio de cultura como carreadores, o meio mais utilizado é a água mas podem apresentar também óleos minerais ou orgânicos. O inóculo é misturado ou aspergido nas/às sementes que depois de secas, são colocadas na plantadeira. Este método assegura maior cobertura das sementes (BASHAN, 1998; SMITH,1995).

Segundo Bashan et al. (2014) os inoculantes devem apresentar as seguintes características:

- 1) Ser fáceis de usar;
- 2) Ser compatíveis com os equipamentos agrícolas;
- 3) Apresentar tolerância a um grande período de estocagem, tempo de prateleira maior que uma safra;
- 4) Mostrar possibilidade de uso em diferentes condições de solo e campo;
- 5) Ter habilidade de prover sobrevivência às BPCV à medida que a planta cresce;
- 6) Conferir reprodutibilidade de resultados a campo;
- 7) Apresentar segurança ambiental e alimentar para humanos e o meio ambiente.

Para serem efetivos, os inoculantes devem sobrepor dois grandes entraves: A perda de viabilidade durante a estocagem na propriedade rural e a manutenção da

viabilidade celular em condições de temperatura variando entre -5 a 30°C (desde a fábrica até a lavoura) (BASHAN *et al.*, 1998). A temperatura de armazenamento pode variar muito desde a fabricação do inoculante (geralmente controlada em 20°C) até a lavoura (podendo alcançar até 35°C) conforme a estação do ano e o local de uso.

A manutenção da atividade metabólica celular antes da inoculação e após o plantio é imprescindível para a observação dos efeitos benéficos da promoção de crescimento vegetal (O'CALLAGHAN, 2016). Vários trabalhos relatam a queda no número de células viáveis após o armazenamento (REETHA *et al.*, 2014; TABASSAM *et al.*, 2015). Shah-Smith & Burns (1997) relataram que temperaturas baixas de armazenamento (4 °C) promoveram a manutenção do número de células bacterianas viáveis na ordem de 4 vezes, comparada às temperaturas de 20 °C. Por outro lado, Klajeet *et al.* (2011) relatam que a viabilidade de *Rhizobium*, em carreador de turfa, foi maior quando estocados à 28 °C.

Outros fatores que podem afetar a eficiência dos inoculantes incluem a fase de crescimento bacteriano (logarítmica ou estacionária) durante o preparo do inoculante; a taxa de desidratação e re-hidratação das células no solo; as características do carreador usado na formulação e a tecnologia de formulação propriamente dita (DATE, 2011). Segundo Garcia-Fraile *et al.* (2015), normalmente preconiza-se que um inoculante efetivo deva conter entre 10^8 e 10^9 UFC.mL⁻¹ (unidades formadoras de colônia), já outros pesquisadores apontam a necessidade de ter entre 10^6 , 10^7 UFC.mL⁻¹ células por planta para *Azospirillum brasilense* (BASHAN, 1986). Outros autores apontam maiores concentrações celulares 10^{10} UFC.mL⁻¹ (KALJEET; KEYEO; AMIR, 2011).

Por outro lado, o desenvolvimento de um novo inoculante requer em primeiro lugar, o isolamento e seleção de estirpes efetivas na promoção de crescimento vegetal e competitivas com a microbiota residente no solo. Deve-se realizar a caracterização dos organismos selecionados e otimizar o crescimento dos mesmos em meio de cultura e sistemas de fermentação; realizar testes laboratoriais e à campo para avaliar a performance, em seguida, deve-se desenvolver os métodos e protocolos da formulação ideal, realizar a transferência e difusão de tecnologia, desenvolver um sistema de checagem da qualidade e tempo de estocagem e por último, deve-se escolher métodos de aplicação compatíveis para garantir o sucesso do biofertilizante (VASSILEV *et al.*, 2015).

Diante do exposto, observa-se que os bons resultados do uso de inoculantes nas sementes e no solo depende de um grande número de fatores. A sobrevivência celular durante o período de armazenamento pela garantia de uma boa proteção aos micro-organismos no solo, o desenvolvimento de técnicas e o aperfeiçoamento nos processos de isolamento, formulação e produção são imprescindíveis na indústria de inoculantes (BHARDWAJ *et al.*, 2014; VASSILEV *et al.*, 2001).

2.3 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DOS BIOFERTILIZANTES E INOCULANTES

A aplicação de BPCV na agricultura teve início no século XIX (1896), com o produto Nitragin à base de *Rhizobium sp* patenteado por Nobbe & Hiltner (BASHAN, 1998; SMITH, 1992). Nos anos 90, nos Estados Unidos, mais de 2 milhões de ha já utilizavam a inoculação com estirpes de *B. subtilis* (LEMANCEAU, 1992).

Segundo Garcia-Fraile *et al.* (2015), nos Estados Unidos a maior parte da superfície agrícola é dedicada às culturas de trigo, milho, soja, algodão e forragens e, os agricultores fazem o uso massivo de fertilizantes químicos em detrimento do uso de biofertilizantes e ou inoculantes. A exceção é a aplicação de cepas de rizóbios em culturas de leguminosas.

A sustentabilidade na agricultura moderna incentiva a indústria a desenvolver produtos que associem fertilizantes minerais ou orgânicos com micro-organismos. Por exemplo, o Accomplish®, comercializado pela Loveland Products, Inc., é um adubo bioquímico formulado especificamente com micro-organismos viáveis acrescido de enzimas orgânicas. Em 1897, a companhia alemã Bayer lançou no mercado um inoculante com base nas estirpes de *Bacillus subtilis* (SCHOEBITZ; LÓPEZ; ROLDÁN, 2013).

No Brasil, segundo Araújo (2013), os primeiros estudos com inoculantes se realizaram no Instituto Agrônomo de Campinas, mas tiveram seu maior enfoque no Rio Grande do Sul, com uma primeira seleção de estirpes de *Rhizobium* para uso em leguminosas de clima temperado. Com o crescimento das áreas de soja no estado, na década de 60, iniciou-se a seleção de estirpes para a cultura da soja que viria a ser a maior *commodity* do Brasil.

Em 1956, foi fundada a primeira fábrica de inoculantes no Brasil, em Pelotas, RS, com tecnologia desenvolvida pela Secretaria da Agricultura. A partir da década de 70, abriram-se novas fábricas de inoculantes visando suprir o mercado deste

insumo que já se mostrava altamente eficaz no aumento da produtividade da soja (ARAUJO, 2013).

Segundo Soares (2015), hoje 90% do mercado de inoculantes no Brasil, são voltados para a soja, sendo que aproximadamente 40% das doses são importadas de outros países, de acordo com dados da Associação Nacional dos Produtores e Importadores de Inoculantes (ANPII).

Hoje, o mercado de inoculantes vem se expandindo constantemente, há muitas companhias multinacionais que vendem biofertilizantes em todo o mundo como a Rizobacter, uma companhia argentina que, desde 1977 tem em seu portfólio inoculantes rizobiais recomendados para leguminosas e vendidos para países como a Argentina, Brasil, Bolívia, Paraguai, Uruguai, Estados Unidos, Europa e África. A companhia Novozymes (Dinamarca) produz e distribui biofertilizantes de origem microbiana que solubilizam fosfatos e/ou fixam N₂. Recentemente, em *joint-venture* com a Monsanto criaram a BioAg Alliance que terá a mais avançada plataforma de bioprodutos de origem microbiana para fins agrícolas (GARCIA-FRAILE; MENNDEZ; RIVAS, 2015).

No Brasil, o mercado de inoculantes e biofertilizantes vêm crescendo a cada ano, empresas como a BioSoja, ICB BIOAGRITEC Ltda., Nodusoja, Total Biotecnologia, Stoller do Brasil, Simbiose, Nitro1000 entre outras vem desenvolvendo tecnologias e produtos à base de micro-organismos (Tabela 1).

TABELA 1: EXEMPLOS DE ALGUMAS EMPRESAS BRASILEIRAS E SEUS PRODUTOS À BASE DE *Azospirillum brasilense*:

EMPRESA	NOME COMERCIAL	CIDADE/ESTADO
Nitro 1000	Nitro 100 Gramíneas	Cascavel – PR
Inquimais	Inqui+Azos	Cambé – PR
Spraytec	Nodofiz AZP	Maringá – PR
Total Biotecnologia	AzoTotal	Curitiba – PR
Simbiose	Simbiose Maíz	Cruz Alta - RS
Stoller	Masterfix Gramíneas	Cosmópolis - SP
Microquímica	AzzoFix®	Monte Mor - SP
Biosoja	Biomax® Premium	São Joaquim da Barra - SP
Laboratório Farroupilha	Azoz®	Patos de Minas - MG

FONTE: A autora (2017).

A demanda por inoculantes está aumentando mundialmente devido ao apelo pela sustentabilidade ambiental, ao maior número de patentes protegendo a indústria e comercialização destes bioprodutos, aumentando a necessidade e dando maiores motivos para que as indústrias continuem investindo em novos estudos e produtos à base de micro-organismos. Porém, as inconstâncias nos resultados laboratoriais e à campo comprovando o efeito positivo destes produtos, bem como a dificuldade de manutenção da viabilidade ou tempo de prateleira provocam certa desconfiança entre os produtores quanto ao seu uso em larga escala (GARCIA-FRAILE; MENNDEZ; RIVAS, 2015).

Para a grande maioria dos países em desenvolvimento, a tecnologia de inoculação, especialmente com BPCV tem pouco ou quase nenhum impacto nas propriedades de agricultura familiar porque os inoculantes, quando usados, são de baixa qualidade por terem produção caseira. Outro fator a ser considerado é que na assistência técnica dada à pequenas propriedades, preconiza-se a recomendação de fertilizantes químicos em detrimento dos biofertilizantes e inoculantes. Por outro lado, a conscientização do agricultor para o uso de tecnologias modernas vem aumentando nestes últimos anos pela recomendação de biotecnologias que aumentem a produtividade e sejam eco-amigáveis. Neste contexto, os inoculantes começam a ampliar o seu espaço.

2.4 IMOBILIZAÇÃO MICROBIANA

A imobilização microbiana é definida como sendo as diferentes formas de fixação ou aprisionamento das células em uma matriz (BASHAN, 1998; CASSIDY; LEE; TREVORS, 1996). A imobilização microbiana também pode ser aplicada para a liberação gradativa de diversos compostos como enzimas, aminoácidos e ácidos orgânicos, bem como materiais tóxicos biodegradáveis (biorremediação), crescimento de fungos e sementes sintéticas, tendo uma ampla variedade de aplicações científicas e industriais, nas mais diversas áreas: agricultura, farmacêutica, alimentos (BASHAN, 1998; CASSIDY; LEE; TREVORS, 1996; PEREIRA *et al.*, 2008; SCHOEBITZ; LÓPEZ; ROLDÁN, 2013).

O sistema de imobilização, onde um micro-organismo é atrelado a uma matriz, é então fermentada em um meio de cultura, permitindo o crescimento bacteriano por mais tempo (VASSILEV *et al.*, 2015). A co-imobilização permite

também o uso de mais de uma estirpe bacteriana, reduzindo custos. No entanto, a co-imobilização também pode reduzir alguns parâmetros metabólicos como uso de nutrientes e demanda de oxigênio entre as co-culturas pela competição intra-espécies (HICKERT *et al.*, 2014).

Os métodos de imobilização ou encapsulação de micro-organismos dependem de vários fatores tais como: tipo de imobilizado, finalidade de aplicação do imobilizado, tamanho das partículas ou grânulos desejados, propriedades químicas e físicas do imobilizado e da parede da partícula ou grânulo, da difusão desejada, dos custos de produção e da escala de produção (SUAVE *et al.*, 2006).

Vários métodos estão descritos na literatura: gelificação ionotrópica por extrusão, *spray drying*, *spray cooling*, coacervação, liofilização, emulsificação entre outras (AZEREDO, 2005; BUREY *et al.*, 2008; CHAMPAGNE & FUSTIER, 2007; CHEN & WANG, 2007; JOHN *et al.*, 2011; LAOHASONGKRAM, 2011; SCHOEBITZ; LÓPEZ; ROLDÁN, 2013; SILVA *et al.*, 2014; SWARBRICK, 2004; ZANETTI, 2001).

A gelificação ionotrópica por extrusão é o método baseado na propriedade de imobilizar solução de polissacarídeos em formato de gel em contato com uma solução iônica multivalente. O método envolve 3 etapas: 1ª Etapa - incorporação de uma solução (imobilizado), no caso, o meio de crescimento microbiano, em uma solução matriz de alginato de sódio. 2ª Etapa - operação mecânica da extrusão por gotejamento a partir de uma pipeta ou seringa calibrada. 3ª Etapa - estabilização dos grânulos/esferas formadas pelo processo químico de polimerização ou pelo processo físico – químico (gelificação) em uma solução de cloreto de cálcio (0,05 a 0,1M), sendo que o completo processo de gelificação leva aproximadamente 20 – 30 min formando grânulos de alginato de cálcio complexados (BUREY *et al.*, 2008; CASSIDY; LEE; TREVORS, 1996; SCHOEBITZ; LÓPEZ; ROLDÁN, 2013; SWARBRICK, 2004).

A imobilização das células em matriz de alginato de sódio pode proporcionar proteção física, química e mecânica ao core do grânulo, onde o polímero atua como uma camada protetiva, isolando a parte central ou gota contendo os micro-organismos dos estresses ambientais. Devido a capacidade se dissolver esta membrana pode liberar paulatinamente o conteúdo interno, aumentando o tempo de atuação dos micro-organismos de interesse (SCHOEBITZ; LÓPEZ; ROLDÁN, 2013; SILVA *et al.*, 2014).

As células imobilizadas podem trazer benefícios ao agricultor, uma vez que, na semeadura, o tratamento de sementes com defensivos agrícolas pode diminuir a viabilidade celular com o uso da inoculação diretamente sobre a semente. Outro ponto a ser salientado é que no atual processo de inoculação, a inoculação deve ocorrer antes do plantio, necessitando de condições de homogeneização que não podem ser realizadas no mesmo local da semeadura, dificultando a logística da atividade. Tal ação exige do agricultor um esforço maior, destinando mão de obra específica para esta atividade, além do fato de que sementes inoculadas e não plantadas não podem ser reaproveitadas, onerando ainda mais a atividade agrícola.

Com a imobilização, o plantio pode ocorrer concomitantemente à inoculação, ou seja, diretamente associada à plantadeira, não necessitando de homogeneização prévia e as esferas ou grânulos liberariam as bactérias paulatinamente durante o crescimento vegetal, aumentando as chances da efetiva associação.

2.5 CARREADORES

O carreador de um inoculante é geralmente composto de material conveniente e econômico que tem a capacidade de liberar lentamente células viáveis em excelente qualidade fisiológica, contendo uma ou mais estirpes bacterianas. O papel mais importante dos inoculantes é prover um microambiente apropriado para que a sobrevivência dos micro-organismos possa ser prolongada no solo, além de provisão de nutrição (BASHAN, 1998b; BUREY *et al.*, 2008; REETHA *et al.*, 2014; TREVORS *et al.*, 1992).

O carreador compõe a maior fração do inoculante (volume ou peso) e os materiais que compõem os carreadores podem variar, podendo apresentar-se na forma em pó, granulado, pastoso ou líquido (BASHAN, 1998a). Segundo Bashan (1998b) os carreadores devem apresentar as seguintes características: ser estéreis ou ter possibilidade de serem esterilizados, apresentar uniformidade quanto ao tamanho e forma, apresentar grande capacidade de absorção de água, no caso dos carreadores úmidos devem ser fáceis de fabricação ou de mistura e permitir a adição de nutrientes, com facilidades para o ajuste de pH e viabilidade econômica.

O inoculante e seu carreador deverá ser atóxico, biodegradável e não poluente, devendo minimizar os riscos com a dispersão das células no ambiente. Em termos de estocagem ou tempo de prateleira, os carreadores devem assegurar aos

micro-organismos um tempo de vida prolongado (1 ou 2 anos em temperatura ambiente) para garantir a logística na distribuição a partir do fabricante e minimizar os custos de produção. Na lavoura, o carreador deverá permitir facilidade de manuseio, adaptando-se a qualquer equipamento agrícola, permitindo uma rápida e controlada dispersão dos micro-organismos no solo.

Os carreadores podem ser divididos em 3 categorias:

1) Solos: turfa, argila, carvão e solo inorgânico (SINGH & SHARMA, 1973; SMITH,1995);

2) Resíduos vegetais: compostos orgânicos, palhada, resíduos de fezes animais, óleo vegetal (ISWARAN *et al.*,1972; KREMER & PETERSON,1982);

3) Materiais inertes: vermiculita, rocha fosfática moída, rocha calcária moída, gel de poliacrilamida e esferas de alginato (DOMMERGUES *et al.*,1979; SOUGOUFARA *et al.*,1989; PAAU *et al.*,1991).

2.6 TURFA

A turfa é um material orgânico complexo tipo solo, formado a partir da decomposição de musgos ou material vegetal carbonizado (BASHAN, 1998b), que assegura a manutenção das atividades metabólicas pelas bactérias e sua multiplicação durante o período de estocagem pela grande capacidade de manutenção e adsorção de água (KALJEET; KEYEO; AMIR, 2011).

Apesar de o seu uso ser amplamente recomendado, a turfa como carreador tem o inconveniente de apresentar grande variabilidade na qualidade, devido a sua composição ser de um complexo de materiais orgânicos cuja extração acontece a partir de diferentes jazidas. Esta característica pode afetar expressivamente o produto final e causar dificuldades na dosagem e nas condições de estocagem (VAN ELSAS & HEIJEN, 1990), além de diferenças entre as bateladas do mesmo produtor ou de produtores de inoculantes (BASHAN, 1998a).

Segundo Huber *et al.* (1989), a turfa proporciona baixa capacidade de proteção às bactérias diante de estresses físicos impostos pela estocagem, principalmente variações na temperatura, reduzindo o crescimento vegetal. Sua composição exclusivamente orgânica tem maior propensão às contaminações, o que diminui a vida útil do inoculante (VAN ELSAS & HEIJEN, 1990; OLSEN *et al.*,1994). A esterilização pelo tratamento com altas temperaturas poderia liberar substâncias

tóxicas para as bactérias, reduzindo a sua viabilidade (BASHAN, 1998; BASHAN; DE-BASHAN; *et al.*, 2014).

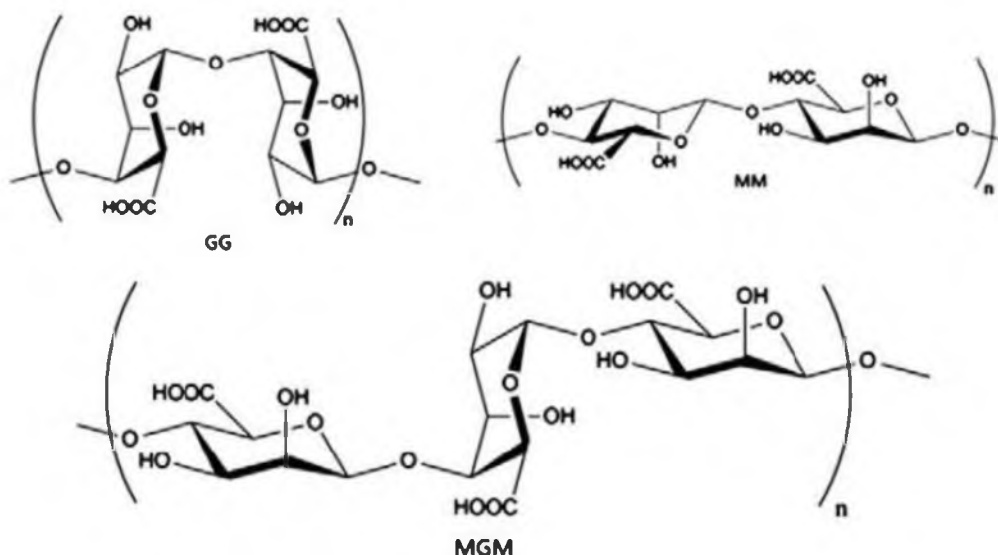
Outro ponto, a adição de compostos adesivos para aumentar a aderência das partículas de inoculantes turfosos às sementes, é uma prática amplamente difundida no campo, porém adiciona mais tempo e trabalho ao processo de plantio (SMITH,1997).

No entanto, a turfa continua a ser o carreador mais utilizado mundialmente para a fabricação de inoculantes. Kaljeet et al. (2011) relataram que a turfa foi a mais eficiente comparada a outros carreadores (casca de arroz e caulinita) para a manutenção da maior população de *Rhizobium*. A turfa também foi mais eficiente na manutenção de *Bacillus* PZ9 (SZCZECH; MACIOROWSKI, 2016) entre outros trabalhos.

2.7 ALGINATO

O alginato é um polímero linear sem ramificações contendo resíduos β (1 \rightarrow 4) do ácido D-manurônico ligados a resíduos α (1 \rightarrow 4) do ácido L-glucorônico (Figura 1).

FIGURA 1. ESTRUTURA QUÍMICA DO ALGINATO



FONTE: Cook et al. (2012).

O alginato é um material atóxico, consistente em qualidade, praticamente estéril e biocompatível com micro-organismos, pode ser dissolvido na água ou em meio de cultura bacteriano e em contato com cátions divalentes como Ca^{++} ou Mg^{++}

forma grânulos ou esferas de hidrogel onde a presença de sequências de resíduos glucorônicos é necessária para que apresentem esta capacidade (BUREY *et al.*, 2008; JOHN *et al.*, 2011; SCHOEBITZ; LÓPEZ; ROLDÁN, 2013). As concentrações de alginato no hidrogel podem variar de 1-8% (p/v) e a temperatura de trabalho de 0 a 80°C (BUREY *et al.*, 2008; CASSIDY; LEE; TREVORS, 1996).

O alginato pode ser obtido através da extração/digestão de folhas de algas marrons como: *Macrocystis pyrifera*, *Laminaria digitata*, *Laminaria hyperborea* e *Elkonia cava* de outras diversas espécies, e estas espécies podem variar em tamanho, forma, porcentagem e qualidade do alginato que produzem (CASSIDY; LEE; TREVORS, 1996). O alginato também pode ser extraído da superfície de algumas bactérias: *Pseudomonas sp.* e *Azotobacter sp.* (FETT *et al.*, 1989; HAY *et al.*, 2010; NEHRA; CHOUDHARY, 2015; NUNEZ *et al.*, 2000).

O tamanho das esferas pode variar de 1 a 6 mm (Macrogrânulos) e 50-200 µm (Microgrânulos) e podem apresentar uma concentração de células bacterianas variando entre 10^8 a 10^{11} UFC.mL⁻¹ (BASHAN; DE-BASHAN; *et al.*, 2014; SCHOEBITZ; LÓPEZ; ROLDÁN, 2013). Chuang *et al.* (2017) citam que a performance dos grânulos encapsulados depende de seu formato e tamanho. Segundo Ogbonna *et al.* (1991) quanto menor o tamanho da esfera ou grânulo, melhor será a difusão de oxigênio, nutrientes e metabólitos que permitem a melhor sobrevivência e viabilidade celular. Porém agricultores relatam que o tamanho ideal dos grânulos deve ser similar ao das sementes para ser usado diretamente na plantadeira (SCHOEBITZ; LÓPEZ; ROLDÁN, 2013).

Nos últimos anos, várias formulações experimentais baseadas neste polímero foram relatadas na literatura (BASHAN, 1998; BERNINGER; MITTER; PREININGER, 2016; REETHA *et al.*, 2014). Outros trabalhos relatam o uso deste polímero acrescido de algum aditivo (NEHRA; CHOUDHARY, 2015; REETHA *et al.*, 2014; SCHOEBITZ; LÓPEZ; ROLDÁN, 2013; SIVAKUMAR; PARTHASARTHI; LAKSHMIPRIYA, 2014).

Como vantagens do uso de polímeros à base de alginato pode-se citar: Proteção das células bacterianas contra estresses abióticos; Liberação gradual de células bacterianas no solo durante a degradação do polímero concomitante com a germinação e emergência das plântulas; Armazenagem à seco em temperatura ambiente por períodos prolongados; Especificação do inoculante, a formulação pode conter meio de cultura específico correlacionado com a estirpe encapsulada para a

melhor manutenção da mesma; Adição de nutrientes na tentativa de prolongamento da vida útil das bactérias e nutrição das plantas, entre outros (BASHAN, 1998; VASSILEV *et al.*, 2015).

Porém, apresentam como desvantagens o fato de que, a produção destes polímeros é ainda cara comparada com a turfa, requerem para a fabricação equipamentos e condições específicas além de possuir inconstâncias nos resultados laboratoriais e à campo (SMITH, 1997; O'CALLAGHAN, 2016; VASSILEV *et al.*, 2015).

2.8 ÁCIDO HÚMICO

As substâncias húmicas são produtos finais de decomposição microbiana e degradação química da biota morta nos solos (ASLI & NEUMANN 2010; SCHIAVON *et al.*, 2010) e são consideradas as moléculas orgânicas naturais mais abundantes na Terra (SIMPSON *et al.*, 2002). Possuem várias funções no solo e na planta, como o controle na disponibilidade de nutrientes, troca de carbono e oxigênio entre o solo e a atmosfera e a transformação e transporte de produtos químicos tóxicos (BERBARA & GARCÍA, 2014; PICCOLO & SPITELLER, 2003).

Além disso, substâncias húmicas nos solos afetam a fisiologia da planta e a composição e função dos micro-organismos da rizosfera, podendo afetar diretamente o crescimento das raízes, especialmente o surgimento das raízes laterais e a proliferação de sítios mitóticos radiculares (CANELLAS *et al.*, 2002; NARDI *et al.*, 2009; VARANINI & PINTON, 2001).

O ácido húmico, principal componente das substâncias húmicas é solúvel em meio básico, é extraído do solo por solução alcalina diluída e precipitado em meio ácido (BERBARA & GARCÍA, 2014; STEVENSON, 1994). Possui alto peso molecular com natureza coloidal, tendo na sua composição 56% de carbono, 8,3% de hidrogênio, 36,7% de oxigênio e 2,6% de nitrogênio, cujas partículas apresentam tamanhos diferentes (60% das partículas apresentam tamanho médio de 5 µm e 40% entre 0,04 - 0,5 µm), indicando que as bactérias podem utilizar essas partículas submicrométricas para sua sobrevivência imediata (NARDI *et al.*, 2009; REETHA *et al.*, 2014; YOUNG *et al.*, 2006).

Em trabalhos de avaliação de encapsulamento com alginato de sódio aditivado com o ácido húmico, Reetha *et al.* (2014) obtiveram a máxima de

sobrevivência de *Azospirillum lipoferum*. Young et al. (2006) observaram uma macroesfera mais porosa pela presença de ácido húmico como aditivo. Esta maior porosidade proporcionaria mais espaço, além de nutrientes que facilitaram a multiplicação bacteriana no meio encapsulado.

Apesar de apresentar grandes benefícios, Sivakumar et al. (2014) relataram a manutenção da viabilidade celular de *Bacillus megaterium* por 5 meses. No entanto, observaram também, um maior grau de contaminação das esferas quando o ácido húmico foi acrescentado em relação aos demais aditivos estudados.

2.9 TREALOSE

A trealose é um dissacarídeo não redutor em que as duas unidades de glicose estão ligadas por uma ligação α,α -1,1-glicosídica. Outros açúcares servindo como fonte de energia e carbono (glicose, sacarose, maltose, melão e glicerol) são frequentemente usados no processo de liofilização ou criopreservação bacteriana com grande sucesso (GARCÍA-FRAILE; MENÉNDEZ; RIVAS, 2015).

Na literatura, está bem caracterizado o papel protetivo da trealose sobre proteínas e membranas celulares, impedindo a inativação ou desnaturação das mesmas, causada por uma variedade de condições estressantes, incluindo dessecação, desidratação, calor, frio e oxidação (ELBEIN *et al.*, 2003; GARCIA-FRAILE; MENNDEZ; RIVAS, 2015).

Além de fonte energética, a trealose acumulada em níveis extremamente altos em leveduras tolerantes à dessecação, tem sido usada com grande sucesso na proteção de bactérias contra os danos causados pelo processo de liofilização. Células de *E. coli* congeladas com 100 mM de trealose apresentaram sobrevivência maior que 75% após a reidratação, comparada com 10% das células congeladas sem o tratamento (LESLIE *et al.*, 1995).

A trealose, em leveduras e plantas, também pode servir como uma molécula de sinalização para direcionar ou controlar certas vias metabólicas afetando o crescimento. Segundo Elbein et al. (2003) muitos destes organismos inferiores (bactérias, fungos e leveduras) produzem e armazenam trealose, durante estresses ambientais, em torno de 10% a 20% do seu peso seco.

Os efeitos do uso de trealose como aditivo na formulação de inoculantes em base de hidrogel ainda não foram relatados, sendo estes, parte dos objetivos deste trabalho.

2.10 OUTROS ADITIVOS

Outros aditivos podem ser usados para prolongar a vida útil das bactérias. Porém, a eficiência dos mesmos é dependente de várias condições como o tipo da estirpe usada no inoculante, a técnica de fabricação, tipo de carreador, tipo de planta, tipo de solo a ser inoculado entre outros.

Um aditivo comumente adicionado às formulações de rizóbios é a sacarose que significativamente aumenta a sobrevivência de estirpes de, além de outras BPCV em até 6 meses (TAURIAN *et al.*, 2010). Singleton *et al.* (2002) e Manikandan *et al.* (2010) observaram aumentos na viabilidade celular quando o glicerol foi adicionado. Outros aditivos como CMC (Carboximetilcelulase), goma arábica e polivinilpirolidona (PVP) também foram relatados (BASHAN *et al.*, 2014; DEAKER *et al.*, 2011; SINGLETON *et al.*, 2002; VIJI *et al.*, 2003). O leite em pó desnatado e o amido também foram usados como aditivos para o aumento da sobrevivência celular (REETHA *et al.*, 2014; SZCZECH; MACIOROWSKI, 2016).

Vários estudos têm sido realizados a fim de aumentar o número de opções de inoculantes no mercado. Estes estudos visam oferecer produtos com preços competitivos e mais eficazes no que diz respeito a proporcionar maior tempo e qualidade de sobrevivência das BPCV e conseqüentemente promover maiores incrementos na produtividade das culturas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MANUTENÇÃO E CULTIVO DA CEPA BACTERIANA

A bactéria *A. brasilense* Ab-V5 foi mantida por sucessivas passagens em meio sólido NFb–Lactato e em estufa de crescimento a 28 °C. O pré-inóculo foi preparado retirando-se uma colônia da bactéria e transferindo-a para 5 mL de meio NFb-Lactato em tubos falcon de 50 mL, mantidos a 32 °C em uma incubadora tipo *shaker* a 120 rpm. Após 24 h, transferiu-se 1 mL de pré-inóculo para um erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio NFb–Lactato, constituindo o inóculo, também

mantido em incubadora tipo *shaker* por 20 h a 120 rpm e 32 °C. O crescimento celular em fase logarítmica foi quantificado por turbidimetria em 600 nm, em espectrofotômetro BEL Photonics – 2000UV.

A cultura celular foi centrifugada sob refrigeração (4 °C) durante 10 min a 8720 rpm. O sedimento celular foi cuidadosamente lavado com 10 mL de solução de NaCl (0,8%) e ressuspenso em 1 ml de solução peptonada (1%). Para todos os tratamentos foram utilizados uma solução final contendo 10^9 UFC.mL⁻¹ de *A. brasilense*.

3.2 ENCAPSULAMENTO E FORMULAÇÃO DA BASE DO GEL BIOINOCULANTE

A encapsulação de células de *A. brasilense* em macrogrânulos foi realizada segundo o protocolo proposto por Reetha et al. (2014) com modificações usando o método de extrusão. A obtenção de macrogrânulos foi realizada sob condições estéreis num fluxo de ar laminar, onde a proporção de componentes do encapsulamento foi de 2:1, sendo que para cada 2 mL de solução de alginato de sódio (3%) usado, foi adicionado 1 mL da suspensão de bactérias *A. brasilense*. Quando o aditivo foi adicionado esta proporção foi de 2:2:1, isto é, para cada 2 mL de solução de alginato de sódio (3%) usado, adicionou-se 2 mL de solução de aditivo (ácido húmico 0,8% ou trealose-0,1M; 0,5M e 1M) e 1 mL da suspensão de bactérias *A. brasilense*.

Após o processo de adição dos componentes, essa mistura permaneceu sobre agitação suave durante 30 min em exaustor de fluxo laminar a fim da completa homogeneização. Em seguida, a mistura foi extrudida através de pipetas Pasteur, dentro de um béquer contendo solução de CaCl₂ 0,1M estéril, agitando-se suavemente e, em temperatura de 25°C ± 5.

Os macrogrânulos foram mantidos em solução de CaCl₂ durante 2 h para obtenção de grânulos sólidos e de tamanho homogêneo. A solução de CaCl₂ foi drenada e as esferas lavadas 2 vezes com água corrente esterilizada. Depois de lavadas, as mesmas foram incubadas em meio NFb-Lactato, por 24 h em uma incubadora tipo *shaker* a 120 rpm e 32°C, para permitir que as bactérias se multiplicassem no interior dos grânulos. Após este período, as esferas foram novamente lavadas 2 vezes com água destilada, recolhidas e deixadas em fluxo de ar por 30 min e aliquotadas em pacotes plásticos de 3 mm de espessura contendo

aproximadamente 7 g de grânulos cada. No total, foram confeccionadas 40 pacotes de grânulos de cada tratamento.

Como controle foi usada a turfa (Nitro1000™) inócua, onde 40 pacotes de 7g após pesados e selados foram inoculados com 1 mL de solução peptonada contendo *A. brasilense* (10^9 UFC.mL⁻¹). Todos os pacotes ou alíquotas contendo as diferentes formulações foram armazenados em local seco, no escuro e com temperatura de $21 \pm 2^\circ\text{C}$.

Elaborou-se um delineamento experimental inteiramente ao acaso consistindo de 6 diferentes formulações (turfa (T); alginato de cálcio (A); alginato de cálcio + ácido húmico (A + A.H); alginato de cálcio + trealose 0,1M (A + 0,1 M); alginato de cálcio + trealose 0,5M (A + 0,5 M); alginato de cálcio + trealose 1M (A + 1 M)). Para cada tratamento foi avaliada a sobrevivência de *A. brasilense* em 8 períodos de armazenagem diferentes (0, 1, 3, 5, 7, 14, 21 e 30 dias) em triplicata, totalizando 21 embalagens utilizadas para esta avaliação até a última data de avaliação. A viabilidade das células de *A. brasilense* foi avaliada em 6 períodos de armazenagem diferentes (0, 3, 7, 14, 21 e 30 dias) sendo que as embalagens utilizadas nessa avaliação foram as mesmas da avaliação de sobrevivência.

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 com condições assépticas de manipulação. Por isso, optou-se por acrescentar o antibiótico, ácido nalidíxico (20 µg/mL) específico para *A. brasilense* e o fungicida de amplo espectro Maximís (0,01% v/v).

3.4 MENSURAÇÃO DE TAMANHO E PESO DOS GRÂNULOS

As medidas diametrais dos macrogrânulos foram obtidas com régua graduada, e os pesos foram obtidos por pesagem em balança analítica e expressos em mm e mg, respectivamente. Esse procedimento foi realizado após o encapsulamento das células bacterianas com 3 repetições.

3.5 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO

A eficiência de encapsulamento foi mensurada pela razão entre o log da UFC do dia 1 e o log da UFC do dia 0.

3.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Com o objetivo de se verificar o aspecto da superfície externa e interna das esferas compostas por diferentes carreadores, foi empregada a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV), após 30 dias de encapsulamento. Nesta análise foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura, FEI Quanta 440, da Central de Microscopia Eletrônica da UFPR – Setor Palotina. As amostras, em forma de esferas, foram submetidas a fixação com tampão Cacodilato de sódio 0,2 M (pH= 7,2), seguida por desidratação em concentrações crescentes de etanol (50% por 15 minutos, 60% por 15 minutos, 70% por 15 minutos, 80% por 15 minutos, 90% por 15 minutos e 100% por 15 minutos). Após a desidratação, o sobrenadante foi descartado e as esferas receberam 1,5 mL de acetona resfriada. As amostras foram dispostas sobre o porta amostra contendo uma fita de carbono dupla face, sendo as amostras posteriormente secas e metalizadas com uma fina camada de ouro na superfície (metalização). As micrografias foram obtidas em diversos aumentos em módulo BSE (backscattering) utilizando detector de elétrons retro espalhados.

3.7 ESPECTROMETRIA DE RAIOS X POR ENERGIA DISPERSIVA (EDS)

Foi utilizada a ferramenta EDS acoplada ao MEV para análise semiquantitativa dos teores dos elementos químicos contidos na superfície das esferas carreadoras. Para isto, foi utilizado o equipamento Penta FET Precision da OXFORD INSTRUMENTS.

3.8 AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA DAS CÉLULAS VIÁVEIS OU CONTAGEM MICROBIANA

Para a avaliação da taxa de sobrevivência das bactérias pós-encapsulamento, foi realizada a contagem microbiana pela eluição e diluição dos macrogrânulos nas datas 0 (dia do encapsulamento), 1, 3, 5, 7, 14, 21 e 30 (dias após o encapsulamento) dias. Três pacotes contendo alíquotas do bioinoculante ou

macrogrânulos, de cada tratamento, foram abertos em cada data de avaliação. De cada alíquota, foram tomados 10 grânulos e estes, dissolvidos em tubos do tipo Falcon contendo 10 mL de tampão de fosfato de potássio (0,25 M, pH 6,8 ± 0,1). Os tubos foram mantidos em estufa tipo B.O.D. durante 16 h - 24 h a 30 ± 2°C. Após este período e para a completa dissolução dos grânulos, os tubos foram agitados durante 1 min em vortex. As diluições seriadas (10x) e o plaqueamento foram realizados seguindo o protocolo de Romeiro (2001), através da contagem de colônias bacterianas visíveis em placas em ágar nutriente após 24h de inoculação.

3.9 CONFIRMAÇÃO MOLECULAR DA PRESENÇA DA ESTIRPE *A. brasilense*

A confirmação molecular da espécie bacteriana foi realizada por amplificação, pela PCR, de uma região de 648 pb pertencente a região do rDNA 16S, específica para *A. brasilense* utilizando o par de primers Azo16SF (5'-GCGGTAATACGAAGGGGGCKF-3') e Azo16SR (5'-TTGTACCGGCAGTTCCACCAG-3') (Shime-Hattori *et al.*, 2011).

Amostras bacterianas foram tomadas randomicamente no dia do encapsulamento (Dia 0) e nas colônias bacterianas epifíticas obtidas após a inoculação e crescimento vegetal nos diferentes períodos de armazenagem (1, 3, 5, 7, 14, 21 e 30 dias).

Uma única colônia bacteriana, obtida após crescimento em meio NFb – L foi transferida para um microtubo de PCR e ressuspendida em 20 µL de água ultra pura. As células foram lisadas por aquecimento a 96°C por 6 min. O sobrenadante foi separado do lisado celular por breve centrifugação. A PCR foi realizada em um volume de 20 µL, utilizando 2 µL do DNA, Tampão de PCR 1x, 1,5 mM de MgCl₂, 0,4 mM do mix de dNTP, 1 unidade da Taq DNA Polimerase (4G Pesquisa e Desenvolvimento) e 0,2 µM de cada primer. A reação foi realizada em termociclador Bioer Life Express modelo MJ96, as condições de ciclagem foram: desnaturaçãõ inicial de 94°C por 3 min, seguida de 25 ciclos de 94°C por 30 s, 58°C por 1 min, 72°C por 1 min, com extensão final de 72°C por 5 min. Os produtos de PCR foram visualizados em géis de agarose a 1,5% corados com brometo de etídeo a 0,5 µg/mL em Tampão TBE 1x (Tris-base 90 mM; ácido bórico 90 mM; EDTA 2 mM pH 8,0) e foto documentados em equipamento Locus Biotecnologia L.PIX. Foi utilizado padrão de tamanho molecular de 100 pb (Norgen™).

3.10 VIABILIDADE E LIBERAÇÃO DE *A. brasilense* APÓS INOCULAÇÃO DE SEMENTES DE TRIGO

Para o ensaio *in vitro*, 40 sementes do genótipo de trigo (*Triticum aestivum* L.) cv COODETEC (CD 104) foram lavadas segundo protocolo sugerido por Camilios – Neto et al. (2014) com álcool 70% por 30 s, solução de hipoclorito acidificado por 5 min (em agitação), seguidas por 3 lavagens em água destilada e autoclavada e mantidas por 3h em estufa tipo B.O.D a 30 ± 2 °C. Em seguida, as sementes novamente foram deixadas em solução de hipoclorito acidificado, por mais 5 min e transferidas para solução de peróxido de hidrogênio (35%) por mais 5 min, seguidas por 3 lavagens com água destilada e autoclavada.

Depois de lavadas, as sementes foram dispostas em placas de ágar-água e mantidas em estufa tipo B.O.D a 30 ± 2 °C por 3 dias para germinação.

Tubos de ensaio contendo 25 mL de água destilada e com um suporte de 5 cm de bolinhas de polipropileno, foram preparados para a observação do crescimento das plântulas de trigo.

No 4º dia, procedeu-se a inoculação das sementes, onde o inoculo foi preparado a partir de 20 grânulos diluídos em 3 ml de solução de fosfato de potássio (0,25 M, pH $6,8 \pm 0,1$). Cerca de 20 sementes de trigo, pré-germinadas, foram imersas no inoculo por 3 h e durante este período, incubadas em estufa B.O.D a 30 ± 2 °C.

Cada semente pré-germinada e inoculada foi transferida para os tubos de ensaio e estas foram dispostas em sala de crescimento randomicamente organizadas sob fotoperíodo de 16 h / 8 h de luz/escuro, respectivamente, com temperatura de 25 ± 2 °C, por 7 dias.

3.11 AVALIAÇÃO DA POPULAÇÃO EPIFÍTICA BACTERIANA

A população bacteriana encontrada epifíticamente aderida às raízes após a inoculação das sementes e crescimento vegetal foi avaliada em triplicata, onde cada tubo, contendo uma plântula crescida por 7 dias, tiveram a parte aérea e radicular separadas assepticamente. As raízes foram lavadas por 3 vezes em água destilada e autoclavada, acondicionadas em tubos contendo solução de NaCl (0,9%) e levadas ao sonicador por 20 s. Da solução salina, foram aliqotados 100 µL e feitas

7 diluições em série. De cada diluição, foram plaqueadas 3 gotas de 5 μ L cada, em meio NFb-Lactato sólido. As placas foram mantidas em estufa tipo B.O.D. por 48 h a $30 \pm 2^\circ\text{C}$. As contagens das unidades formadoras de colônias (UFC) obtidas foi realizada em lupa estereoscópica (Quimis).

3.12 AVALIAÇÃO DE BIOMASSA FRESCA E MENSURAÇÃO DE TAMANHO DAS PLÂNTULAS

O peso fresco e a altura das raízes foram obtidos com uso de balança analítica e régua graduada, em triplicata. As medidas foram expressas em mg e mm, respectivamente.

3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística, os dados de UFC (Unidades formadoras de colônias) expressos em exponencial de base 10, foram transformados em log de base 10, para comparação usando o programa Microsoft Excel. Os dados foram submetidos a Análise de Variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, pelo programa estatístico GENES (CRUZ, 2006) e Sisvar (FERREIRA, 2008)

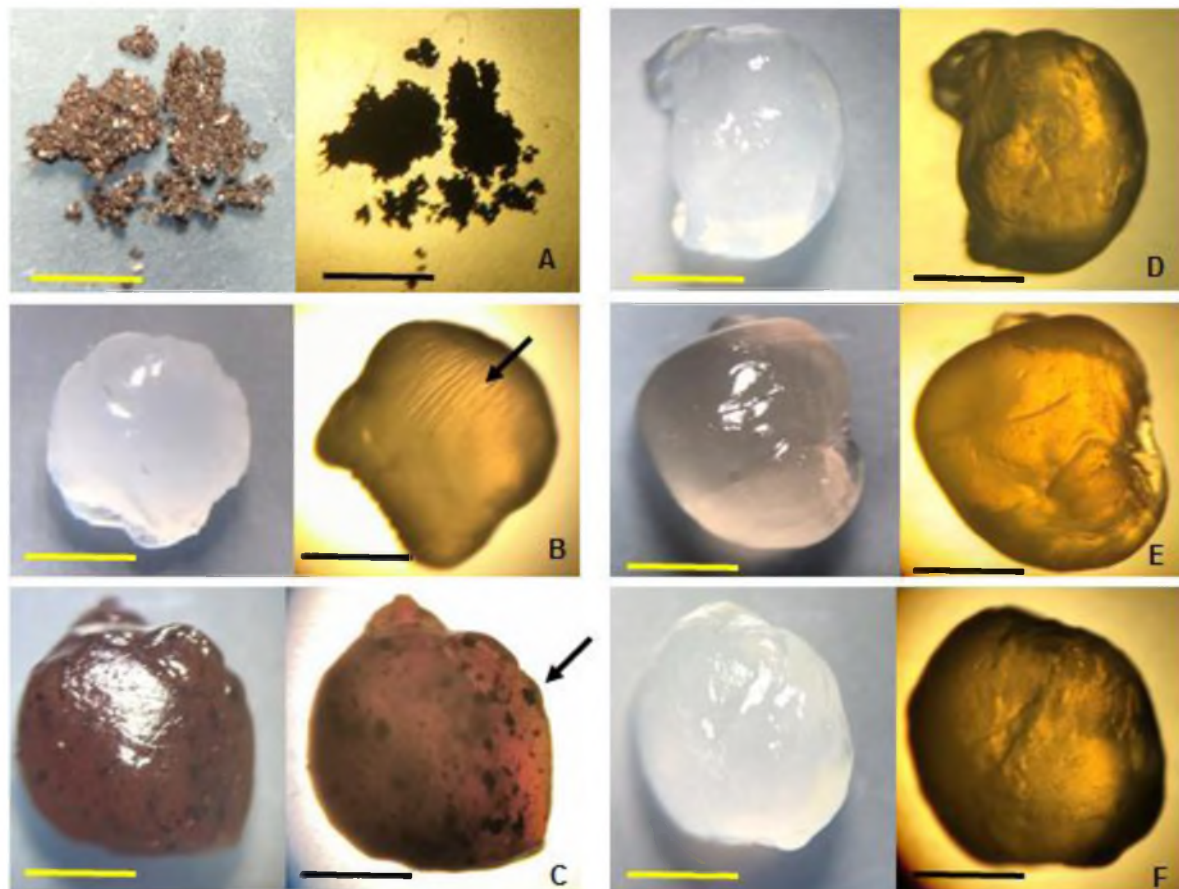
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ENCAPSULAMENTO DE *A. brasilense* EM MATRIZ DE ALGINATO DE SÓDIO

4.1.1 ASPECTOS MORFOMÉTRICOS DOS GRÂNULOS FORMADOS

No 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 extrudida e entrar em contato com o CaCl_2 0,1M estéril, sob agitação constante (Figura 2).

FIGURA 2. ASPECTO DAS ESFERAS DE INOCULANTES OBTIDAS ATRAVÉS DE DIFERENTES CARREADORES.



Legenda: **A:** Turfa, **B:** Alginato, **C:** Ácido húmico, **D:** Trealose 0,1 M, **E:** Trealose 0,5 M, **F:** Trealose 1M. Lado direito – luz incidente, lado esquerdo – contra-luz. Imagens obtidas através de lupa estereoscópica, aumento de 15X. Observe o aspecto estriado em B, e o acúmulo de grânulos em C (setas). Barra – 5mm.
Fonte: A autora (2017).

Os grânulos encapsulados e empacotados mantiveram o mesmo aspecto morfológico ao longo do período de avaliação, mantendo a cor e o formato até o 30º dia de avaliação. Exceção foi o tratamento com trealose 0,5 M que apresentou uma coloração escurecida por razões desconhecidas. As alíquotas de turfa conservaram o mesmo aspecto durante todo o experimento. Algumas esferas apresentaram estrias (Figura 2, B). No tratamento onde o ácido húmico foi adicionado foi observado um acúmulo granular proveniente da deposição do aditivo utilizado nesse tratamento (Figura 2, C).

Diversos trabalhos têm relatado protocolos para o encapsulamento de células bacterianas em matriz de géis biodegradáveis (BUREY *et al.*, 2008; SCHOEBITZ *et al.*, 2016; ROY *et al.*, 2015; SIVAKUMAR; PARTHASARTHI; LAKSHMIPRIYA,

2014). Os protocolos variam basicamente quanto ao equipamento e concentração do alginato de sódio usado, originando assim esferas de diferenciados tamanhos.

O aspecto estriado, observado nas esferas de alginato concordam com outros trabalhos que observaram ranhuras na superfície dos grânulos encapsulados (BERNINGER; MITTER; PREININGER, 2016).

TABELA 2. ANÁLISE MORFOMÉTRICA DOS GRÂNULOS GERADOS COM O INÓCULO DE *A. brasilense* APÓS 1 DIA DE ENCAPSULAMENTO.

Tratamento	Peso (mg)	Diâmetro (mm)	E.E. (%)
A	37,7 a	4,3 a	59,0
A + A.H.	31,7 ab	3,7 a	55,6
A + 0,1 M	16,7 c	3,3 a	60,5
A + 0,5 M	27,3 b	4,3 a	60,5
A + 1 M	30,0 b	4,0 a	39,8

Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. FONTE: A autora (2017).

Os dados morfométricos dos grânulos obtidos no 1º dia de encapsulamento estão demonstrados na Tabela 2. Foi observado um tamanho médio, avaliado pelo diâmetro individual das esferas variando entre 3,3 a 4,3 mm, porém as diferenças não foram significativas comprovando que o protocolo proposto foi competente para gerar esferas ou grânulos uniformes quanto ao tamanho.

Em relação ao peso, as alíquotas variaram entre 16,7 a 37,7 mg, sendo que as alíquotas com alginato e ácido húmico apresentaram pesos maiores em relação ao tratamento com trealose (Tabela 2).

A eficiência de encapsulamento revela que o protocolo apresentou uma eficiência média de 55,6 a 60,5%. Exceção foi o tratamento onde a trealose em maior concentração (1M) foi usada, diminuindo a eficiência em cerca de 15 a 20%.

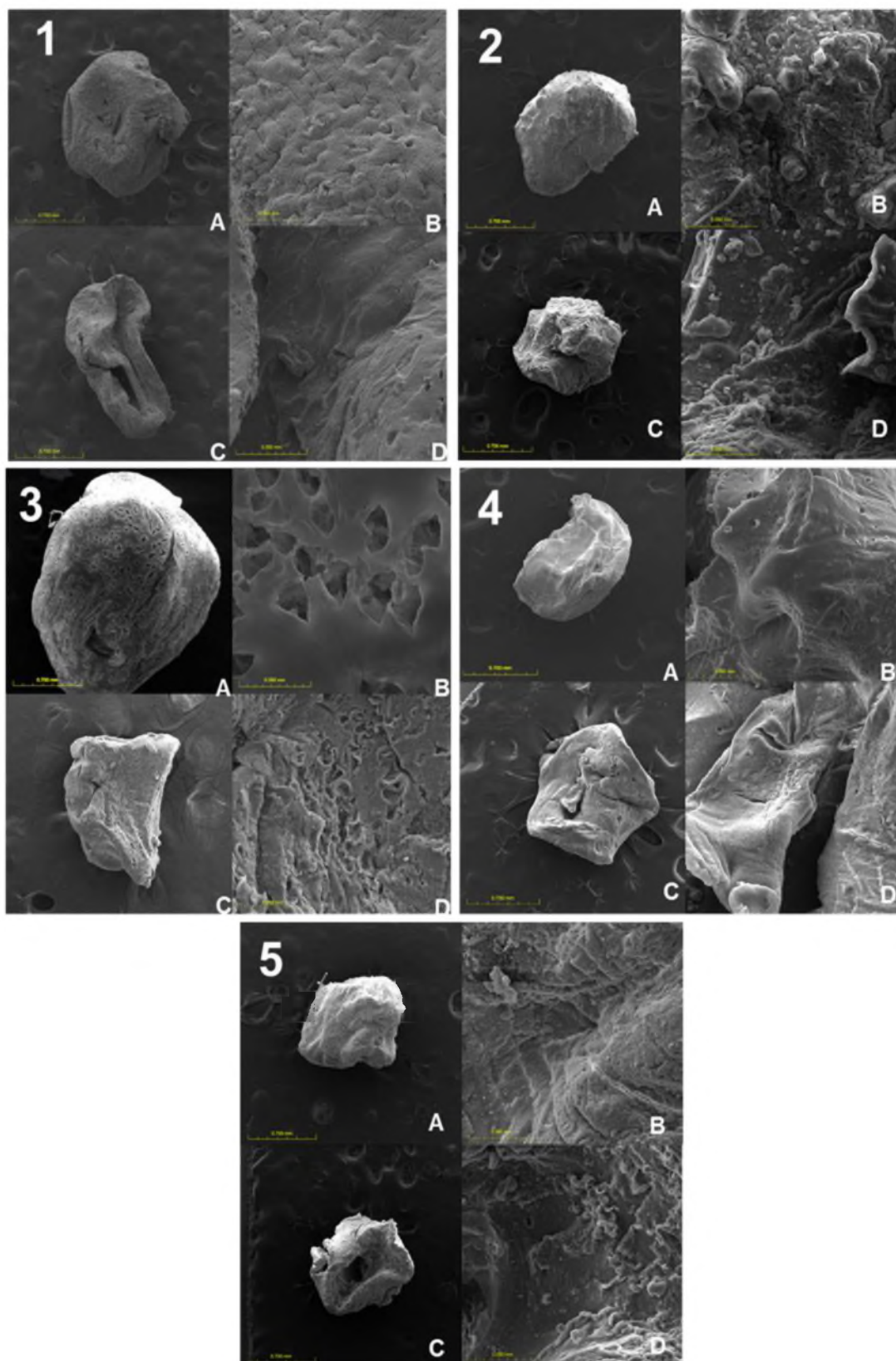
Ivanova et al. (2005) relataram tamanhos de esferas formadas pelo protocolo seguido variando entre 1 e 5 mm, e observaram que aumentando o tamanho da esfera a porcentagem de sobrevivência das bactérias foi aumentada em 36%.

O protocolo usado neste trabalho foi de Reetha et al. (2014) com modificações e, os autores ao avaliarem o peso de grânulos encapsulados em alginato e alginato aditivado com ácido húmico obtiveram partículas de tamanho (1,3 a 3,2 mm) e peso (0,5 a 10,3 mg) menores aos encontrados neste trabalho, explicados pelo tipo de equipamento de pipetagem usado durante a extrusão da solução.

Na figura 3 estão demonstradas as eletromicrografias do aspecto superficial externo e interno das esferas de alginato e seus aditivos. Pode-se observar que as superfícies, interna e externa, são irregulares. Os tratamentos formados somente por alginato e alginato com ácido húmico mostraram um aspecto enrugado, indicando possíveis invaginações e aumento de superfície, o que pode explicar uma possível correlação com o maior peso. Este resultado corrobora com os obtidos por outros autores que observaram em microfotografia uma área bastante enrugada e ranhurada (BASHAN, 1986; SIVAKUMAR; PARTHASARTHI; LAKSHMIPRIYA, 2014).

Os tratamentos com adição de trealose apresentaram aspecto mais liso, sem invaginações, de menor superfície, além disso, o tratamento com trealose 0,1M apresentou maior porosidade, o que justificaria os menores pesos. Nas eletromicrofotografias é possível a visualização de bactérias aderidas à matriz, demonstrando a presença de estruturas celulares intactas (Figura 3).

FIGURA 3. ELETROMICROFOTOGRAFIAS DO ASPECTO SUPERFICIAL EXTERNO E INTERNO DAS ESFERAS.



A: Superfície externa, aumento de 120x. **B:** Superfície interna, aumento de 120x. **C:** Superfície externa 1000X, **D:** Superfície interna, aumento de 1000X. **1.** Alginato. **2.** Alginato + Ácido Húmico 0,8% **3.** Alginato + Trealose 0,1M; **4.** Alginato +Trealose 0,5M e **5.** Alginato +Trealose 1M.
FONTE: A autora (2017).

Os dados obtidos com a espectrometria de raios X por energia dispersiva (EDS) estão demonstrados na Tabela 3. Esta técnica realiza a análise semiquantitativa de EDS dos grânulos, fazendo uma estimativa dos teores dos elementos químicos presentes nas superfícies estudadas. Como resultados obtidos, pode-se concluir que os tratamentos com aditivos apresentaram aumento de carbono, de 20 a 33% em relação ao tratamento apenas com alginato. Quanto aos teores de K e Na, as estimativas apontaram uma diminuição na concentração destes elementos na presença de trealose. O elemento Fe parece ter sido complexado quando os aditivos foram acrescentados. O Cu foi observado exclusivamente no tratamento com ácido húmico e o Cl parece estar associado à trealose.

TABELA 3. ESPECTROMETRIA DE RAIOS X POR ENERGIA DISPERSIVA (EDS).

Tratamento	Elemento químico (%)											
	C	O	Na	Al	Si	K	Ca	Fe	As	Cu	Br	Cl
A	32,8	37,7	4,14	1,03	0,97	0,43	13,9	0,58	8,33	-	-	-
A + A.H	42,4	35,6	3,82	-	0,18	0,11	3,74	-	13,5	0,17	0,48	-
A + 0,1 M	48,3	38,9	2,47	0,35	-	0,17	9,18	-	0,51	-	-	0,13
A + 0,5 M	41,2	38,1	2,94	-	-	0,15	10,4	-	6,75	-	0,43	0,09
A + 1 M	49,3	30,4	3,01	-	-	0,33	9,87	-	6,61	-	0,39	0,19

Fonte: A autora (2017).

4.1.2 SOBREVIVÊNCIA DE *A. brasilense* NAS ESFERAS

Todos os tratamentos foram planejados para iniciar com uma população de 10^9 UFC.mL⁻¹ de *A. brasilense*. Porém, na contagem do dia inicial (dia 0) a população bacteriana observada foi de aproximadamente 10^{12} UFC.mL⁻¹ em todos os tratamentos (Tabela 4). Este aumento foi encontrado também por Reetha et al. (2014) que observaram um aumento inicial da população em torno de 1000 vezes (10^{10} UFC.mL⁻¹ comparada com a 10^9 UFC.mL⁻¹).

TABELA 4. POPULAÇÃO BACTERIANA DAS ESFERAS NO DIA 0.

TRATAMENTO	UFC (X10 ⁹)	LOG
T	6430,0	12,8
A	7860,0	12,9
A + A.H.	7860,0	12,9
A + 0,1 M	4710000,0	14,7
A + 0,5 M	7860,0	12,9
A + 1 M	6430,0	12,8

Fonte: A autora (2017).

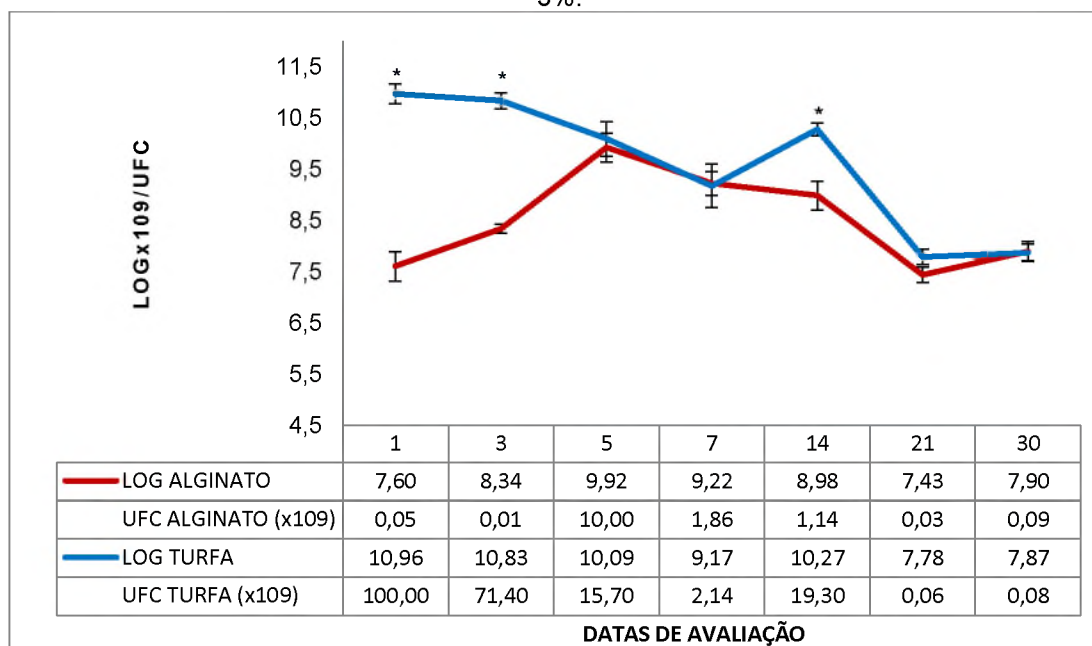
Este maior crescimento bacteriano pode ser explicado pelo fato do protocolo preconizar que, após o processo de adição dos componentes da mistura, esta solução permaneça sobre agitação suave durante 30 min a fim da completa homogeneização. Outro fator seria as bactérias encontrarem-se na fase logarítmica de crescimento celular conforme curva de crescimento previamente realizada.

Na menor concentração de trealose usada (0,1M) houve um efeito de aceleração de crescimento antes do encapsulamento, maior do que a observada nos outros tratamentos, provavelmente explicada pela maior fonte de energia. A maior concentração de carbono no meio encapsulado quando a trealose foi adicionada como adjuvante foi confirmada pela EDS (Tabela 3).

A concentração intermediária de trealose (0,5M) (Gráfico 4) promoveu inicialmente um maior crescimento de *A. brasilense* no meio da formulação, 12% em relação à turfa.

Os gráficos 1 a 5 demonstram o número de células bacterianas viáveis encontradas nos grânulos durante o período de armazenamento de 30 dias. A turfa foi usada como controle por ser o carreador mais comumente utilizado pela indústria de inoculantes (BASHAN; BASHAN; *et al.*, 2014).

GRÁFICO 1. DENSIDADE BACTERIANA OBSERVADA NAS ESFERAS DE ALGINATO DE CÁLCIO 3%.



*Médias seguidas de asterisco diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, à 5% de probabilidade.
FONTE: A autora (2017).

A população bacteriana observada ao final do período de avaliação foi 38% menor que a inicial. No 14º dia foi observado um aumento no valor da UFC.mL⁻¹ em torno de 11% em relação ao valor obtido aos 7 dias de armazenagem. Ao 30º dia de avaliação, o tratamento com turfa manteve uma população de 8×10^7 UFC.mL⁻¹.

Kaljeet et al. (2011) citam em um experimento avaliando a sobrevivência de *Rhizobium*, que a turfa foi o único carreador que manteve 10^7 UFC.g⁻¹ de inoculante por até 8 semanas de armazenagem.

No encapsulamento com alginato de cálcio, 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 o crescimento celular. Porém, em todos os tratamentos aplicados houve uma diminuição significativa no número de UFC.mL⁻¹ 24h após o encapsulamento demonstrando que a extrusão teve um efeito deletério ou estressante sobre a população bacteriana.

Comparando a densidade bacteriana do dia 0 com o dia 1, quando somente o alginato foi aplicado, observou-se uma queda acentuada das UFC.mL⁻¹ de cerca de 44% e de 35% se comparado à turfa no mesmo período de armazenagem.

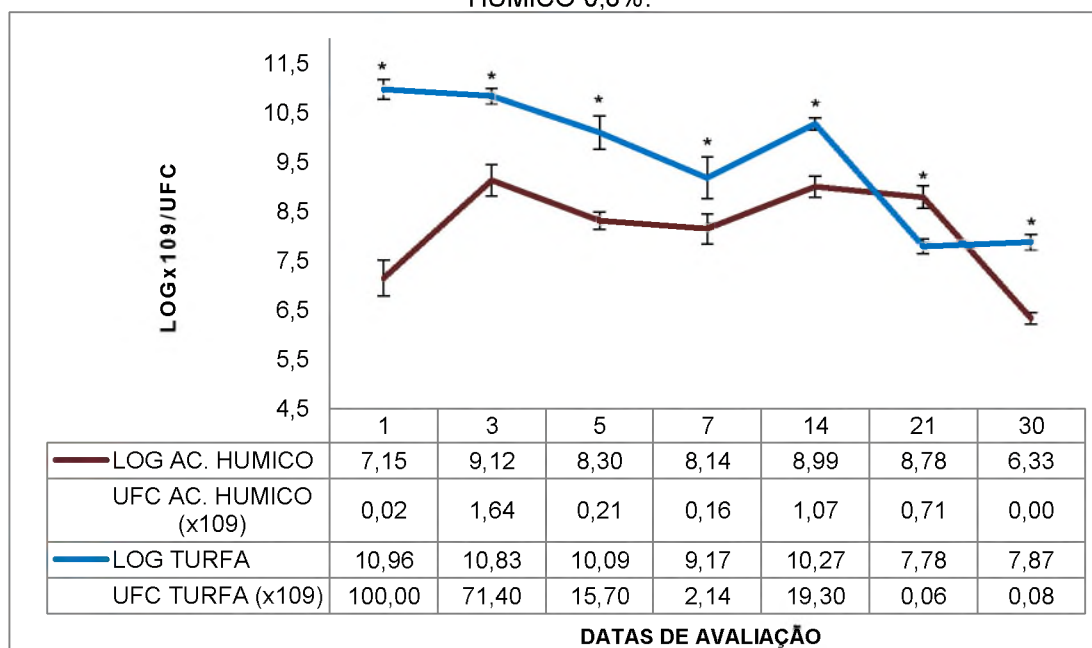
Após 5 dias a população bacteriana encapsulada foi similar à turfa demonstrando que houve crescimento celular dentro dos grânulos. Todavia, o encapsulamento não apresentou superioridade em relação à turfa em todos os

períodos avaliados. Ao final da avaliação (30 dias de armazenamento) houve uma diminuição de 38% em relação à população inicial. Ao 30º dia, o tratamento com alginato manteve uma população de 9×10^7 UFC.mL⁻¹ (Gráfico 1).

Os resultados obtidos para o tratamento somente com alginato concordam com os obtidos por Ivanova et al. (2005) que observaram diminuições maiores na fase inicial pós extrusão (7 dias). Bashan et al. (2002) observaram que o processo de microencapsulamento afetaria a sobrevivência bacteriana, matando muitas bactérias, pela formação de um complexo entre o alginato de cálcio com a membrana celular bacteriana.

Porém, os resultados são distintos aos obtidos por Reetha et al. (2014) que observaram também a redução na população microbiana em torno de 57% em apenas 6 dias de avaliação, mas após 30 dias esta população aumentou para $15,67 \times 10^9$ UFC.mL⁻¹.

GRAFICO 2. DENSIDADE BACTERIANA OBSERVADA NAS ESFERAS ADITIVADAS COM ÁCIDO HÚMICO 0,8%.



*Médias seguidas de asterisco diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, à 5% de probabilidade.
 FONTE: A autora (2017).

O ácido húmico usado como aditivo no encapsulamento teve um comportamento similar ao alginato onde a população microbiana encontrada na turfa foi 1,53 vezes maior que a população das esferas encapsuladas com ácido húmico de adjuvante após o primeiro dia (Gráfico 2). Houve um aumento na população microbiana observada aos 3 dias de 21% e após este período houve a manutenção

das UFC.mL⁻¹ na casa dos 0,21 a 0,71x10⁹ UFC.mL⁻¹. No 30º dia de avaliação houve um decréscimo na população bacteriana em ambos os tratamentos (turfa e alginato de cálcio + ácido húmico), porém neste último os valores foram maiores cerca de 51% em relação à população inicial (dia 0).

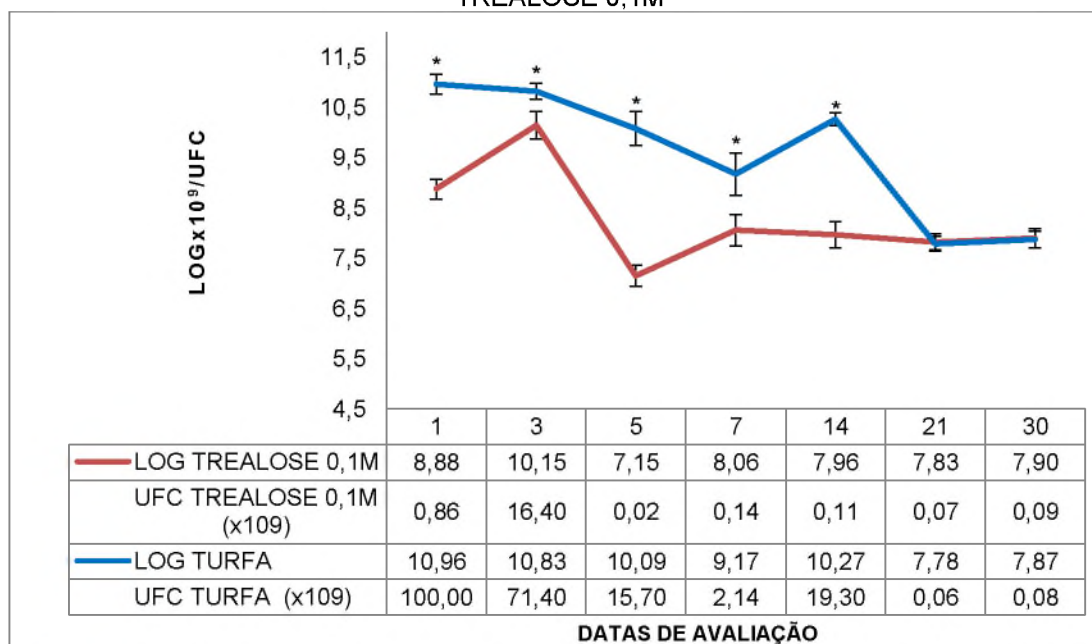
O método de encapsulamento tem grande efeito nos resultados de sobrevivência bacteriana. A associação entre o alginato de sódio e o ácido húmico foi avaliada por Young et al. (2006) que não observaram a perda de microbiota (2x10⁸ UFC.g⁻¹ de esfera) após 24h do encapsulamento ou mesmo após 5 meses de armazenamento.

Reetha et al. (2014) observaram, em protocolo similar, porém com concentração de 2,5% de alginato de sódio, que a presença de ácido húmico promoveu a menor redução no número de UFC.mL⁻¹ de *A. lipoferum* MAZ-3. Os autores relatam que o efeito benéfico observado ocorreu pelo fato do ácido húmico promover um aumento na porosidade, aumentando a oxigenação e acesso a nutrientes, facilitando o metabolismo celular dentro dos grânulos.

Os dados obtidos para a sobrevivência bacteriana após encapsulamento e tendo como aditivo a trealose em 3 diferentes concentrações (0,1 M; 0,5 M e 1M) estão demonstrados nos gráficos 3 a 5. As diferentes concentrações promoveram efeitos distintos sobre a microbiota encapsulada.

Na menor concentração de trealose utilizada (0,1M) foi observada uma flutuação na população bacteriana ao longo do período avaliado. Após as 24h de encapsulamento, houve uma queda acentuada das UFC.mL⁻¹ cerca de 40% em relação ao dia 0 e 18% em relação à turfa no mesmo dia de avaliação. No entanto, no 5º dia, a diminuição foi maior ainda, correspondendo à perda em 19% em relação ao 1º dia após encapsulamento e 51% da população original (dia 0). Este decréscimo seria possivelmente explicado pela exaustão da fonte de dissacarídeos usada no metabolismo bacteriano. No entanto, ao 30º dia a população bacteriana ficou na ordem de 9x10⁷ UFC.mL⁻¹ similar ao encontrado na turfa.

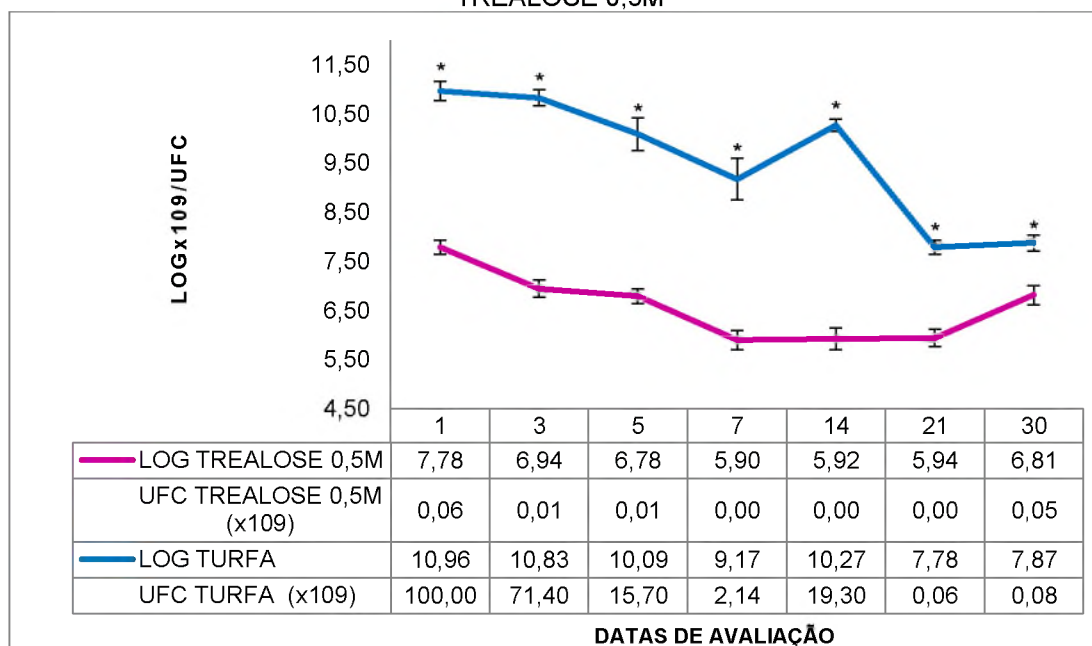
GRAFICO 3. DENSIDADE BACTERIANA OBSERVADA NAS ESFERAS ADITIVADAS COM TREALOSE 0,1M



*Médias seguidas de asterisco diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, à 5% de probabilidade.
 FONTE: A autora (2017).

A partir do 1º dia a trealose 0,5M promoveu um comportamento inferior a turfa no que diz respeito à manutenção da sobrevivência bacteriana. Após as 24h de encapsulamento houve uma queda acentuada das UFC.mL⁻¹, comparando a população inicial (dia 0), de cerca de 39% em relação ao dia anterior e 29% em relação à turfa no mesmo dia de avaliação. Nas avaliações seguintes foi observada uma tendência de decréscimos na sobrevivência da microbiota encapsulada (3º ao 21º dia). No entanto, no 30º dia a população bacteriana ficou na ordem de 5x10⁷ UFC.mL⁻¹ similar ao encontrado na turfa (8x10⁷ UFC.mL⁻¹).

GRAFICO 4. DENSIDADE BACTERIANA OBSERVADA NAS ESFERAS ADITIVADAS COM TREALOSE 0,5M



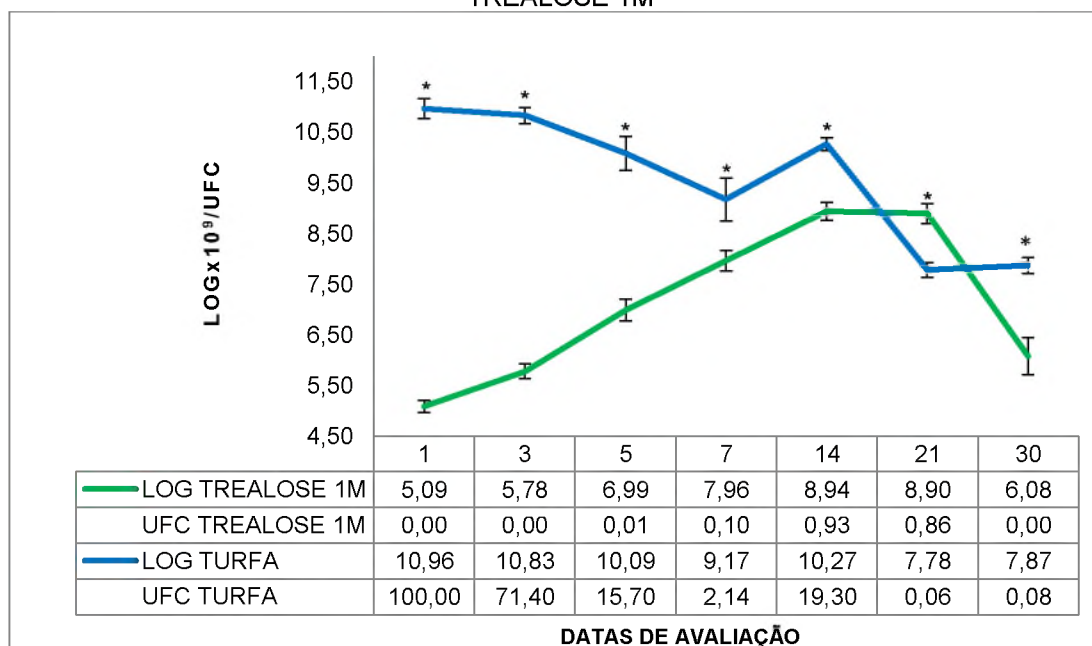
*Médias seguidas de asterisco diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, à 5% de probabilidade.
 FONTE: A autora (2017).

A maior concentração de trealose avaliada (1M) (Gráfico 5) promoveu um decréscimo significativo de cerca de 60% no número de UFC.mL⁻¹ 24h após o encapsulamento. Porém, foi observada uma tendência de aumento na sobrevivência bacteriana nas avaliações até o 21º dia de armazenagem, as UFC.mL⁻¹ foram significativamente maiores (41% e 12% em relação ao 1º dia da trealose e 21º dia da turfa, respectivamente), com uma população de 10⁶ UFC.mL⁻¹ menor que a encontrada na turfa (10⁷ UFC.mL⁻¹).

Este aumento deve ser explicado pela maior concentração de C presente nesta concentração de açúcar que após estresse aplicado pelo processo de encapsulamento, acarretou em reserva energética promovendo um acréscimo na sobrevivência bacteriana nos períodos de avaliação (Tabela 3).

O'Callaghan (2016) citam que os maiores benefícios da presença dos aditivos nas formulações de encapsulamento seria oportunizar melhores condições às bactérias para suportar intempéries e alavancar o vigor celular uma vez liberada da matriz.

GRÁFICO 5. DENSIDADE BACTERIANA OBSERVADA NAS ESFERAS ADITIVADAS COM TREALOSE 1M

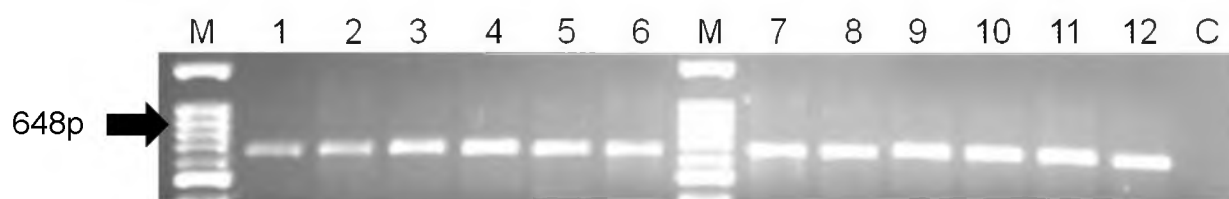


*Médias seguidas de asterisco diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, à 5% de probabilidade.
 FONTE: A autora (2017).

4.2 CONFIRMAÇÃO MOLECULAR DA PRESENÇA DA ESTIRPE *A. brasilense*

As bactérias crescidas nas análises de sobrevivência bacteriana no dia do encapsulamento, ou inoculação no caso da turfa, de cada tratamento foram caracterizadas através da amplificação utilizando *primers* específicos para *A. brasilense*. A presença de um fragmento de 648 pb confirma que as colônias crescidas pertencem a esta espécie e estão demonstradas nas bandas de 1 a 6 o que confirma que o inóculo utilizado para dar origem às esferas foi composto por bactérias *Azospirillum brasilense* (Figura 4).

Uma amostra das análises de viabilidade bacteriana, de cada tratamento, foi retirada randomicamente e caracterizada pela análise de reação em cadeia da polimerase e a presença de fragmentos de 648 pb comprova que as bactérias contidas nos grânulos, e que inocularam as plantas pertencem a espécie *A. brasilense* e estão demonstradas nas bandas de 7 a 12.

FIGURA 4. REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE DE *A. brasilense*

LEGENDA: As bandas de 1 a 6 correspondem às amostras coletadas no 1º dia após o encapsulamento ou alíquotagem: **M.** Marcador de peso molecular 100pb. **1.** Turfa; **2.** Alginato; **3.** Alginato + ácido húmico; **4.** Alginato + trealose 0,1M; **5.** Alginato + trealose 0,5M; **6.** Alginato + trealose 1M; Bandas de 7-12 são referentes as bactérias epifiticamente observadas: **7.** Turfa (7 dias); **8.** Alginato (7 dias); **9.** Alginato + ácido húmico (21 dias); **10.** Alginato + trealose 0,1M (14 dias); **11.** Alginato + trealose 0,5M (30 dias); **12.** Alginato + trealose 1M (7 dias); **C.** Controle negativo.
 FONTE: A autora (2017).

4.3 VIABILIDADE DE *A. brasilense* DURANTE O PERÍODO DE ARMAZENAMENTO

A quantificação da viabilidade de *A. brasilense* após o processo de encapsulamento e tempo de armazenagem foi realizada com teste *in vitro* da população microbiana que realmente se associou ou população bacteriana epifiticamente aderida às plântulas de trigo.

Em todos os tratamentos avaliados, o encapsulamento pareceu ter um efeito benéfico para a formação de uma população que verdadeiramente se associará com as plântulas e promova crescimento vegetal (Gráficos 6 a 10).

A população epifítica obtida no dia 0, de cada tratamento está demonstrada na Tabela 5.

TABELA 5. POPULAÇÃO EPÍFITICA DAS RAÍZES DE TRIGO OBTIDAS NO DIA 0.

TRATAMENTO	UFC (X10 ⁹)	LOG
T	1,07	8,95
A	7,86	9,85
A + A.H.	7,86	9,85
A + 0,1 M	7,86	9,85
A + 0,5 M	7,86	9,85
A + 1 M	1,07	8,95

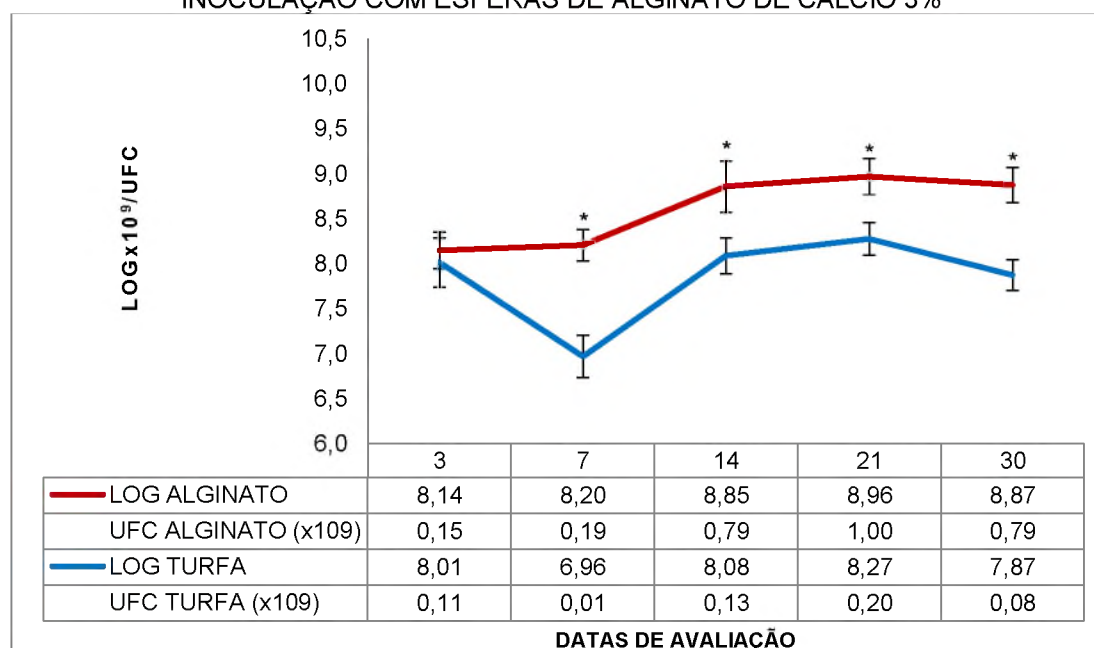
Fonte: A autora (2017)

Para o dia 0, as populações encontradas nos tratamentos turfa e trealose 1 M são idênticas, uma vez que esses tratamentos foram iniciados no mesmo dia e a partir do mesmo inóculo, porém são diferentes das populações iniciais dos outros 4

tratamentos. Os tratamentos alginato 3%, ácido húmico 0,8%, trealose 0,1 M e trealose 0,5 M também apresentaram a mesma população epifítica no dia 0, porém a trealose 0,1 M foi iniciada em dia diferente aos demais. O fato de todos os tratamentos terem a mesma bactéria, e o seu comportamento nas plantas ser semelhante explica a semelhança no número de bactérias encontradas aderidas às raízes das plantas. A contagem microbiana do número de UFC foi adequadamente na base 10^9 para que os tratamentos pudessem ser comparados entre si, esses mesmos números foram transformados em logaritmo.

A população epifítica de plântulas de trigo, quando o carreador usado foi a turfa, variou de 10^9 a 10^7 UFC.mL⁻¹ ao longo dos 30 dias de armazenamento. Esta população apresentou uma diminuição de 22% no 7º dia após o encapsulamento. No 30º dia, a população aderida às raízes de trigo foi da ordem de $7,87 \times 10^7$ UFC.mL⁻¹ (Gráfico 6).

GRÁFICO 6. DENSIDADE BACTERIANA EPIFÍTICA ADERIDA ÀS PLÂNTULAS DE TRIGO APÓS A INOCULAÇÃO COM ESFERAS DE ALGINATO DE CÁLCIO 3%

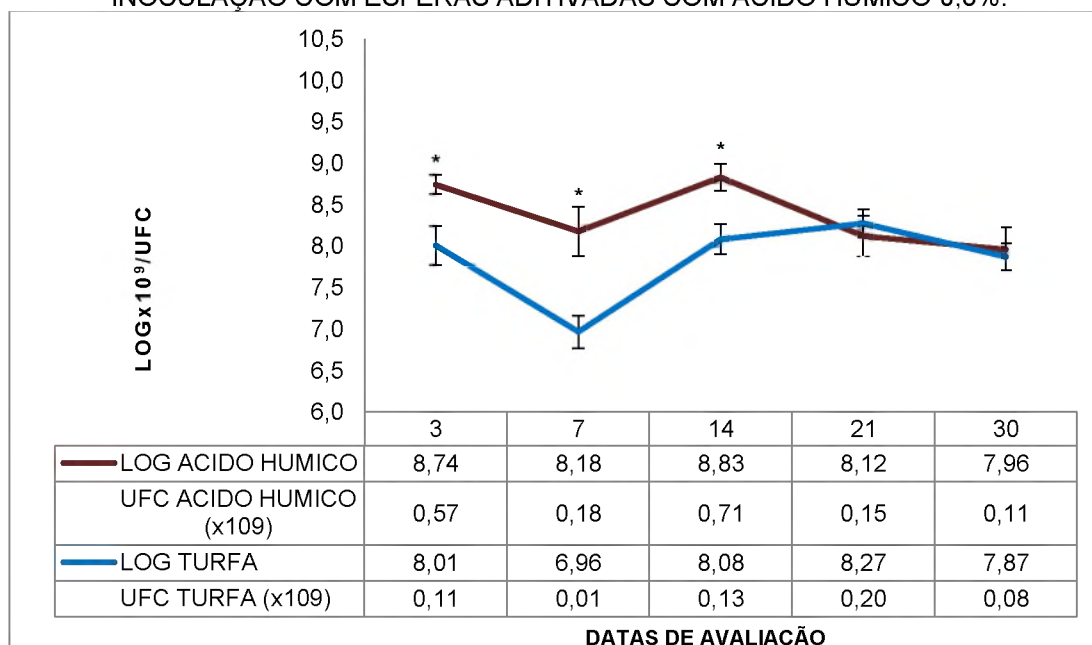


*Médias seguidas de asterisco diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, à 5% de probabilidade.
FONTE: A autora (2017).

O encapsulamento em matriz de alginato de cálcio sem aditivos apresentou uma população epifítica superior à turfa em praticamente todos os períodos de avaliação. Esta população foi 9% maior no dia do encapsulamento e 11% na última avaliação realizada. No 30º dia, a população aderida às raízes de trigo foi da ordem de $7,9 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹ (Gráfico 6).

A população epifítica de plântulas de trigo quando o carreador utilizado foi o ácido húmico variou de 10^8 a 10^9 UFC.mL⁻¹ ao longo dos 30 dias de armazenamento. Esta população apresentou uma diminuição de 17% no 7º dia em relação ao dia 0 (Tabela 4), porém 15% superior em relação à turfa, também no 7º dia após o encapsulamento. No 21º dia, a população aderida às raízes de trigo foi de $1,1 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹ (Gráfico 7).

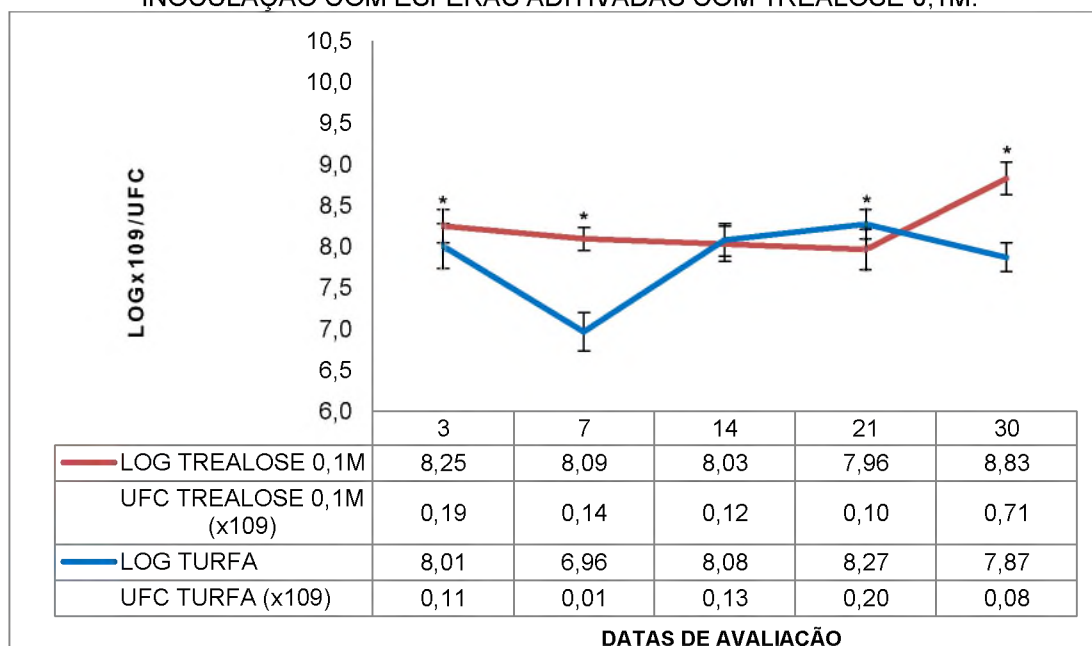
GRÁFICO 7. DENSIDADE BACTERIANA EPIFÍTICA ADERIDA ÀS PLÂNTULAS DE TRIGO APÓS A INOCULAÇÃO COM ESFERAS ADITIVADAS COM ÁCIDO HÚMICO 0,8%.



*Médias seguidas de asterisco diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, à 5% de probabilidade.
FONTE: A autora (2017).

A população epifítica de plântulas de trigo quando o aditivo usado foi a trealose na menor concentração (0,1M) demonstra comportamento similar à turfa. As avaliações dos 14º e 21º dias após armazenamento apontaram para uma população epifítica similar e inferior, respectivamente, à liberada pela turfa somente. No 30º dia, a população aderida foi 11% superior (Gráfico 8).

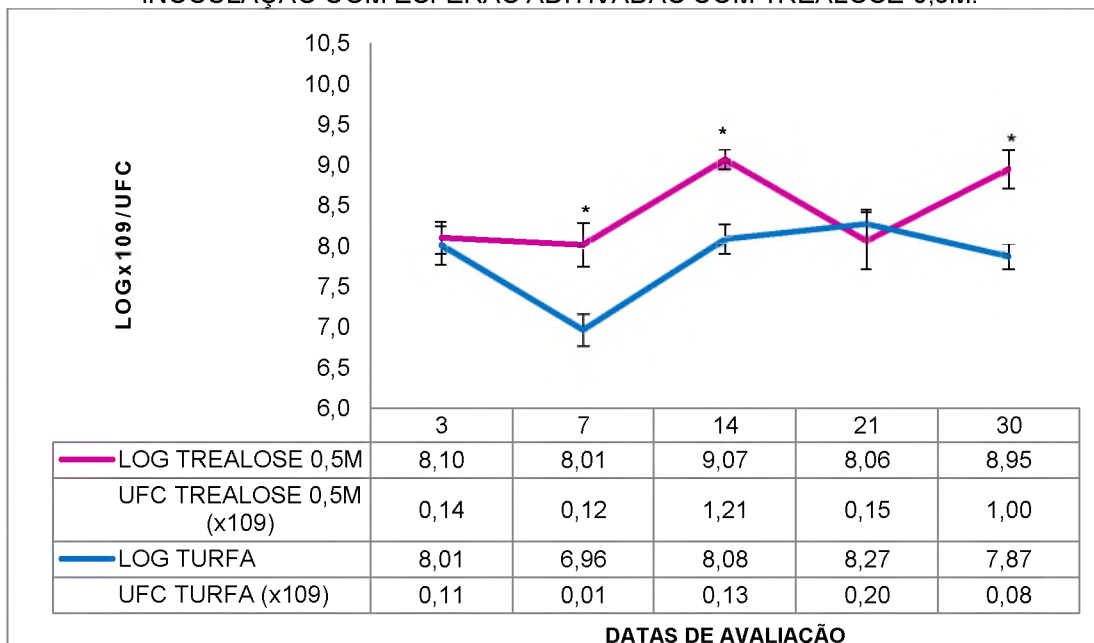
GRÁFICO 8. DENSIDADE BACTERIANA EPIFÍTICA ADERIDA ÀS PLÂNTULAS DE TRIGO APÓS A INOCULAÇÃO COM ESFERAS ADITIVADAS COM TREALOSE 0,1M.



*Médias seguidas de asterisco diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, à 5% de probabilidade.
 FONTE: A autora (2017).

A trealose na concentração de 0,5M também promoveu um aumento na população epifítica das bactérias encapsuladas. Observa-se os maiores incrementos aos 7º, 14º e 30º dias de avaliação, respectivamente 13%, 11% e 12%. Somente aos 21 dias após o encapsulamento, houve uma diminuição no número de bactérias aderidas às raízes, porém de valor similar à turfa. As avaliações realizadas aos 14 e 21 dias após armazenamento apontaram para uma população epifítica inferior, mas similar do tratamento controle (turfa). No 30º dia, a população aderida foi 10×10^8 UFC.mL⁻¹ com a adição de trealose 0,5M maior que a encontrada na turfa (Gráfico 9).

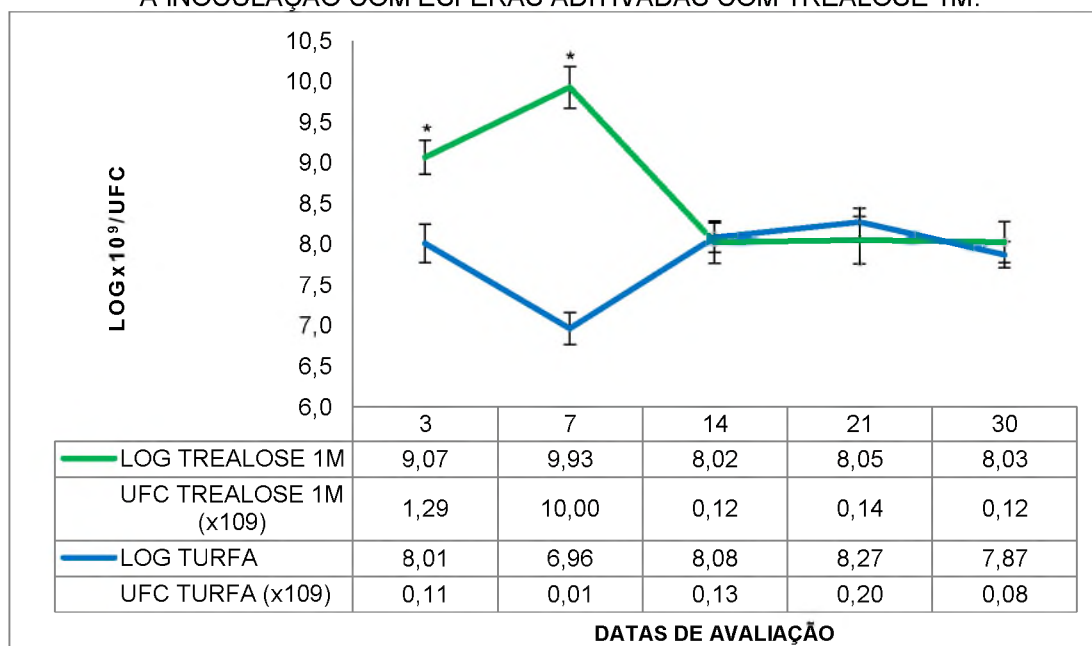
GRAFICO 9. DENSIDADE BACTERIANA EPIFÍTICA ADERIDA ÀS PLÂNTULAS DE TRIGO APÓS A INOCULAÇÃO COM ESFERAS ADITIVADAS COM TREALOSE 0,5M.



*Médias seguidas de asterisco diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, à 5% de probabilidade.
 FONTE: A autora (2017).

A população epifítica de plântulas de trigo quando o aditivo usado foi a trealose na maior concentração (1M) demonstra um efeito potencializador deste dissacarrídeo principalmente até o 7º dia após o encapsulamento. Após esta data, o número de UFC.mL⁻¹ diminui em 20% em relação ao dia do encapsulamento, demonstrando que possivelmente a concentração de carbono e outros elementos seja exaurida pelo rápido crescimento microbiano que entra num equilíbrio. No 30º dia, a população aderida às raízes de trigo foi da ordem de 10⁸ UFC.mL⁻¹ similar a turfa (Gráfico 10).

GRÁFICO 10. DENSIDADE BACTERIANA EPIFÍTICA ADERIDA ÀS PLÂNTULAS DE TRIGO APÓS A INOCULAÇÃO COM ESFERAS ADITIVADAS COM TREALOSE 1M.



*Médias seguidas de asterisco diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, à 5% de probabilidade.
 FONTE: A autora (2017).

Os resultados positivos para uma maior sobrevivência e viabilidade celular encontrada nas formulações com a maior concentração de trealose (Gráficos 5 e 10) apontam para um maior efeito protetor da trealose sobre proteínas e componentes da membrana celular (LESLIE *et al.*, 1995). Por outro lado, o melhor desempenho da turfa em termos de número de UFC.mL⁻¹ em relação ao encapsulamento pode ser explicado pela maior retenção de umidade uma vez que durante o encapsulamento pode ter havido perda de água (KALJEET; KEYEO; AMIR, 2011). Outro fator, é que a turfa proveria melhor oxigenação do inoculante, mas tem o inconveniente de apresentar grande contaminação. Sem o uso de ácido nalidíxico e fungicida não foi possível a realização das avaliações no tratamento com a turfa.

Bashan *et al.* (2002) por outro lado citam que a matriz de alginato de cálcio é rica em água (97-98%) e por isso ela falharia na proteção celular. Schoebitz (2013) demonstraram que a adição de amido ao alginato reduziu a concentração de água para 65% e significativamente melhorou a sobrevivência bacteriana.

As análises moleculares das amostras randomicamente retiradas de bactérias epifíticamente aderidas às raízes das plântulas confirmam a presença de *Azospirillum brasilense* como proveniente do inóculo usado (Figura 4).

4.4 PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL PELA INOCULAÇÃO DE PLÂNTULAS DE TRIGO COM *A. brasilense*

Os dados para o comprimento de raiz das plântulas obtidas a partir de sementes pré-germinadas inoculadas com as diferentes formulações nos diferentes períodos de armazenamento estão demonstrados na Tabela 6. Todas as plântulas inoculadas com as diferentes formulações foram avaliadas após 7 dias de inoculação e não foi observado um comportamento de crescimento padrão para as plantas relativo às diferentes formulações usadas ou relativo ao período de armazenamento.

Plântulas controle, isto é, sem inoculação, apresentaram tamanho médio de 32,7 a 77 mm de comprimento radicular e 16 a 38 mg de biomassa radicular nas diferentes avaliações referentes aos distintos períodos de armazenamento. Também, nas plantas controle avaliadas após 3 e 14 dias do encapsulamento foram observados os melhores resultados de comprimento de raiz (14º dia) e peso de raízes (3º e 14º dia). Estes resultados refletem diferenças inerentes ao vigor das sementes do genótipo CD104, já que as condições de crescimento foram similares entre todos os tratamentos e período de avaliação.

Quando a turfa foi usada como carreador na formulação, o crescimento da parte radicular foi significativamente maior no dia da inoculação. Rekha et al. (2007) observaram maiores acréscimos no comprimento radicular em alface quando bactérias do gênero *Bacillus sp.* apresentavam-se livres no meio de inoculação em comparação com o tratamento encapsulado.

A presença do alginato e o encapsulamento por si só promoveram maiores acréscimos no comprimento das raízes após 7 e 21 dias. Em relação ao peso das raízes, o encapsulamento promoveu os maiores acréscimos aos 7,14 e 21 dias de armazenagem. Estes dados corroboram com os obtidos para a maior população epifítica encontrada aderida às plântulas de trigo, promovendo o crescimento da parte radicular (Gráfico 6).

O encapsulamento em alginato de cálcio e o uso de aditivos como o ácido húmico apresentou peso de raízes maior apenas no 14º dia de armazenagem. Sivakumar et al. (2014) relataram do efeito benéfico do ácido húmico sobre o crescimento da parte aérea quando células de *Bacillus sp.* eram encapsuladas com o ácido húmico. Young et al. (2006) citam que houve um aumento no comprimento

das raízes (28%) e da parte aérea (33%), quando as sementes eram inoculadas com 10^7 UFC.mL⁻¹ de *B. subtilis* adicionada com ácido húmico.

Quando a trealose foi usada como adjuvante à formulação do inoculante, apenas as maiores concentrações promoveram diferenças significativas em relação ao comprimento radicular na primeira avaliação para peso e comprimento radicular (trealose 1M) e na concentração de 0,5 M, o peso no 3º dia e comprimento da raiz no 30º dia foram maiores em relação aos demais.

No entanto, apesar da maior população epifítica até o 7º dia de armazenamento, esta não proporcionou incrementos no comprimento e peso radicular das plântulas. Também, nenhum dos tratamentos obteve diferenças significativas em todas as datas de avaliação para as variáveis comprimento e peso de raiz, demonstrando que a promoção de crescimento vegetal diretamente avaliada na planta é passível de ser modificada por outras variáveis, não correspondendo efetivamente à população bacteriana disponível no solo.

Sivakumar et al. (2014), relataram que em sementes inoculadas com esferas contendo *Bacillus megaterium* o maior efeito na promoção do crescimento foi pela estirpe bacteriana usada e não propriamente a formulação na qual estas bactérias estavam (turfa ou encapsuladas). Todavia, o encapsulamento não reduziu a viabilidade das UFC ao longo do período de armazenamento.

Apesar da literatura frequentemente demonstrar a eficácia laboratorial e em experimentos em casa de vegetação da inoculação de sementes usando bactérias promotoras de crescimento vegetal, há uma carência de literatura relatando o processo de encapsulamento e armazenamento destas bactérias, tendo em vista que, em muitos experimentos as técnicas de encapsulamento e avaliação do efeito de armazenamento não utilizam os mesmos parâmetros prejudicando a comparação entre os mesmos.

A formulação de inoculantes e o modo de aplicação à campo são plataformas puramente tecnológicas que se baseiam nos princípios fundamentais da microbiologia e na ciência dos materiais. Deste modo, a unificação destes campos será fundamental para a criação de novos bioprodutos de grande aplicação agrônômica de modo sustentável.

TABELA 6. CRESCIMENTO RADICULAR DAS PLÂNTULAS DE TRIGO A PARTIR DA INOCULAÇÃO COM DIFERENTES FORMULAÇÕES EM DIFERENTES PERÍODOS DE ARMAZENAGEM.

Comprimento Radicular (mm)						
	DIA 0	DIA 3	DIA 7	DIA 14	DIA 21	DIA 30
T	88,8 ±0,70 a	25,0 ±0,40 c	32,0 ±0,43 bc	32,7 ±1,37 c	27,3 ±0,25 d	71,2 ±2,04 ab
A	44,8 ±0,15 b	43,8 ±0,28 b	47,8 ±1,39 a	53,3 ±1,14 b	69,2 ±1,08 a	27,5 ±0,35 e
A + A.H.	43,3 ±0,12 b	48,2 ±0,53 b	36,3 ±0,53 abc	66,8 ±1,02 ab	56,7 ±1,57 ab	55,3 ±1,90 bc
A + 0,1 M	25,7 ±0,20 c	22,8 ±0,30 c	43,3 ±0,49 ab	14,5 ±0,23 d	31,8 ±0,64 cd	48,7 ±0,69 cd
A + 0,5 M	43,3 ±0,12 b	55,7 ±0,38 b	32,5 ±0,41 bc	25,3 ±0,12 cd	47,0 ±1,34 bc	79,8 ±0,82 a
A + 1 M	88,8 ±0,70 a	31,3 ±0,41 c	27,3 ±0,70 c	17,3 ±1,27 cd	40,0 ±0,89 bcd	36,8 ±0,66 cde
Controle	45,7 ±0,33 b	69,3 ±1,72 a	46,0 ±1,32 ab	77,7 ±0,94 a	44,0 ±0,91 bcd	32,7 ±0,88 de
Peso Radicular (mg)						
	DIA 0	DIA 3	DIA 7	DIA 14	DIA 21	DIA 30
T	62,5 ±0,00 a	23,2 ±0,01 b	16,5 ±0,01 c	33,0 ±0,02 ab	29,5 ±0,00 bcd	66,5 ±0,01 a
A	41,2 ±0,01 b	24,8 ±0,00 b	38,2 ±0,02 a	47,8 ±0,02 a	56,7 ±0,01 a	24,5 ±0,01 c
A + A.H.	42,7 ±0,01 b	26,3 ±0,01 ab	35,8 ±0,01 ab	52,5 ±0,01 a	42,8 ±0,01 ab	46,0 ±0,01 ab
A + 0,1 M	19,5 ±0,00 c	26,5 ±0,01 ab	32,0 ±0,01 abc	15,0 ±0,01 b	26,0 ±0,00 cd	40,8 ±0,01 bc
A + 0,5 M	42,7 ±0,01 b	37,7 ±0,01 a	28,3 ±0,01 abc	19,2 ±0,00 b	36,2 ±0,01 bc	56,2 ±0,01 ab
A + 1 M	62,5 ±0,00 a	20,2 ±0,00 b	26,5 ±0,01 abc	19,3 ±0,01 b	42,0 ±0,01 b	61,5 ±0,02 ab
Controle	38,8 ±0,00 b	23,0 ±0,01 b	18,7 ±0,01 bc	40,5 ±0,01 a	16,2 ±0,01 d	24,2 ±0,01 c

*Médias seguidas de letras iguais nas diferentes formulações de inoculantes não diferem entre si pelo teste Tukey.

FONTE: A autora (2017).

5 CONCLUSÕES

Como conclusões obtidas neste estudo tem-se que:

- ✓ O protocolo de encapsulamento modificado com a concentração de alginato de sódio a 3% foi capaz de gerar grânulos homogêneos e sustentar o crescimento e a viabilidade celular de *A. brasilense* por 30 dias;
- ✓ A turfa continua sendo um excelente carreador para a população bacteriana mantendo melhor a sobrevivência das células bacterianas;
- ✓ O processo de encapsulamento através do uso de alginato de sódio apesar de promover as maiores perdas na sobrevivência bacteriana nos primeiros dias de armazenamento, promoveu os maiores aumentos na viabilidade celular durante o armazenamento;
- ✓ O uso de aditivos na composição dos formulados foi eficiente para melhorar a viabilidade celular durante o armazenamento. Destaca-se a trealose 1M que promoveu a maior população epifítica até o 7º dia de encapsulamento;
- ✓ O ácido húmico foi eficiente para melhorar a viabilidade celular durante o armazenamento até o 14º dia de armazenamento;
- ✓ Após 30 dias de armazenamento, a densidade populacional das diferentes formulações estabilizou em aproximadamente 10^7 UFC.mL⁻¹
- ✓ Nenhum dos tratamentos obteve diferenças significativas em todas as datas de avaliação, para as variáveis comprimento e peso de raiz demonstrando que a promoção de crescimento vegetal diretamente avaliada na planta é passível de ser modificada por outras variáveis, não correspondendo efetivamente à população bacteriana disponível no solo.

REFERÊNCIAS

- AHEMAD, M. and KHAN, M.S. (2012). **Effects of pesticides on plant growth promoting traits of Mesorhizobium strain MRC4** J. Saudi Soc. Agric. Sci., 11: 63–71.
- ALAMRI, S. A.; MOSTAFA, Y. S. (2009) **Effect of nitrogen supply and Azospirillum brasilense Sp- 248 on the response of wheat to seawater irrigation**. Saudi Journal of Biological Sciences, v.16, p.101 - 107.
- AMAS, 2003. **Food and Agricultural Research Council**, Réduit, Mauritius., p.29-39.
- ARAUJO, SOLON C. (2013). **“A Evolução Da Produção de Inoculantes No Brasil – Anpii.”** <http://www.anpii.org.br/a-evolucao-da-producao-de-inoculantes-no-brasil/>.
- ARZANESH, M H, H A ALIKHANI, K KHAVAZI, H A RAHIMIAN, and M MIRANSARI. (2011). **“Wheat (Triticum Aestivum L.) Growth Enhancement by Azospirillum Sp. under Drought Stress.”** World Journal of Microbiology and Biotechnology 27 (2): 197–205. doi:10.1007/s11274-010-0444-1.
- ASLI, S., & NEUMANN, P. M. (2010). **Rhizosphere humic acid interacts with root cell walls to reduce hydraulic conductivity and plant development**. Plant and Soil, 336(1-2), 313-322.
- AZEREDO, H.M.C. **Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. Alimentos e Nutrição**, v.16, n.1, p.89-97, 2005. Available from: <<http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/alimentos/article/view/106/119>>. Accessed: Jun. 20, 2012. doi:ISSN 0103-4235.
- BARDI, L., & MALUSÀ, E. (2012). **Drought and nutritional stresses in plant: alleviating role of rhizospheric microorganisms**. *Abiotic stress: new research*. Nova Science Publishers Inc., Hauppauge, NY, 1-57.
- BASHAN, Y. LUZ, E. DE-BASHAN, S. R. PRABHU, and JUAN-PABLO H. (2014). **“Advances in Plant Growth-Promoting Bacterial Inoculant Technology: Formulations and Practical Perspectives.”** Plant and Soil 378 (1–2): 1–33. doi:10.1007/s11104-013-1956-x.
- BASHAN, Y, HOLGUIN G, DE-BASHAN LE (2004) **Azospirillum–plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997–2003)**. Can J Microbiol 50:521–577.

- BASHAN, L. E., BASHAN Y., MORENO M., LEBSKY V. K, and BUSTILLOS J. J. (2002). **“Increased Pigment and Lipid Content, Lipid Variety, and Cell and Population Size of the Microalgae *Chlorella* Spp. When Co-Immobilized in Alginate Beads with the Microalgae-Growth-Promoting Bacterium *Azospirillum Brasilense*.”** Canadian Journal of Microbiology 48 (6): 514–21. doi:10.1139/w02-051.
- BASHAN, Y. LUZ, E. DE-BASHAN, S. R. PRABHU, and JUAN-PABLO H. (1998a). **“Advances in Plant Growth-Promoting Bacterial Inoculant Technology: Formulations and Practical Perspectives.”**
- BASHAN, Y. (1998b). **“Inoculants of Plant Growth-Promoting Bacteria for Use in Agriculture.”** Biotechnology Advances 16 (4): 729–70. doi:10.1016/S0734-9750(98)00003-2.
- BASHAN, Y. (1986). **“Alginate Beads as Synthetic Inoculant Carriers for Slow Release of Bacteria That Affect Plant Growth.”** Applied and Environmental Microbiology 51 (5): 1089–98.
- BERBARA R.L.L., GARCÍA A.C. (2014) **Humic substances and plant defense metabolism.** In: Ahmad P, Wani MR (eds) Physiological mechanisms and adaptation strategies in plants under changing environment: volume 1. Springer Science+Business Media, New York, pp 297– 319.
- BERNINGER, T., MITTER B., and PREININGER C. (2016). **“The Smaller, the Better? The Size Effect of Alginate Beads Carrying Plant Growth-Promoting Bacteria for Seed Coating.”** Journal of Microencapsulation 33 (2): 127–36. doi:10.3109/02652048.2015.1134690.
- BHARDWAJ, D., ANSARI M., SAHOO R., and TUTEJA N. (2014). **“Biofertilizers Function as Key Player in Sustainable Agriculture by Improving Soil Fertility, Plant Tolerance and Crop Productivity.”** Microbial Cell Factories 13 (1): 66. doi:10.1186/1475-2859-13-66.
- BHATTACHARYYA, P. N., & JHA, D. K. (2012). **Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture.** World Journal of Microbiology and Biotechnology, 28(4), 1327-1350.
- BISWAS, B., & GRESSHOFF, P. M. (2014). **The role of symbiotic nitrogen fixation in sustainable production of biofuels.** International journal of molecular sciences, 15(5), 7380-7397.

BRASIL, F. I. (2013). **Os alginatos e suas múltiplas aplicações**. Revista Fib, (26), 34-38.

Brasil, Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento, **decreto nº 6710**.

Diário Oficial do Paraná (1990). Disponível em:

<http://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/13027>. Acesso em: 02. Jun.2017.

BUREY, P., B. R. BHANDARI, T. HOWES, and M. J. GIDLEY. (2008).

“Hydrocolloid Gel Particles: Formation, Characterization, and Application.”

Critical Reviews in Food Science and Nutrition 48 (5): 361–77.

doi:10.1080/10408390701347801.

CAMILIOS-NETO, D., BONATO P., WASSEM R., TADRA-SFEIR M.,

BRUSAMARELLO-SANTOS L., VALDAMERI G., DONATTI L. (2014). **“Dual RNA-**

Seq Transcriptional Analysis of Wheat Roots Colonized by Azospirillum

Brasilense Reveals up-Regulation of Nutrient Acquisition and Cell Cycle

Genes.” BMC Genomics 15 (1): 378. doi:10.1186/1471-2164-15-378.

Canadian Food Inspection Agency. Disponível em:

< <http://www.inspection.gc.ca/eng/1297964599443/1297965645317>>. Acesso em 26/11/2016.

CANELLAS L.P., OLIVARES F.L., OKOROKAOVA-FAÇANHA A.L., FAÇANHA A.R.

(2002) **Humic acids isolated from earthworm compost enhance root**

elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H⁺ -ATPase activity

in maize roots. Plant Physiol 130:1951–1957.

CASSIDY, M. B., H. LEE, and J. T. TREVORS. (1996). **“Environmental**

Applications of Immobilized Microbial Cells: A Review.” Journal of Industrial

Microbiology 16 (2): 79–101. doi:10.1007/BF01570068.

CHAMPAGNE C. P.; FUSTIER P. (2007). **Microencapsulation for the improved**

delivery of bioactive compounds into foods. Current Opinion in Biotechnology,

v.18, n.2, p.184-190, Available from: <[http://](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166907000328)

www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166907000328>. Accessed: Jul. 05,

2012. doi: 10.1016/j.copbio.2007.03.001.

CHEN, G.; WANG, W. (2007). **Role of freeze drying in nanotechnology.** Drying

Technology, v.25, n.1, p.29-35. Available from:

<<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07373930601161179>>. Accessed:

Jun. 19, 2012. doi: 10.1080/07373930601161179.

CHUANG, J. J., HUANG Y., SZU HSUAN L., HSU S., HUANG W. Y., HUANG S. L., and LIN Y. S. (2017). **“Effects of pH on the Shape of Alginate Particles and Its Release Behavior.”** International Journal of Polymer Science 2017.

doi:10.1155/2017/3902704.

COOK, M.; TZORTZIS, G.; DIMITRIS, C.; KHUTORVANSKIY, V.V. (2012).

Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. Journal of Controlled Release, V. 162, P. 56-67.

CREUS, C. M.; GRAZIANO, M.; CASANOVAS, E. M.; PEREYRA, M. A.;

SIMONTACCHI, M.; PUNTARULO, S.; BARASSI, C. A.; LAMATTINA, L. (2004).

Nitric oxide is involved in the Azospirillum brasilense-induced lateral root formation in tomato. Plants, v. 221,p. 297–303.

CRUZ, C. D. (2006). **Programa Genes: estatística experimental e matrizes.** UFV.

DATE, R. A. (2001) **Advances in inoculant technology: a brief review.** Anim Prod Sci 41:321–325.

DEAKER, R., KECSKÉS M. L., ROSE M. T., AMPRAYN K., GANISAN K., TRAN

T.K.C., VU T.N., PHAN T.C., HIEN N.T., KENNEDY I.R. (2011) **Practical methods**

for the quality control of inoculant biofertilisers. ACIAR Monograph Series No.147, Canberra, p101.

DOMMERGUES, Y. R., DIEM, H. G., & DIVIES, C. (1979). **Polyacrylamide-entrapped Rhizobium as an inoculant for legumes.** Applied and Environmental Microbiology, 37(4), 779-781.

ELBEIN, A.D. (1974) **The metabolism of a,a-trehalose.** Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 30, 227±256.

ELBEIN, A. D., Y. T. PAN, IRENA PASTUSZAK, and DAVID CARROLL. (2003).

“New Insights on Trehalose: A Multifunctional Molecule.” Glycobiology 13 (4): 17–27. doi:10.1093/glycob/cwg047.

FERREIRA, D. F. (2008). **SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística.** In Revista symposium (Vol. 6, No. 2, pp. 36-41).

GARCIA-FRAILE, P., MENNDEZ E., and RIVAS R. (2015). **“Role of Bacterial Biofertilizers in Agriculture and Forestry.”** AIMS Bioengineering 2 (3): 183–205. doi:10.3934/bioeng.2015.3.183.

GLICK, B. R. (2012). **Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications.** Scientifica, 2012.

- GLICK, B. R. (2005) **Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase.** FEMS Microbiol Lett 252:1–7.
- GLICK, B.R. (1995). **The enhancement of plant growth by free-living bacteria.** Can. J. Microbiol. 41: 109117.
- GUO, L, WU Z, RASOOL A, LI C. (2012). **Effects of free and encapsulated co-culture bacteria on cotton growth and soil bacterial communities.** Eur J Soil Biol. 53:16–22.
- HARTMANN, A., & BASHAN, Y. (2009). **Ecology and application of Azospirillum and other plant growth-promoting bacteria (PGPB)**—Special Issue.
- HAY, I.D., REHMAN, Z.U., GHAFOR, A. AND REHM, B.H.A. (2010). **Bacterial biosynthesis of alginates.** J. Chem. Technol. Biotechnol., 85: 752–759.
- HICKERT, L. R., CRUZ, M. M., DILLON, A. J. P., FONTANA, R. C., ROSA, C. A., & AYUB, M. A. Z. (2014). **Fermentation kinetics of acid–enzymatic soybean hull hydrolysate in immobilized-cell bioreactors of Saccharomyces cerevisiae, Candida shehatae, Spathaspora arborariae, and their co-cultivations.** Biochemical Engineering Journal, 88, 61-67.
- HUBER, G., SPINLER, C., GAMBACORTA, A., & STETTER, K. O. (1989). **Metallosphaera sedula gen, and sp. nov. represents a new genus of aerobic, metal-mobilizing, thermoacidophilic archaeobacteria.** Systematic and Applied Microbiology, 12(1), 38-47.
- ILYAS, N., and BANO A. (2010). **“Azospirillum Strains Isolated from Roots and Rhizosphere Soil of Wheat (Triticum Aestivum L.) Grown under Different Soil Moisture Conditions.”** Biology and Fertility of Soils 46 (4): 393–406.
doi:10.1007/s00374-009-0438-z.
- ISWARAN, V., SEN, A., & APTE, R. (1972). **Plant compost as a substitute for peat for legume inoculants.** Cur Sci.
- JOHN, R. P., TYAGI, R.D., BRAR, S.K., SURAMPALLI, R.Y., and PRÉVOST D. (2011). **“Bio-Encapsulation of Microbial Cells for Targeted Agricultural Delivery.”** Critical Reviews in Biotechnology 31 (3): 211–26.
doi:10.3109/07388551.2010.513327.
- KALJEET, S., KEYEO, F., and AMIR, H. G. (2011). **“Influence of Carrier Materials and Storage Temperature on Survivability of Rhizobial Inoculant.”** Asian Journal of Plant Sciences. doi:10.3923/ajps.2011.331.337.

- KENNEDY, I. R., PEREG-GERK L. L., WOOD, C., DEAKER R., GILCHRIST K., and KATUPITIYA S. (1997). **“Biological Nitrogen Fixation in Non-Leguminous Field Crops: Facilitating the Evolution of an Effective Association between Azospirillum and Wheat.”** Plant and Soil 194 (1): 65–79.
doi:10.1023/A:1004260222528.
- KIM I.Y., PUSEY P.L., ZHAO Y., KORBAN S.S., CHOI H., KIM K.K. (2012) **Controlled release of Pantoea agglomerans E325 for biocontrol of fire blight disease of apple.** J Control Release 161:09–15.
- KIM KI, BAEK YJ, YOON YH (1996) **Effects of rehydration media and immobilisation in calcium-alginate on the survival of Lactobacillus casei and Bifidobacterium bifidum.** Korean J Dairy Sci 18:193–198.
- KREMER, R. J., & PETERSON, H. L. (1982). **Nodulation efficiency of legume inoculation as determined by intrinsic antibiotic resistance.** Applied and environmental microbiology, 43(3), 636-642.
- LAOHASONGKRAM, K. et al. (2011). **Microencapsulation of Macadamia oil by spray drying.** Procedia Food Science, v.1, p.1660-1665. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211601X1100246X>>. Accessed: May 17, 2013. doi: 10.1016/j.profoo.2011.09.245.
- LEMANCEAU, P., BAKKER, P. A., DE KOGEL, W. J., ALABOUVETTE, C., & SCHIPPERS, B. (1992). **Effect of pseudobactin 358 production by Pseudomonas putida WCS358 on suppression of fusarium wilt of carnations by nonpathogenic Fusarium oxysporum Fo47.** Applied and Environmental Microbiology, 58(9), 2978-2982.
- LESLIE, S.B., ISRAELI, E., LIGHTHART, B., CROWE, J.H., CROWE, L.M., (1995). **Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying.** Applied and Environmental Microbiology 61 (10), 3592–3597.
- LUGTENBERG, B. J. J., KAMILOVA F. (2009) **Plant-growth-promoting rhizobacteria.** Annu Rev Microbiol 63:541–556.
- MALUSÁ, E. & VASSILEV, N. (2014). **A contribution to set a legal framework for biofertilisers.** Applied microbiology and biotechnology, 98(15), 6599-6607.
- MANIKANDAN, R., SARAVANAKUMAR D., RAJENDRAN L., RAGUCHANDER T., SAMIYAPPAN R. (2010) **Standardization of liquid formulation of Pseudomonas fluorescens Pf1 for its efficacy against Fusarium wilt of tomato.** Biol Control 54:83–89.

- MAPELLI, F., MARASCO, R., BALLOI, A., ROLLI, E., CAPPITELLI, F., DAFFONCHIO, D., & BORIN, S. (2012). **Mineral–microbe interactions: biotechnological potential of bioweathering.** *Journal of biotechnology*, 157(4), 473–481.
- MOUTIA, J. F. Y.; UMRIT, G.; SAUMTALLY, A. S. et al. (2003) **The role of diazotrophic bacteria in the nitrogen nutrition of sugar cane in mauritius: Preliminary results.**
- NARDI, S., CARLETTI P., PIZZEGHELLO D., MUSCOLO A. (2009) Biological activities of humic substances. In: Senesi N, Xing B, Huang PM (eds) **Biophysico-chemical processes involving natural nonliving organic matter in environmental systems.** Wiley, Hoboken, pp 305–339.
- NEHRA, V., and CHOUDHARY M. (2015). **“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* 7 (1): 540–56.
- NOBBE, F. and HILTNER, L. (1896). U.S. Patent 570 813. **Inoculation of the soil for cultivating leguminous plants.**
- NUNEZ, C., LEON R., GUZMAN J., ESPIN G., SOBERON-CHAVEZ G. (2000) **Role of Azotobacter vinelandii mucA and mucC gene products in alginate production.** *J Bacteriol* 182:6550–6556.
- O’CALLAGHAN, M. (2016). **“Microbial Inoculation of Seed for Improved Crop Performance: Issues and Opportunities.”** *Applied Microbiology and Biotechnology* 100 (13): 5729–46. doi:10.1007/s00253-016-7590-9.
- OGBONNA, J.C., MATSUMURA M., KATAOKA H. (1991). **Effective oxygenation of immobilized cells through reduction in bead diameters: a review.** *Process Bio-chemistry* 26(2): 109-121. DOI: 10.1016/0032-9592(91)80025-K.
- OLSEN, G. J., MATSUDA, H., HAGSTROM, R., & OVERBEEK, R. (1994). **fastDNAmI: a tool for construction of phylogenetic trees of DNA sequences using maximum likelihood.** *Bioinformatics*, 10(1), 41–48.
- OWEN D, WILLIAMS AP, GRIFFITH GW, WITHERS PJA (2015) **Use of commercial bio-inoculants to increase agricultural production through improved phosphorus acquisition.** *Appl Soil Ecol* 86:41–54.
- PAAU, A.S., GRAHAM, L.L. and BENNETT, M. (1991). **Progress in formulation research for PGPR and biocontrol inoculants.** In *Plant Growth-Promoting*

- Rhizobacteria-Progress and Prospects**, C. Keel, B. Koller, and G. DCFago (eds.), pp. 399-403, IOBC/WPRS Bulletin, Zurich, Switzerland. Packowski.
- PARK M, KIM C, YANG J, LEE H, SHIN W, KIM S et al (2005) **Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea**. *Microbiol Res* 160:127–133
- PEDRAZA RO (2008) Recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bacteria. *Int J Food Microbiol* 125:25–35.
- PEDRAZA, R. O. (2008) **Recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bacteria**. *Int J Food Microbiol* 125:25–35.
- PEREIRA, J. E.S., GUEDES R. DA S, COSTA F. H. DA S, and SCHMITZ G. C. B. (2008). **“Composição Da Matriz de Encapsulamento Na Formação E Conversão de Sementes Sintéticas de Pimenta-Longa.”** *Horticultura Brasileira* 26 (1): 93–96. doi:10.1590/S0102-05362008000100018.
- PICCOLO, A., CONTE P., SPACCINI R., CHIARELLA M. (2003) **Effects of some dicarboxylic acids on the association of dissolved hu- mic substances**. *Biol Fertil Soils* 37:255–259.
- PINTON, R., VARANINI, Z., & NANNIPIERI, P. (2001). **The rhizosphere as a site of biochemical interactions among soil components, plants, and microorganisms**.
- REETHA. D., KUMARESAN. G. and JOHN MILTON. D. (2014). **“Studies to improve the shelf life of azospirillum lipoferum immobilized in alginate beads.”** *International Journal of Recent Scientific Research*. doi:10.24327/IJRSR.
- REKHA P.D., LAIWA, A. A. B., YOUNG C. C. (2007). **Effect of free and encapsulated Pseudomonas putida CC-FR2-4 and Bacillus subtilis CC-pg104 on plant growth under gnotobiotic conditions**. *Bioresour Technol* 98:447–451.
- RIVERA-CRUZ, M. C., TRUJILLO-NARCÍA A., CÓRDOVA-BALLONA G., KOHLER J., CARAVACA F., ROLDÁN A. (2008). **Poultry manure and banana waste are effective biofertilizer carriers for promoting plant growth and soil sustainability in banana crops**. *Soil Biol Biochem* 40:3092–3095.
- ROMEIRO, R. D. S. (2001). *Métodos em bacteriologia de plantas*. Viçosa: UFV, 279.
- SCHIAVON, M., PIZZEGHELLO, D., MUSCOLO, A., VACCARO, S., FRANCIOSO, O., & NARDI, S. (2010). High molecular size humic substances enhance phenylpropanoid metabolism in maize (*Zea mays* L.). *Journal of chemical ecology*, 36(6), 662-669.

- SCHOEBITZ, M., LÓPEZ M. D., and ROLDÁN A. (2013). **“Bioencapsulation of Microbial Inoculants for Better Soil-Plant Fertilization. A Review.”** *Agronomy for Sustainable Development* 33 (4): 751–65. doi:10.1007/s13593-013-0142-0.
- SCHOEBITZ, M., RIBAUDO C., PARDO M., CANTORE M., CIAMPI L., CURA J. A. (2009) **Plant growth promoting properties of a strain of *Enterobacter ludwigii* isolated from *Lolium perenne* rhizosphere.** *Soil Biol Biochem* 41:1768–1774.
- SHAH-SMITH, D. A., & BURNS, R. G. (1997). **Shelf-life of a biocontrol *Pseudomonas putida* applied to sugar beet seeds using commercial coatings.** *Biocontrol Science and Technology*, 7(1), 65 -74.
- SHIME-HATTORI, A., KOBAYASHI, S., IKEDA, S., ASANO, R., SHIME, H., & SHINANO, T. (2011). **A rapid and simple PCR method for identifying isolates of the genus *Azospirillum* within populations of rhizosphere bacteria.** *Journal of applied microbiology*, 111(4), 915-924.
- SILVA, P. T., FRIES, L. L. M., MENEZES, C. R., HOLKEM, A. T., SCHWAN, C. L., WIGMANN, É. F., BASTOS, J. DE O. and SILVA C. DE B. (2014). **“Microencapsulation: Concepts, Mechanisms, Methods and Some Applications in Food Technology.”** *Ciência Rural* 44 (7): 1304–11. doi:10.1590/0103-8478cr20130971.
- SIMPSON N. E., GRANT S. C., BLACKBAND S. J., CONSTANTINIDIS I. (2003). **NMR properties of alginate microbeads.** *Biomaterials* 24:4941–4948.
- SINGH, A. and SHARMA, P.B. (1973). **Growth and survival of rhizobia in commercial bacterial inoculants.** *J. Res. (Punjab)* 10: 95-98. Smidsrod.
- SINGLETON, P., KEYSER H., SANDE E. (2002). **Development and evaluation of liquid inoculants. In: Inoculants and nitrogen fixation of legumes in Vietnam.** Herridge D ed. ACIAR Proceedings 109e Hanoi Vietnam. 52–66.
- SIVAKUMAR, P. K., PARTHASARTHI R., and LAKSHMIPRIYA V. P. (2014). **“Encapsulation of Plant Growth Promoting Inoculant in Bacterial Alginate Beads Enriched with Humic Acid.”** *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* 3 (6): 415–22.
- SMITH, R. S. (1997) **New inoculant technology to meet changing legume management.** In: Elmerich AKC, Newton WE (eds) *Biological nitrogen fixation for the 21st century.* Kluwer, Dordrecht, p 621– 622.
- SMITH, R. S. (1992). **Legume inoculant formulation and application.** *Can J Microbiol* 38:485–492.

SOARES, L. H. (2015). **“Tecnologias Referentes a Insumos Biológicos São Apresentadas Ao Setor Produtivo - Portal Embrapa.”**

<https://www.embrapa.br/web/mobile/noticias/-/noticia/6731554/tecnologias-referentes-a-insumos-biologicos-sao-apresentadas-ao-setor-produtivo>.

SOUGOUFARA, B., DIEM, H. G., & DOMMERGUES, Y. R. (1989). **Response of field-grown *Casuarina equisetifolia* to inoculation with *Frankia* strain ORS 021001 entrapped in alginate beads.** *Plant and Soil*, 118(1-2), 133-137.

SOUZA, R., AMBROSINI, A., and PASSAGLIA, L. M. P. (2015). **“Plant Growth-Promoting Bacteria as Inoculants in Agricultural Soils.”** *Genetics and Molecular Biology* 38 (4): 401–19. doi:10.1590/S1415-475738420150053.

STEVENSON, F. J. (1994). **Humus chemistry: genesis, composition, reactions.** Wiley, New York.

SUAVE, J., DALL’AGNOL, E. C., PEZZIN, A. P. T., SILVA, D. A. K., MEIER, M. M., & SOLDI, V. (2006). **Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas.** *Revista Saúde e Ambiente/Health and Environment Journal*, 7(2), 12-20.

SWARBRICK, J. **Encyclopedia of pharmaceutical technology.** 2.ed. New York: Informa Healthcare, 2004. 5536 p.

SZCZECH, M., and MACIOROWSKI R. (2016). **“Microencapsulation Technique with Organic Additives for Biocontrol Agents.”** *Journal of Horticultural Research* 24 (1): 111–22. doi:10.1515/johr-2016-0013.

TABASSAM, T., SULTAN T., EHSAN AKHTAR M., and ARSHAD A. (2015). **“Suitability of different formulated carriers for sustaining microbial shelf life *tosif tabassam**, Tariq Sultan**, M.Ehsan Akhtar**, M.Mahmood-UI- Hassan** and Arshad Ali***”** 28 (2): 143–51.

TARRAND, J.J.; KRIEG, N.R. & DÖBEREINER, J. (1978). **A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two specie, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov.** *Can. J. Microbiol.*, 24:967- 980.

TAURIAN T, ANZUAY MS, ANGELINI JG, TONELLI ML, LUDUEÑA L, PENA D, IBÁÑEZ F, FABRA A (2010) **Phosphate-solubilizing peanut associated bacteria: screening for plant growth- promoting activities.** *Plant Soil* 329:421–431.

TIMMUSK, S., EL-DAIM, I. A. A., COPOLOVICI, L., TANILAS, T., KÄNNASTE, A., BEHERS, L., & NIINEMETS, Ü. (2014). **Drought-tolerance of wheat improved by**

- rhizosphere bacteria from harsh environments: enhanced biomass production and reduced emissions of stress volatiles.** PloS one, 9(5), e96086.
- TREVORS, J.T., VAN ELSAS J.D., LEE H., VAN OVERBEEK L.S. (1992). **Use of alginate and other carriers for encapsulation of microbial cells for use in soil.** Microbial Releases 1: 61-69.
- VAN ELSAS, J. D., and C. E. HEIJEN. (1990). **Methods for introduction of bacteria into soil: a review.** Biol. Fertil. Soils 10:127–133.
- VAN VEEN, J.A., OVERBEEK, L.S., VAN ELSAS, J.D. (1997) **Fate and activity of microorganisms introduced into soil.** Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61, 121–135.
- VARANINI, Z., PINTON, R. (2001) **Direct versus indirect effects of soil humic substances on plant growth and nutrition.** In: Pinton R, Varanini Z, Nannipieri P (eds) The rhizosphere. Marcel Dekker, Basel, pp 141–158.
- VASSILEV, N., VASSILEVA, M., LOPEZ, A., MARTOS, V., REYES, A., MAKSIMOVIC, I., EICHLER-LIIBERMANN, B. and MALUS, E. (2015). **“Unexploited Potential of Some Biotechnological Techniques for Biofertilizer Production and Formulation.”** Applied Microbiology and Biotechnology 99 (12): 4983–96. doi:10.1007/s00253-015-6656-4.
- VASSILEV, N., VASSILEVA, M., AZCON, R., & MEDINA, A. (2001). **Preparation of gel-entrapped mycorrhizal inoculum in the presence or absence of *Yarrowia lipolytica*.** Biotechnology Letters, 23(11), 907-909.
- VEJAN, P., ABDULLAH, R., KHADIRAN, T., SALMAH I. AND BOYCE A. N. (2016). **“Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Agricultural Sustainability-A Review.”** Molecules 21 (5): 1–17. doi:10.3390/molecules21050573.
- VIVI, G., UDDIN, W., ROMAINE, C. P. (2003) **Suppression of gray leaf spot (blast) of perennial ryegrass turf by *Pseudomonas aeruginosa* from spent mushroom substrate.** Biol Control 26:233–243
- YANG, J.; KLOEPPER, J. W.; RYU, C. M. (2009). **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. (2006) **Encapsulation of plant growth-promoting bacteria in alginate beads enriched with humic acid.** Biotechnol Bioeng 95:76–83.
- ZANETTI, B.G. **Desenvolvimento de microesferas de carbamazepina visando ao prolongamento da liberação do fármaco.** 2001. 100f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.