

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**DISSERTAÇÃO**

**VEÍCULO DE INOCULAÇÃO À BASE DE EXOPOLISSACARÍDEOS EM  
FORMULAÇÕES BACTERIANAS PARA CANA-DE-AÇÚCAR**

**NAINICELLE CIBELLE SOUSA CHANTRE**

**2018**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**VEÍCULO DE INOCULAÇÃO À BASE DE EXOPOLISSACARÍDEOS EM  
FORMULAÇÕES BACTERIANAS PARA CANA-DE-AÇÚCAR**

**NAINICELLE CIBELLE SOUSA CHANTRE**

*Sob a Orientação do Professor Dr.*

**Paulo Jansen de Oliveira**

*e Co-orientação da Dra.*

**Norma Gouvêa Rumjanek**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química, Área de concentração em Tecnologia Química.

Seropédica, RJ  
Fevereiro 2018

**Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**  
**Biblioteca Central/ seção de Processamento Técnico**

**Ficha catalográfica elaborada**  
**Com dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

C459v Chantre, Nainicelle Cibelle Sousa 1993-  
Veículo de inoculação à base de exopolissacarídeos em  
formulações bacterianas para cana-de-açúcar /  
Nainicelle Cibelle Sousa Chantre. - 2018.  
56 f.: il.

Orientador: Paulo Jansen de Oliveira.  
Coorientadora: Norma Gouvêa Rumnjanek.  
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em  
Engenharia Química, 2018.

1. mistura polimérica. 2. caracterização de EPS. 3.  
inoculante polimérico. 4. viabilidade celular. 5.  
propriedades reológicas. I. de Oliveira, Paulo Jansen,  
1965-, orient. II. Rumnjanek, Norma Gouvêa, 1954-  
coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de  
Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química.  
IV. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**NAINICELLE CIBELLE SOUSA CHANTRE**

Dissertação/Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Engenharia Química**, no Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, área de Concentração em Tecnologia Química.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 27/02/2018

---

Prof. Dr. Paulo Jansen de Oliveira (Departamento de Engenharia Química/IT/UFRRJ) (Orientador)

---

Dra. Norma Gouvea Rumjanek (Embrapa-Agrobiologia) (Co-orientadora)

---

Dr. Gustavo Ribeiro Xavier (Embrapa- Agrobiologia)

---

Prof. Dra. Anelise Dias (Departamento de Fitotecnia/ UFRRJ)

*Dedico esta dissertação à minha família e em especial ao meu namorado Isac, por me incentivarem e me motivarem em todos os aspectos da minha vida em especial nesta jornada.*

## AGRADECIMENTOS

Com o término da realização deste trabalho gostaria de reconhecer e agradecer a todos que direto e indiretamente contribuíram para a realização do mesmo.

À Deus primeiramente pela oportunidade de vida, pela saúde, sabedoria, pela fé e por nunca me ter abandonado em situações em que muitas vezes ponderei desistir.

Com muito orgulho agradeço aos meus pais, Helena Delgado Sousa e José António Chantre da Cruz, pelo amor, dedicação, confiança e ensinamentos que me tornaram na pessoa que sou hoje.

Ao meu namorado Isac Xamir Lopes de Carvalho pela paciência, companheirismo e carinho.

Às minhas irmãs Cinthia Helena Sousa Lourenço e Mayara Jany Sousa Lourenço, e ao meu padrasto, José Manuel Delgado Lourenço que sempre me dirigiram palavras de incentivo e de coragem nas horas difíceis.

À toda a minha família, que sempre me apoiaram e acreditaram em mim e nas minhas capacidades, que com sábias palavras confiaram que conseguiria transpor mais esta etapa da minha vida.

Ao professor Paulo Jansen de Oliveira, e à Doutora Norma Rumjanek um sincero obrigada pela orientação e co-orientação, pela permanente disponibilidade, paciência enriquecimento pessoal e profissional.

À toda equipa técnica da Embrapa-Agrobiologia que ajudou na realização deste trabalho, em especial ao meu amigo Claudinho, que sempre me salvou diversas vezes bem como ao “pessoal” do laboratório de ecologia microbiana (LEMI), principalmente às companheiras de luta Jéssica Rocha, Jaqueline Roland e Natália Santos.

Aos amigos do mestrado, Roberta, Carol, Felipe, Mónica, Maurício, Vanessa, Paula, Amanda, Aline desde aquela “caroninha” ao virar a noite estudando, cada um de um modo próprio e especial contribuiu para a realização deste trabalho. Obrigada a todos pela amizade!

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela oportunidade.

## **BIOGRAFIA**

Nainicelle Cibelle Sousa Chantre, filha de Helena Delgado Sousa e José António Chantre da Cruz, nasceu em Mindelo, São Vicente, Cabo Verde em 26 de setembro de 1993, onde concluiu o ensino médio em 2011. No mesmo ano se mudou para a capital do país, Praia onde se ingressou na Universidade de Cabo Verde, UNICV, no curso de Engenharia Química e Biológica. Durante a graduação participou do programa de Iniciação Científica, programa de colaboração entre a UNICV e a CAPES (Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de ensino superior), no Laboratório de Polímeros da Universidade Luterana do Brasil, Canoas. Concluiu a graduação em julho de 2015 e em fevereiro de 2016 ingressou no Curso de pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, UFRRJ, desenvolvendo seu projeto junto ao laboratório de Ecologia Microbiana na Embrapa Agrobiologia.

Parte deste trabalho foi apresentada nas seguintes reuniões científicas:

VII Encontro da Escola de Química Verde, Rio de Janeiro, RJ. “Produção e Caracterização Química de Exopolissacarídeo (EPS) produzido por *Bradyrhizobium yuanmingense* (BR 3267)” CHANTRE, N. C. S.; FAVERO, V.O.; OLIVEIRA, P.J.; RUMJANEK, N.G.; XAVIER, G.R. 2017.

2º Simpósio Latino Americano de Ciência, Tecnologia e Inovação na Agropecuária (SLACTIA), Seropédica, RJ. “Produção de Exopolissacarídeo através do cultivo de *Bradyrhizobium yuanmingense* (BR 3267) em meios modificados e sua caracterização.” CHANTRE, N. C. S.; FAVERO, V.O.; OLIVEIRA, P.J.; RUMJANEK, N.G. 2017.

Semana Johanna Döbereiner, Seropédica, RJ. “Inoculante à base de CMC/Amido enriquecido com Exopolissacarídeo na manutenção de estirpes bacterianas de cana-de-açúcar.” CHANTRE, N. C. S., CARVALHO, J. F., DE OLIVEIRA, P.J., RUMJANEK, N.G. 2017.

## RESUMO

**CHANTRE**, Nainicelle Cibelle Sousa. Veículo de inoculação à base de exopolissacarídeo em formulações bacterianas para cana-de-açúcar. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química, Tecnologia Química). Instituto de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

Nos últimos anos, têm-se apostado em tecnologias de adubação biológica na substituição da adubação química para suprir a deficiência de nutrientes em solos de modo a aumentar a produtividade agrícola. Esta tecnologia é constituída maioritariamente por um veículo de inoculação, sendo que no Brasil tradicionalmente tem-se utilizado a turfa, no entanto, centros de pesquisas e indústrias têm-se focado na busca por novos materiais que possam substituí-la como veículo de inoculação por este se tratar de um recurso natural de composição química variada. Estudos recentes investigaram a misturas poliméricas CMC/Amido e CMC/exopolissacarídeo (EPS) como veículos de inoculação de estirpes rizobianos para o cultivo de feijão caupi. Os resultados mostraram que tais materiais apresentam potencial para ser utilizada como veículo de inoculação em substituição a Turfa. Nesse trabalho de dissertação, a mistura CMC/amido/EPS e CMC/EPS foram testadas como veículo de inoculação para cana-de-açúcar. A primeira parte desse trabalho consistiu em desenvolver uma metodologia para obtenção de EPS por síntese bacteriana a partir do cultivo da estirpe *Bradyrhizobium yuanmingense*. Nesse experimento foram testados os efeitos das fontes de carbono e de nitrogênios nas características químicas dos EPS produzido. O efeito de fonte de C e de N na produção de EPS mostraram que biossíntese é favorecida por um aumento da razão fonte de C: fonte de N, sendo que neste estudo o rácio ótimo foi de 10:1, resultando em diferentes teores de carboidratos e proteínas. Os resultados de sobrevivência celular mostraram que com o aumento do teor de EPS aumenta a sobrevivência das estirpes bacterianas para três das estirpes do cultivo de cana-de-açúcar, sendo que as demais conseguiram a maior sobrevivência nas misturas com 0,5% de teor de EPS. Os resultados dos testes reológicos indicaram que a viscosidade,  $G'$  e  $G''$  diminuem com o aumento do teor de EPS na mistura. Os resultados obtidos da brotação, tamanho de parte aérea, volume de raiz e massa seca da parte aérea e da raiz, mostraram que ocorreu uma resposta positiva das mudas de cana-de-açúcar quando submetidas ao tratamento com veículo polimérico igualando ou mesmo sendo superior à turfa.

**Palavras-chave:** mistura polimérica, caracterização de EPS, inoculante polimérico, viabilidade celular, propriedades reológicas.

## ABSTRACT

**CHANTRE**, Nainicelle Cibelle Sousa. Inoculation vehicle based on exopolysaccharides in bacterial formulations for sugarcane. Dissertation (Master degree in Chemical Engineering, Chemical Technology). Institute of Technology, Department of Chemical Engineering, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

In the last few years, biological fertilization technologies have been used in the substitution of chemical fertilization to supply nutrient deficiency in soils to increase agricultural productivity. This technology consists mostly in an inoculation vehicle, being that in Brazil peat has traditionally been used, however, research centers and industries have focused on the search for new materials that can replace it as an inoculation vehicle because it is a natural resource of varied chemical composition. Recent studies have investigated polymer mixtures CMC/starch and CMC/exopolysaccharide (EPS) as vehicles for inoculation of rhizobium strains for cowpea beans cultivation. The results showed that these materials have potential to be used as inoculation vehicle in replacement of peat. In this thesis, the CMC / starch / EPS and CMC / EPS mixtures were tested as inoculation vehicles for sugarcane. The first part of this work comprised in developing a methodology to obtain EPS by bacterial synthesis from the cultivation of the *Bradyrhizobium yuanmingense* strain. In this experiment, the effects of carbon and nitrogen sources on the chemical characteristics of produced EPS were tested. The effect of C and N source on the EPS production showed that biosynthesis is favored by an increase in the source of C: source of N, and in this study the optimal ratio was 10:1, resulting in different carbohydrate and protein contents. Cell survival results showed that with the increase of the EPS content the survival of bacterial strains increases for three of the strains of the sugarcane cultivations, while the others achieved the highest survival in the mixtures with 0,5% EPS content. The results of the rheological tests indicated that the viscosity, G' and G'' decrease with increasing EPS content in the mixture. The results obtained from budding, shoot size, root volume and dry mass of shoot and root, showed that a positive response of sugarcane seedlings occurred when submitted to treatment with polymeric vehicle equaling or even being superior to the peat.

**Keywords:** polymer mixture, EPS characterization, polymeric inoculant, cell viability, rheological properties.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estrutura da carboximetilcelulose (CHAPLIN, 2006).....	10
<b>Figura 2:</b> Estrutura da amilose (A) e da amilopectina (B) (RHOR, 2007).....	11
<b>Figura 3:</b> Aspecto visual de muco de EPS microbiano (BARRETO, 2012).....	11
<b>Figura 4:</b> Avaliação da manutenção das estirpes bacterianas nas duas formulações com 2 meses de armazenamento. ....	33
<b>Figura 5:</b> Avaliação da manutenção das estirpes bacterianas nas duas formulações com 4 meses de armazenamento. ....	34
<b>Figura 6:</b> Variação da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento para as misturas CMC/EPS e CMC/Amido/EPS. ....	35
<b>Figura 7:</b> Comportamento do modulo elástico ( $G'$ ) em função da frequência para as misturas CMC/EPS e CMC/Amido/EPS. ....	35
<b>Figura 8:</b> Comportamento do modulo viscoso ( $G''$ ) em função da frequência para as misturas CMC/EPS e CMC/Amido/EPS. ....	36
<b>Figura 9:</b> Comportamento do modulo elástico ( $G'$ ) e viscoso ( $G''$ ) em função da frequência para as misturas CMC puro (a), CMC/EPS 0,5% (b), 1% (c) e 2% (d) e CMC/Amido/EPS (e).....	37
<b>Figura 10:</b> Variação do pH em relação ao tempo das amostras de inoculantes à base de CMC/EPS e CMC/Amido/EPS para as 5 estirpes bacterianas: (a) estirpe BR 11335; (b) Estirpe BR 11504; (c) Estirpe 11145; (d) Estirpe BR 11366 e (e) Estirpe BR11281.....	38
<b>Figura 11:</b> (a) Corte dos mini-toletes; (b) Separação por diâmetro; (c) Separação por tratamento. ....	57
<b>Figura 12:</b> (a) Tratamento térmico; (b) Tratamento fúngico. ....	57
<b>Figura 13:</b> Montagem do experimento em tubetes.....	57

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Comercialização de inoculantes no Brasil no período de 2009 a 2014. ....	1
<b>Tabela 2:</b> Vantagens e limitações de veículos mais comuns. ....	5
Tabela 3: Trabalhos desenvolvidos à base de carboximetilcelulose (elaborado pela autora). ....	9
<b>Tabela 4:</b> Produção microbiana de exopolissacarídeos. ....	14
<b>Tabela 5:</b> Principais características físico-químicas e áreas de aplicação de Exopolissacarídeos microbianos. ....	18
<b>Tabela 6:</b> Concentrações de manitol e extrato de levedura no meio YM usadas para otimizar a produção de EPS pela estirpe BR 3267. ....	24
<b>Tabela 7:</b> Concentrações indicadas para confecção da curva de calibração. ....	25
<b>Tabela 8:</b> Confecção dos pontos da curva de calibração empregando o método de diluição seriada. ....	25
<b>Tabela 9:</b> Composição e teores de EPS nas misturas CMC/EPS. ....	26
<b>Tabela 10:</b> Composição de teor de EPS na mistura CMC/Amido/EPS. ....	26
<b>Tabela 11:</b> Quantificação de EPS produzido e e log de unidades formadoras de colônias (UFC) presentes em cada combinação de YM após 168 h de cultivo a 30 °C. ....	29
<b>Tabela 12:</b> Carboidratos e proteínas totais presentes nas amostras de exopolissacarídeos cultivadas em meio YM após 168 h de cultivo a 30 °C. ....	30
<b>Tabela 13:</b> Dados da viabilidade celular dos inoculantes durante armazenamento à temperatura de 20 °C por até quatro meses. ....	31
<b>Tabela 14:</b> Formulações de CMC/EPS selecionadas para experimento de casa de vegetação. ...	39
<b>Tabela 15:</b> Formulações de CMC/Amido/EPS selecionadas para experimento de casa de vegetação. ....	39
<b>Tabela 16:</b> Índice de velocidade de germinação (IVG) dos mini-toletes de cana-de-açúcar. ....	39
<b>Tabela 17:</b> Número de mini-toletes germinadas 14 dias após plantio. ....	40
<b>Tabela 18:</b> Diâmetro da parte aérea aos 27 e 40 DAP para mudas pré-brotadas (MPB) de cana-de-açúcar inoculadas com cinco estirpes de bactérias diazotróficas: BR 11145, BR 11281, BR 11335, BR 11366 e BR 11504; formuladas nos veículos CMC/Amido/EPS, CMC/EPS e turfa; e, controle com aplicação dos veículos citados; mini-toletes cultivados em condições de casa de vegetação em tubetes com substrato Carolina após tratamento com fungicida comercial (0,1 % por 3 minutos)*. ....	41

<b>Tabela 19:</b> Altura e matéria seca de parte aérea (MSPA) aos 40 DAP em mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar inoculadas com cinco estirpes de bactérias diazotróficas: BR 11145, BR 11281, BR 11335, BR 11366 e BR 11504; formuladas nos veículos CMC/Amido/EPS, CMC/EPS e turfa; e, controle com aplicação dos veículos citados; mini-toletes cultivados em condições de casa de vegetação em tubetes com substrato Carolina após tratamento com fungicida comercial (0,1 % por 3 minutos)* <sup>a</sup> .....	41
<b>Tabela 20:</b> Matéria seca de raiz (MSR) e volume de raiz aos 40 DAP em mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar inoculadas com cinco estirpes de bactérias diazotróficas: BR 11145, BR 11281, BR 11335, BR 11366 e BR 11504; formuladas nos veículos CMC/Amido/EPS, CMC/EPS e e turfa; e, controle com aplicação dos veículos citados; mini-toletes cultivados em condições de casa de vegetação em tubetes com substrato Carolina após tratamento com fungicida comercial (0,1 % por 3 minutos)* .....	42
<b>Tabela 21:</b> Matéria seca de raiz (MSR) e volume de raiz aos 40 DAP em mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar tratadas com veículos de inoculação CMC/Amido/EPS, CMC/EPS, turfa e controle (sem tratamento) e cultivadas em condições de casa de vegetação em tubetes com substrato Carolina com e sem tratamento dos mini-toletes com fungicida comercial (0,1 % por 3 minutos)*. ....	43
<b>Tabela 22:</b> Composição do meio de cultura YMA. ....	54
<b>Tabela 23:</b> Composição do meio de cultura YM. ....	54
<b>Tabela 24:</b> Composição da solução salina para diluição seriada. ....	54
<b>Tabela 25:</b> Informações quanto ao meio e tempo de cultivo das estirpes bacterianas de cana-de-açúcar. ....	55
<b>Tabela 26:</b> Especificações dos meios de cultura das estirpes de cana-de-açúcar. ....	55

## LISTA DE ABREVIACÕES

BPCVs	Bactérias promotoras de crescimento vegetal
FBN	Fixação biológica de nitrogênio
CMC	Carboximetilcelulose
EPS	Exopolissacarídeo
rpm	Rotações por minute
pH	Potencial Hidrogeniônico
G'	Módulo de Armazenagem
G''	Módulo de Perda
MPB	Mudas pré-brotadas
DAP	Dias após plantio
IVG	Índice de velocidade de germinação
MSPA	Matéria seca de parte aérea
MSR	Matéria seca de raiz

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>3</b>
2.1 Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal .....	3
2.2 Inoculantes (Ou Biofertilizantes) .....	5
2.3 Inoculantes Poliméricos.....	7
2.4 Carboximetilcelulose.....	9
2.5 Amido.....	10
2.6 Exopolissacarídeos .....	11
2.6.1 Biossíntese de exopolissacarídeo .....	12
2.6.2 Aplicações do EPS .....	17
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
3.1 Objetivos Específicos .....	20
<b>4 HIPÓTESES CIENTÍFICAS.....</b>	<b>21</b>
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>22</b>
5.1 Materiais e Equipamentos .....	22
5.1.1 Materiais/reagentes .....	22
5.1.2 Equipamentos.....	22
5.2 Procedimento Experimental .....	22
5.2.1 Obtenção do exopolissacarídeo.....	23
5.2.2 Variação da concentração de carbono e nitrogênio no meio de cultura.....	24
5.2.3 Determinação de unidades formadoras de colônia no meio YM após 7 dias à 28 °C.....	24
5.2.4 Quantificação de carboidratos totais .....	25
5.2.5 Quantificação de proteínas presentes .....	25
5.2.6 Produção de veículos de inoculação .....	26
5.2.1 Obtenção de massa celular das estirpes bacterianas eficientes para a cana-de-açúcar.....	26
5.2.2 Inoculação dos veículos .....	26
5.2.3 Ensaio de reologia .....	27
5.2.4 Viabilidade celular nos inoculantes poliméricos .....	27

5.2.5 Experimentos realizados em casa-de-vegetação .....	27
5.3 Análise Estatística .....	28
<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>29</b>
6.1 Influência de Fonte de Carbono e de Nitrogênio na Produção de Exopolissacarídeo e Crescimento Bacteriano.....	29
6.2 Determinação de Carboidratos e Proteínas.....	30
6.3 Análise de Viabilidade Celular das Estirpes Bacterianas de Cana-de-Açúcar na Mistura CMC/Amido/EPS e CMC/EPS. ....	31
6.4 Avaliação das Propriedades Reológicas dos Veículos de Inoculação.....	34
6.5 Análise de Variação de pH.....	37
6.6 Desempenho de Mini-Toletes Inoculados com Formulações Poliméricas Contendo Cinco Estirpes Pré-Selecionadas de Bactérias Diazotróficas Armazenadas Por 60 Dias à Temperatura Ambiente. 38	
6.6.1 Germinação dos mini-toletes de cana-de-açúcar inoculados com estirpes diazotróficas pré-selecionadas .....	39
6.6.2 Desempenho de mudas pré-brotadas inoculadas com cinco estirpes de bactérias diazotróficas cultivadas em tubetes por 40 dias mantidos em casa de vegetação .....	40
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>44</b>
<b>8 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>45</b>
<b>9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>46</b>
<b><u>10</u> ANEXOS .....</b>	<b>54</b>
<b><u>11</u> APÊNDICE .....</b>	<b>57</b>

# 1 INTRODUÇÃO

Estudos recentes têm mostrado a importância de microrganismos que atuam no processo metabólico das plantas conhecidos como promotores do crescimento vegetal na sustentabilidade do setor agrícola, apresentando-se como uma alternativa economicamente viável na substituição dos agroquímicos (RODRIGUES, 2014). Dentre estes, bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) vem recebendo atenção especial e, em termos de novas tecnologias representa uma das estratégias mais promissoras para a produção de alimentos saudáveis associada à redução do impacto ambiental (BERG et al, 2017; FINKEL et al, 2017).

No Brasil, a substituição de insumos químicos por insumos biológicos é significativa quando se considera a inoculação com bactérias que promovem a fixação biológica de nitrogênio (FBN). A maior disponibilidade de nitrogênio para as culturas resulta em incrementos nas suas produtividades, com reduzido impacto ambiental em termos de emissão de gases efeito de estufa e contaminação de águas superficiais e aquíferas. O mercado de inoculantes no país é crescente e, em 2014 foram comercializadas cerca de 37 milhões de dose (Tabela 1). A inoculação da soja brasileira com estirpes de rizóbio eficientes é um caso de sucesso que, gera uma economia de aproximadamente 720 milhões US\$ por ano (MELO & ZILLI, 2009; HUNGRIA et al, 2010). Outras culturas de leguminosas também são beneficiadas com a inoculação de sementes com bactérias promotoras da FBN, porém em menor escala, como o feijão comum e o feijão caupi. Nos últimos anos, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, MAPA, registrou estirpes diazotróficas para a inoculação do milho, trigo e arroz (HUNGRIA, 2011). Estudos em andamento com a cana-de-açúcar, cultura que ocupa a terceira posição em termos de produção no Brasil, visam ao desenvolvimento de um inoculante composto por cinco estirpes de bactérias diazotróficas.

**Tabela 1:** Comercialização de inoculantes no Brasil no período de 2009 a 2014.

<b>culturas</b>	<b>2009</b>	<b>2010</b>	<b>2011</b>	<b>2012</b>	<b>2013</b>	<b>2014</b>
	<b>Milhões de doses</b>					
soja	19,87	14,99	18,98	19,17	27,47	34,2
feijão	0,25	0,22	0,15	0,27	0,48	0,34
caupi				0,19	0,24	
Gramíneas*	0,45	0,81	1,04	2,54	2,19	2,23
outros	0,10	0,11	0,03	0,04	0,28	0,26
total	20,66	16,13	20,2	22,21	30,65	37,03

\*milho, trigo e arroz.

Fonte: ANPII (<http://www.anpii.org.br/>, 13/08/2017)

As formulações de bactérias que promovem a FBN necessitam de um veículo de inoculação. O principal veículo de inoculação, utilizado no Brasil é a turfa que além de possibilitar a manutenção de elevado número de células viáveis oferece proteção física contra as adversidades do solo (ZILLI et al, 2010). No entanto, a turfa apresenta limitações por se tratar de um produto geológico considerado um combustível fóssil, configurando um recurso natural não renovável. Acrescenta-se ainda que as turfeiras brasileiras não apresentam em geral qualidade satisfatória e, é comum a importação do produto. Os custos com transporte e preparo do veículo que necessitam de esterilização reduzem também a sua aplicação no campo. Esse quadro tem motivado a realização de estudos que visam à substituição da turfa por materiais alternativos.

Materiais biodegradáveis que reúnem propriedades propícias à manutenção de células viáveis de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) ao mesmo tempo que não contribuem para a poluição ambiental já foram testados como veículos de inoculação. Nesse grupo, enquadram os materiais de origem polimérica que apresentam como características maior tempo de armazenamento, condições de autoclavagem menos exigentes, facilidade de transporte e redução da eutrofização de solos e águas.

O laboratório de polímeros da UFRRJ desenvolve em conjunto com a equipe do laboratório de ecologia microbiana da Embrapa Agrobiologia um projeto visando a substituição da turfa por materiais poliméricos como veículo de inoculação. Este estudo iniciou com os trabalhos de Rohr (2007) que desenvolveu uma mistura polimérica composta por carboximetilcelulose (CMC) e amido e Fernandes Júnior e colaboradores em 2012, testaram a mistura como alternativa de veículo de inoculação para a estirpe bacteriana de *Bradyrhizobium yuanmingense*, BR 3267. O estudo mostrou que o veículo polimérico apresentava potencial para manter as células bacterianas viáveis durante um período de armazenamento de até seis meses a temperatura ambiente e que ao ser inoculada em sementes de feijão-caupi, a formulação garantia produtividade de grãos similar àquela obtida com o inoculante turfoso. Em 2007, Rhor além de comprovar os resultados de manutenção de células bacterianas, estudou a estabilidade química e estrutural dessa mistura na presença de agentes compatibilizantes, no caso, óxidos de zinco e magnésio. Coutinho em 2013 estudou as propriedades reológicas, a biocompatibilidade e a manutenção de células rizobianas em misturas amido e exopolissacarídeos (EPS) e CMC e amido compatibilizadas com óxido de zinco, correlacionando a microestrutura dos materiais com suas respostas reológicas. A utilização desses agentes de acoplamento visa alcançar a estabilidade dinâmica dessa mistura, entretanto, podem alterar o pH da mistura em função do tipo de amido. Assim, como alternativa ao amido Freitas em 2015 utilizou a biomassa de espirulina, uma microalga, condicionada ao CMC como veículo de inoculação, mostrando a capacidade dessa mistura em aumentar em 100 vezes o número de células viáveis de *Bradyrhizobium parchirizi* (BR3262) após 30 dias de armazenamento a temperatura ambiente. Ainda visando a substituição do amido Sousa em 2017 e Rocha em 2018, utilizaram EPS obtidos da estirpe de rizóbio, BR 3267, e um produto extraído da alga *Lithothamnium calcareum*, respectivamente. A mistura CMC/EPS garantiu a manutenção de células viáveis de *B. yuanmingense* (BR 3267), não alterando o pH de forma significativa de modo a colocar em risco a sobrevivência da estirpe bacteriana e mostrando características reológicas compatíveis com a mesma. A mistura CMC/*Lithothamnium* foi usada na manutenção da estirpe BR 3262 de *B. parchirizi* preservando a viabilidade das células durante o período de armazenamento.

No trabalho em andamento desenvolvido por Carvalho, estão sendo testados diferentes tipos de amido quanto à manutenção celular, alteração de pH e estabilidade de fases, sendo a melhor formulação utilizada como inoculante para experimentos em casa-de-vegetação com mudas de cana-de-açúcar pré-brotadas (CARVALHO, em andamento) e com sementes de feijão-caupi em vasos preenchidos com substrato autoclavado e com solo (FAVERO, 2018).

O presente trabalho de pesquisa teve como proposta o desenvolvimento de veículos de inoculação à base de CMC/EPS (carboximetilcelulose/exopolissacarídeo) e CMC/Amido/EPS para produção de inoculantes a partir de cinco estirpes de bactérias diazotróficas capazes de manter a viabilidade das células bacterianas durante o período de armazenamento e ser compatível com a produção de mudas pré-brotadas a partir da inoculação de mini-toletes.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal

Existe um interesse crescente nas BPCVs, quando se trata do desenvolvimento de uma agricultura sustentável. A interação entre bactérias e plantas pode variar de acordo com as condições do solo, podendo ser benéfica, prejudicial ou neutra perante o cultivo. As bactérias benéficas podem ser simbióticas, que formam nódulos nas raízes das plantas, ou de vida livre, quando são encontradas próximas ou dentro das raízes (KONRAD, 2016).

Alguns gêneros bacterianos foram identificados por apresentarem características que contribuem para o crescimento das plantas, citando-se *Azorhizobium*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Ensifer*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Mesorhizobium*, *Nitrospirillum*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Paraburkholderia*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* e *Rhizobium*, entre outros que apresentam potencial para uso como inoculante em diversas espécies vegetais (BHATTACHARYYA & JHA, 2012; BASHAN et al, 2014; NEHRA & CHOUDHARY, 2015; HUNGRIA et al, 2010).

A promoção de crescimento vegetal por bactérias pode ocorrer através de um ou vários mecanismos que em conjunto ou de forma independente são ativados em condições ambientais específicas, como temperatura, umidade, salinidade, toxicidade e outras condições adversas minimizando o efeito sobre a espécie vegetal (BASHAN & BASHAN, 2014).

Além de efeitos que minimizam diferentes estresses sobre o desenvolvimento vegetal, um grupo de BPCVs destaca-se pela capacidade de realizar a FBN (AHEMAD & MALIK, 2011). A FBN é um processo bioquímico considerado como o segundo processo biológico mais importante do planeta após a fotossíntese. A FBN reduz o nitrogênio atmosférico em amônia, uma forma passível de ser assimilada pelas plantas. Células procarióticas que realizam a FBN possuem um complexo enzimático, a nitrogenase, e, quando em simbiose, como nos nódulos radiculares de leguminosas, em contrapartida à amônia que é fornecida às células vegetais, recebem desses nutrientes (fotossintatos e outros) para a manutenção do seu metabolismo (ARUN et al, 2017).

Na produção agrícola a FBN contribui em média com 30% do nitrogênio requerido no desenvolvimento de culturas (MELO, 2009). A aplicação de bactérias diazotróficas eficientes que sejam capazes de aumentar a contribuição da FBN para as culturas é, portanto, uma tecnologia que leva a resultados positivos na produtividade agrícola e na renda do agricultor, além de reduzir o impacto ambiental decorrente do uso intensivo de fertilizantes nitrogenados.

A cana-de-açúcar é amplamente cultivada em todo território brasileiro atingindo 9,7 milhões de hectares totalizando 661 milhões de toneladas produzidas (IBGE, 2012). O Brasil ocupa o primeiro lugar no ranking mundial de países produtores e é responsável por um terço da produção mundial. A cultura é capaz de armazenar sacarose em teores consideráveis que é utilizada principalmente em três setores da agroindústria: açúcar, álcool e aguardente (RODRIGUES, 2010). O cultivo da cana-de-açúcar no Brasil consome anualmente 570 mil toneladas de fertilizantes em forma de nitrogênio.

A partir da década de 1990, estudos mostraram que a cana-de-açúcar é capaz de se beneficiar do processo da FBN através da associação com bactérias diazotróficas endofíticas (BALDANI et al, 1996; REIS et al, 2004). Desde então, motivadas pela importância econômica que a cultura representa para o país, várias pesquisas foram realizadas visando à seleção de estirpes eficientes que apresentassem potencial para serem usadas como inoculante para a cultura.

Estirpes de bactérias diazotróficas encontradas em população elevadas em plantas do cultivo de cana-de-açúcar como *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11281), *Nitrospirillum amazonense* (BR 11145), *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11335), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BR 11504) e *Parabulkuholderia tropica* (BR 11366), possibilitam o entendimento da relação estabelecida entre plantas e bactérias (SCHULTZ et al, 2014; PEREIRA et al, 2013).

*G. diazotrophicus* é um microrganismo encontrado em raízes e colmos de plantas de cana-de-açúcar, que em meio de cultivo tolera altas concentrações de açúcar e altas taxas de acidez, podendo crescer até em pH 3 (BARBOSA, PERIN & REIS, 2006). Além de sua capacidade em fixar nitrogênio, principalmente em condições de baixos níveis de nitrogênio no solo, estas bactérias produzem hormônios de crescimento como auxina e giberelina, sendo verificados benefícios advindos da inoculação de estirpes eficientes de *G. diazotrophicus* em cultivos de cana-de-açúcar, como relatado por Muthukumarasamy e colaboradores (2006). A população dessa bactéria naturalmente presente em plantas de cana-de-açúcar, de acordo com Rodríguez-Andrade e colaboradores (2015), sofre uma diminuição quando aplicada adubação nitrogenada em solos para o seu cultivo. Em estudos desenvolvidos por Yadav e colaboradores (2009), verificou-se o aumento de carbono, nitrogênio e outros nutrientes essenciais no solo e rizosfera pelo aumento da população microbiana de *G. diazotrophicus* combinada com *Trichoderma viride*. Muñoz-Rojas e Caballero-Mellado (2003) em experimentos de cana-de-açúcar inoculada com a mesma espécie, obtiveram um aumento da produtividade do cultivo, em termos de matéria seca de raízes e de nitrogênio total acumulado após 35 e 75 dias de plantio. Em 2008, Prado Júnior encontrou resultados positivos inoculando duas variedades de cana-de-açúcar em condições de campo, com a estirpe BR 11281.

A estirpe BR 11145 de *N. amazonense* anteriormente conhecida como *Azospirillum amazonense* é encontrada em raízes e colmos de cana-de-açúcar (SILVA, 2009), capaz de fixar nitrogênio atmosférico em associação com diferentes espécies vegetais (LANGE & MOREIRA, 2002). Esta estirpe ainda possui a capacidade de produzir auxinas, compostos com ação hormonal para as plantas que induzem ao desenvolvimento radicular, promovendo maior disponibilidade de nutrientes e água o que resulta em maior crescimento, resistência, produtividade e tolerância a condições climáticas adversas (FERNANDES et al, 2014). *N. amazonense* destaca-se pela sua adaptabilidade em meios ácidos (REIS JUNIOR et al, 2008). Experimentos com dois cultivares de cana-de-açúcar inoculadas com esta estirpe, desenvolvidos por Schultz e colaboradores (2012), verificaram aumento no acúmulo de nitrogênio nas folhas e tecidos, levando os autores a supor a ocorrência de modificações no sistema radicular. Segundo RODRIGUES e colaboradores (2008) embora essa estirpe bacteriana seja muito estudada a contribuição dela para a FBN é limitada.

Já a estirpe bacteriana BR 11335 de *H. seropedicae* é encontrada em raízes, folhas e colmo da cana-de-açúcar (SILVA, 2009). A estirpe é capaz de colonizar espaços intercelulares de gramíneas, havendo relatos de colonização de plantas de arroz, sorgo, milho, cevada e cana-de-açúcar (PEDROSA et al, 2011). Olivares e colaboradores (2000) evidenciaram o potencial de promoção do crescimento promovido pela inoculação com estirpes de *G. diazotrophicus* e *H. seropedicae*, com incrementos na biomassa radicular entre 50 e 350 % em relação ao controle não inoculado, em cultivares de cana-de-açúcar.

A estirpe BR 11504 de *H. rubrisubalbicans* é também encontrada em raízes, caules e folhas de cana-de-açúcar, porém parece estar restrita a esta cultura (NOGUEIRA et al, 2001). Inicialmente esta espécie foi indicada como causadora de doenças em cultivos de cana-de-açúcar, mas após ter

sido reconhecida como eficiente quanto à capacidade de FBN, passou a fazer parte do inoculante múltiplo que está sendo proposto para o cultivo de cana-de-açúcar (SCHMIDT et al, 2012).

Isolados da estirpe diazotrófica de BR 11366 da espécie *T. tropica* foram obtidos de cultivos de cana-de-açúcar no Brasil e na África do Sul (SILVA, 2009). Essas bactérias podem também ser encontradas associadas a plantas de família de plantas leguminosas (Fabaceae ou Leguminosae), entretanto existem diferenças entre essas e as associadas às gramíneas (COSTA, 2014).

## 2.2 Inoculantes (Ou Biofertilizantes)

A Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes microbianos de Interesse Agrícola (RELARE), define inoculante como todo e qualquer produto que contenha na sua composição microrganismos capazes de estimular o crescimento de plantas e que promove a fixação biológica de nitrogênio (FERNANDES JUNIOR, 2006).

Os inoculantes de BPCV podem ser definidos como sendo formulações contendo uma ou mais estirpes de microrganismos benéficos, preparados em um material que serve de suporte que seja fácil de usar e econômico. Os veículos constituem a maior parte em volume do inoculante que ajuda a fornecer uma quantidade adequada de bactérias em boas condições fisiológicas. Além disso, o veículo deve permitir fácil dispersão ou dissolução no solo e sistema radicular, possuir boa capacidade de absorção de umidade, ser fácil de esterilizar e boa capacidade tampão de pH. É importante a padronização de características químicas e físicas de modo a favorecer a adequação para maior número possível de estirpes bacterianas para outros cultivos (MALUSA, SAS-PASZT & CIESIELSKA, 2012).

Existem alguns passos críticos que devem ser cuidadosamente considerados durante a produção de um inoculante. O inoculante ideal deve reunir uma série de características: i) ser de fácil manuseio; ii) compatível com o equipamento no momento de semeadura; iii) tolerância a variações não intencionais de condições de armazenamento; iv) habilidade de funcionar em diferentes condições edáfico-climáticas; v) habilidade de prolongar a sobrevivência da bactéria compatível com o desenvolvimento do material propagativo (BASHAN, DE-BASHAN, & PRABHU, 2016).

Além dessas características, no Brasil os inoculantes comerciais rizobianos devem ter prazo de validade de pelo menos seis meses e garantir um mínimo de  $10^9$  células por grama ou mililitro de inoculante segundo instrução normativa do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, MAPA, que utiliza os parâmetros determinados pelo protocolo da RELARE (FERNANDES JÚNIOR, 2006).

A formulação perfeita para inoculantes não existe, sendo que todas apresentam suas vantagens e seus próprios limites, como expresso na tabela 2 (HERMAN & LAUSSER, 2013).

**Tabela 2:** Vantagens e limitações de veículos mais comuns.

Formulações	Vantagens	Limites
Secas	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Adequadas para uma ampla gama de microrganismos</li> <li>– Ambiente nutritivo de proteção</li> <li>– O conteúdo de umidade pode ser ajustado para otimizar o crescimento e sobrevivência das bactérias durante o armazenamento e a inoculação</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Não está prontamente disponível</li> <li>– Impacto negativo forte no meio ambiente e os ecossistemas</li> <li>– Extração é um investimento caro</li> <li>– Compostos tóxicos são liberados durante a secagem e esterilização</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Forte capacidade tampão</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Altamente variável em composição e qualidade dependendo na origem</li> </ul>
Líquidas	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Fácil de manusear e aplicar</li> <li>– Fácil adição de aditivos para melhorar o crescimento ou sobrevivência das células</li> <li>– Composição facilmente definida e controlada</li> <li>– Alta concentração de células</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Baixa viabilidade durante o armazenamento e em sementes</li> <li>– Necessita temperaturas baixas para armazenamento (4 ° C)</li> <li>– Prazo de validade limitado</li> <li>– Mais sensível a condições estressantes</li> </ul>
Granulares	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Fácil de armazenar, lidar e aplicar</li> <li>– Taxa de aplicação facilmente avaliada</li> <li>– Aplicação no solo: nenhum contato direto com o outro produto químico compostos (sem toxicidade)</li> <li>– Especialmente eficiente sob condições ambientais estressantes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Custos elevados de transporte e armazenamento</li> <li>– Maiores taxas de aplicação</li> <li>– Frequente a utilização de veículos não estéreis</li> </ul>
Células encapsuladas	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Adequado para todos os tipos de células</li> <li>– Células protegidas em uma concha nutritiva contra mecânica e estresses ambientais e contra predadores</li> <li>– Liberação lenta e controlada dos microorganismos</li> <li>– Grande variedade de polímeros: não tóxico, biodegradável</li> <li>– Alta concentração de células Armazenamento à temperatura ambiente (cápsulas secas)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Alto custo de produção</li> <li>– Manipulação com maior complexidade a nível da indústria</li> <li>– Equipamentos específicos necessários</li> <li>– Alterações fisiológicas, morfológicas e metabólicas ocorrendo no “microambiente”</li> <li>– Nenhum produto comercial disponível</li> </ul>

Vários materiais orgânicos e/ou inorgânicos, naturais e/ou sintéticos vêm sendo usados como veículos de inoculação, tais como talco, vermiculita, poliacrilamida, carragenano, alginato, alginato de amido, entre outros, embora os mais utilizados em vários países sejam a turfa e as argilas (SCHOEBITZ, LÓPEZ & ROLDÁN, 2013).

A turfa é um produto orgânico com alta variabilidade que afeta a sua qualidade e a estabilidade e viabilidades das células bacterianas, além de ser um recurso natural não renovável sujeito à legislações que restringem a sua extração. Essas características limitam o desenvolvimento de formulações à base de material turfoso principalmente para uso em larga escala de forma mecanizada e, também para inoculação de material propagativo como toletes ou mini-toletes de cana-de-açúcar.

As argilas, por possuírem propriedades dessecantes, proporcionam características propícias ao armazenamento pela sua elevada área superficial. Os inoculantes à base de argila aumentam os níveis de sobrevivência de células em até 60 dias no solo, porém as argilas, semelhante à turfa, também apresentam grande variabilidade dependendo da sua origem (SCHOEBITZ, LÓPEZ & ROLDÁN, 2013).

Além desses materiais, bagaço de cana, casca de arroz, farelo de trigo, carvão vegetal, pó de carvão, fosfato de rocha, lignita, vermiculita, diatomita, perlita, minerais como apatita, composto urbano, palha de milho, amendoim e algodão, vinhaça seca e pó de coco já foram avaliados como prováveis veículos de inoculação (PANDEY & MAHESHWARI, 2007).

Os materiais de origem polimérica atendem a algumas das características descritas acima e podem resultar em bons veículos de inoculação.

### **2.3 Inoculantes Poliméricos**

Não é recente o interesse em substituir a turfa por materiais de origem polimérica, vários estudos já foram feitos e comprovaram que esses materiais oferecem vantagens preponderantes em relação à turfa, destacando-se uma vida útil muito maior, sobrevivência adequada em experimentos de campo, densidade celular suficiente e facilidade de fabricação (JOHN et al, 2011; SCHOEBITZ, LÓPEZ & ROLDÁN, 2013). Apesar dessas vantagens, até o momento, não existem produtos comerciais à base de polímeros, sendo desenvolvidas pesquisas à base de polímeros como alginato, agar, kappa carragenano, pectina, quitosana e goma de feijão para usos agrícolas e ambientais (KONRAD, 2016).

Polímeros apropriados para aplicações agrícolas tem que reunir uma série de requisitos: i) Não ser ambientalmente tóxico e não conter conservantes nocivos que afetem as células bacterianas do inoculantes e, posteriormente as plantas inoculadas; ii) Ser ligeiramente degradável por microrganismos do solo, liberando as bactérias em quantidades necessárias, geralmente no momento da germinação de sementes e emergência de mudas, reduzindo a possibilidade de poluição secundária; iii) Fornecer proteção física para as células bacterianas frente às condições do solo e estresses ambientais; iv) Manter umidade suficiente para sobrevivência das células bacterianas. (COVARRUBIAS et al, 2012).

As características apresentadas pelos polímeros preeminentes para compor uma formulação de inoculante capaz de manter de forma eficiente células bacterianas viáveis estão relacionadas ao fato de poderem ser “aparentemente” secos numa ampla faixa de temperatura por um longo período de tempo sem refrigeração, de oferecer uma qualidade de lote consistente para a produção, de poderem ser manipulados industrialmente para atender necessidades específicas de BPCV e possibilitar a adição de nutrientes para melhorar o seu desempenho na sobrevivência das células durante o armazenamento e a inoculação (BASHAN, DE-BASHAN, & PRABHU, 2016).

A presença da água em quantidade suficiente para garantir a sobrevivência bacteriana e capacidade de dispersão de forma a garantir a movimentação das células bacterianas do polímero para as plantas é considerado um fator importante (BASHAN et al, 2014).

Estudos recentes têm sido voltados à utilização de polímeros biodegradáveis como possíveis veículos de inoculação por serem ecologicamente seguros, degradáveis pela ação de microrganismos sem causar danos ao meio ambiente (BASHAN, DE-BASHAN, & PRABHU, 2016).

Os inoculantes poliméricos podem ter um tempo de armazenamento ainda maior em formulações secas. Experimentos de análise de tempo de vida útil em formulações poliméricas secas foram testados por (SCHOEBITZ, SIMONIN & PONCELET, 2012) durante um ano obtendo 76% de células viáveis em inoculante seco de alginato e amido, sendo que o tempo mais longo de armazenamento até agora para esferas de alginato seco foi de 14 anos em trabalho desenvolvido por Bashan & Gonzalez (1999). Várias técnicas para o encapsulamento de células microbianas utilizando polímeros foram desenvolvidas, no entanto, poucas foram testadas em condições de campo (SCHOEBITZ, LÓPEZ & ROLDÁN, 2013). O encapsulamento de biopolímeros como

alginate e goma xantana têm sido largamente estudadas pelo facto de liberarem os microrganismos nos solos após a degradação desses materiais, prevenindo deste modo as células do estresse ambiental, favorecendo a multiplicação e sobrevivência das mesmas após a sua aplicação (BASHAN et al, 2002). As vantagens de formulações de alginate advêm da sua natureza não tóxica, biodegradabilidade, disponibilidade a custos razoáveis e liberação de microrganismos de forma lenta no solo, que é controlada pela estrutura polimérica (BASHAN & DE-BASHAN, 2015).

Schuh (2005) estudou catorze combinações de misturas de biopolímeros em formulações líquidas e em gel envolvendo carboximetilcelulose sódica (CMC), polivinilpirrolidona (PVP), álcool polivinílico (PVA), goma xantana e galactomananas (goma jataí e goma guar) como veículos para inoculantes de soja das estirpes SEMIA 587 de *Bradyrhizobium elkani* e SEMIA 5079 de *Bradyrhizobium japonicum*. Verificou que as formulações tanto em géis como líquidas contendo goma xantana, jataí e guar garantiram a proteção das células em condições de dessecação e temperaturas elevadas. Todas as combinações avaliadas mantiveram a viabilidade celular num período de um ano.

Tittabutr e colaboradores (2007) avaliaram seis aditivos poliméricos diferentes, polivinilpirrolidona (PVP), polietileno glicol (PEG), álcool polivinílico (PVA), goma arábica, amido e alginate de sódio, na manutenção de células de Bradyrizóbio e rizóbio durante o armazenamento. As formulações líquidas contendo alginate de sódio foram as que melhores conseguiram manter a viabilidade das estirpes bacterianas testadas, ao longo de 6 meses de armazenamento, especialmente as estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* (actual *Bradyrhizobium yuanmingense*), de *Azorhizobium caulinodans* e de *Mesorhizobium ciceri* com concentrações celulares entre  $10^7$  a  $10^9$ .

Riviera e colaboradores (2014) estudaram a capacidade em manter a sobrevivência da estirpe de *Rhizobium sp* G 58 de oito polímeros durante dois meses de armazenamento. Este estudo mostrou que inoculantes poliméricos à base de alginate de sódio (0,5 a 1%) e hidroxipropil metilcelulose, HPMC (0,125 a 0,5%) conseguiram manter em elevados valores a viabilidade celular, enquanto que se verificou uma queda no número de células quando utilizadas polietileno glicol (PEG) de duas densidades, carboxipolimetileno e álcool polivinílico (PVA) como suporte bacteriano.

Cortes-Patino e Bonilla (2015) compararam o efeito protetor de cinco polímeros em inoculantes líquidos, sobre a viabilidade da estirpe *Azospirillum brasilense*: carragenano (1,5%), alginate de sódio (1%), trealose (10 mM), polivinilpirrolidona (2 %), glicerol (10 mM) e tampão fosfato salino como controlo. O carragenano e o alginate de sódio apresentaram diferenças significativas na viabilidade celular dos demais polímeros, sendo posteriormente avaliados a melhor concentração e temperatura de armazenamento para estes materiais. O alginate a 1% e à temperatura de 28 ° C prolongou a viabilidade celular por mais tempo e, o carragenano a 0,75% a uma temperatura de 45 ° C.

Leo Daniel e colaboradores (2013) avaliaram o efeito de aditivos poliméricos, adjuvantes e surfactantes na manutenção de viabilidade celular e a bio-eficácia em inoculantes líquidos. As formulações contendo 2% de polivinilpirrolidona (PVP), 0,1% de carboximetilcelulose (CMC de alta densidade) e 0,025% de polissobarto promoveram a sobrevivência de *Bacillus megaterium*, *Azospirillum* e *Azotobacter* com  $5,6.10^7$ ,  $1,9.10^8$  e  $3,5.10^7$  UFC/mL respectivamente, após 480 dias de armazenamento a 30 °C.

A Embrapa Agrobiologia, laboratório de ecologia microbiana, vem desenvolvendo ao longo dos anos, em colaboração com o laboratório de polímeros da UFRRJ, pesquisas voltadas à

otimização de formulações de inoculantes poliméricos à base de carboximetilcelulose (CMC) conjuntamente com coadjuvantes (tabela 3).

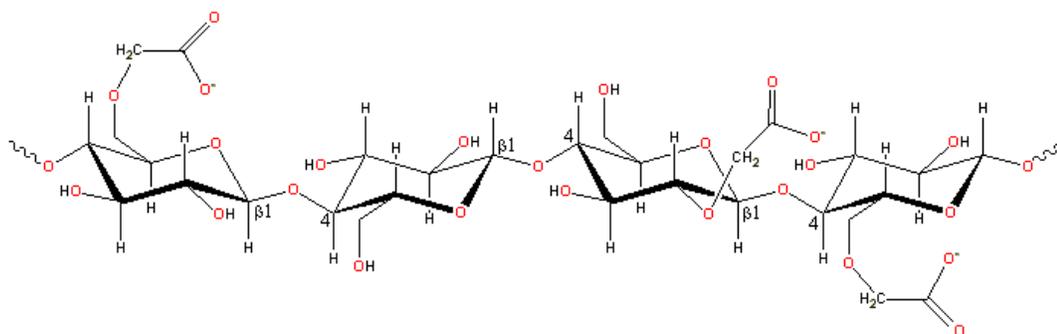
Tabela 3: Trabalhos desenvolvidos à base de carboximetilcelulose (elaborado pela autora).

<b>Autores</b>	<b>Veículos de inoculação</b>	<b>Estirpe microbiano</b>	<b>Cultivo</b>
Fernandes Junior, P. I., 2006	CMC e amido	<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i> (Br 3267)	Feijão Caupi
Rohr, T. G., 2007	CMC e amido	<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i> (Br 3267)	Feijão Caupi
Silva, M., 2009	CMC e amido	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> (Br 11281) <i>Azospirillum amazonense</i> (Br 11145) <i>Herbaspirillum seropedicae</i> (Br 11335) <i>H. rubrisubalbicans</i> (Br 11504) <i>Burkholderia tropica</i> (Br 11366)	Cana-de-Açúcar
Coutinho, 2013	CMC e amido Amido e exopolissacarídeos (EPS)	<i>Bradyrhizobium parchiryzi</i> (BR3262)	_____
Freitas, C.S., 2015	CMC e Spirulina	<i>Bradyrhizobium parchiryzi</i> (BR3262)	_____
Sousa, E. B., 2017	CMC e Exapolissacarídeo (EPS)	<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i> (Br 3267)	_____
Rocha, J. F., 2018	CMC e <i>Lithothamnium calcareum</i>	<i>Bradyrhizobium parchiryzi</i> (BR3262)	_____

No contexto dessas pesquisas foi obtido em 2007 o depósito de uma patente US 8592343 B2 do veículo à base de uma mistura polimérica CMC / amido ("Polymeric compositions containing rhizobium and / or plant growth-promoting rhizobacteria inoculant, use thereof and seeds treated with the compositions") e duas novas solicitações de depósito foram realizadas em 2015 e 2017 relativas, respectivamente, aos veículos de inoculação CMC / espirulina (BR 10 2015 025497 0) e CMC / exopolissacarídeo (BR 10 2017 020884 2).

## 2.4 Carboximetilcelulose

A carboximetilcelulose (CMC) é um polímero derivado de celulose, obtida por meio reativo em duas etapas. A primeira etapa é a reação entre celulose e soda cáustica formando o alcali de celulose que, numa segunda fase reage com o ácido monocloroacético (AMORIM, 2012). Normalmente é comercializada como carboximetilcelulose de sódio (DA CRUZ, 2011).



**Figura 1:** Estrutura da carboximetilcelulose (CHAPLIN, 2006).

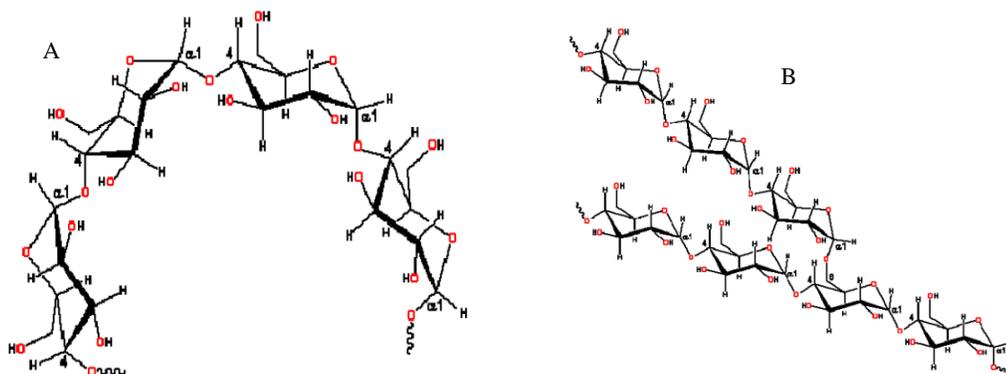
As propriedades físico-químicas da carboximetilcelulose comercializada difere entre os lotes sendo que, dependem do grau de polimerização, da uniformidade de tamanho e da pureza conseguida para o produto final (AMORIM, 2012). Por isso, o comportamento reológico registrado por soluções contendo CMC é influenciado pelo tipo de CMC, temperatura e concentração. Em baixas concentrações a conformidade das cadeias de CMC se modificam devido à repulsão electrostática ao longo da cadeia, ganhando uma conformação estendida diminuindo a viscosidade do meio em que está inserido, enquanto que, em concentrações elevadas, as moléculas se enovelam devido à repulsão entre as moléculas presentes, conduzindo à formação de um gel (FREITAS, 2015).

A CMC devido a suas propriedades como, boa solubilidade em água fria e quente, capacidade de modificar a viscosidade de solução, habilidade para formar filmes, boa adesividade, estabilidade em suspensão, retenção da água, resistência a óleos, gorduras e solventes orgânicos, lhe conferem uma ampla aplicação tecnológica em variados setores (PILIZOTA et al, 1996).

## 2.5 Amido

O amido é um carboidrato de estrutura complexo, formado por monossacarídeos ligados entre si, sendo encontrado como principal reserva em plantas constituindo cerca de 70-80% da energia calórica consumida mundialmente (SILVA, 2009). O amido pode ser encontrado em vegetais como cereais (principalmente milho, trigo e arroz), raízes (tais como batata, batata-doce e mandioca), tubérculos, frutas e legumes, embora a nível comercial a sua extração se restringe aos cereais, raízes e tubérculos (AMORIM, 2012).

A estrutura do amido se apresenta na forma de grânulos compostos por amilose e amilopectina (figura 2), correspondente a 98-99% do seu conteúdo, sendo que, o seu teor varia com a fonte do amido e com o grau de maturação das plantas uma vez que, diferentes proporções desses biopolímeros influenciam na organização física e nas suas propriedades (OLIVEIRA, 2011).



**Figura 2:** Estrutura da amilose (A) e da amilopectina (B) (RHOR, 2007).

O amido possui um papel comercial importante pelas suas propriedades favoráveis decorrentes da segurança fisiológica, biodegradabilidade e que, pela própria abundância. Entre inúmeras aplicações do amido, destaca-se o setor alimentar onde se destacam suas características como agentes adesivos, ligantes e formadores de filmes, gelificantes, espessantes, retentores de umidade e retardadores de retrogradação de alguns alimentos (WEBBER, 2009).

## 2.6 Exopolissacarídeos

Os exopolissacarídeos, comumente referidos como EPS, são biomoléculas com propriedades poliméricas, produzidas continuamente durante o crescimento e metabolismo de uma vasta gama de microrganismos como secreções extracelulares (BARBOSA et al, 2004). Dos EPS microbianos, aqueles provenientes de bactérias, como as diazotróficas, lácteas, marinhas, as presentes em estações de tratamento de água entre outras; e de fungos/leveduras, estão entre os mais estudados, sendo que diferem em características, propriedades e em aplicabilidade (MAHAPATRA & BANERJEE, 2016; LIU et al, 2016; ARUN et al 2017; KUMAR et al, 2011; MUBARAK & AMER, 2013).

De acordo com Pinheiro (2014), os exopolissacarídeos são considerados metabólicos secundárias por serem produzidos durante a fase estacionária do crescimento microbiano e, podem ser encontrados na forma de cápsulas ligadas às paredes celulares, ou na forma de mucos excretados no meio extracelular, capazes de se solubilizar no meio aumentando substancialmente a viscosidade do caldo fermentativo (figura 3).



**Figura 3:** Aspecto visual de muco de EPS microbiano (BARRETO, 2012).

Essas biomoléculas são produzidas por microrganismos em condições de estresse frente a limitação de alguns nutrientes essenciais, nomeadamente fontes de carbono, nitrogênio e oxigênio, pelo alto esforço de cisalhamento mecânico (agitação), pela elevada razão carbono/nitrogênio entre outros fatores (BARBOSA et al, 2004; ASSIS et al, 2016).

Os exopolissacarídeos são compostos por uma variedade de substâncias orgânicas, majoritariamente carboidratos e proteínas, e em menores quantidades substâncias húmicas, ácidos urônicos e ácidos nucleicos (COMTE, GUIBAUD & BAUDU, 2006; GOMES et al, 2016). Em termos de estrutura morfológica, os monossacarídeos frequentemente encontrados no EPS são D-glucose, D-galactose, D-manose, L-fucose e L-ramnose.

Propriedades físico-químicas do EPS variam não só entre os microrganismos produtores, mas também com as mudanças no meio bacteriano (fonte de carbono utilizada, fonte de nitrogênio, aeração, pH...) (SANTOS, 2010).

Arun e colaboradores (2017), produzindo EPS a partir de *Halolactibacillus miurensis* verificaram que o biopolímero era constituído principalmente por galactose (61,87%) e glucose (25,17%), contendo ainda em menores quantidades açúcares como xilose, frutose, manose e ramnose. Já Zhang e colaboradores (2013) verificaram que a presença do monômero da glicose se sobrepõe à galactose em EPS oriundo de *Lactobacillus plantarum*, sendo que EPS produzido por *Haloterrigena turkmenica* os maiores constituintes são glucose, glucosamina e galactose (SQUILLACI et al, 2015). Para Guentas e colaboradores (2001) a estrutura molecular do EPS produzido por uma estirpe de *Rhizobium sp.* isolada de nódulos de alfafa era formada essencialmente por glucose e ramnose (1:2), com traços de ácido 2- deoxi-D-arabino hexurônico, caracterizando-se como um EPS diferente daqueles produzidos por outras estirpes de rizóbio.

Os exopolissacarídeos de origem microbiana incluem dextranos, xantanas, gelanas, pululanas, gluanos de levedura e alginatos bacterianos (TRABELSI, 2015).

### 2.6.1 Biossíntese de exopolissacarídeo

A biossíntese de exopolissacarídeos microbianos é um processo que envolve várias vantagens quanto à forma de obtenção desse biopolímero, como a possibilidade de controlar todos os fatores envolvidos na sua produção, ter velocidade e rendimento elevados, maior pureza e consistência na produção (SANTOS, 2010).

A maioria dos exopolissacarídeos bacterianos são sintetizados no interior das células e, posteriormente as macromoléculas são excretadas para o ambiente extracelular, entretanto, existem exopolissacarídeos cuja síntese e polimerização ocorrem no exterior das células pela ação de enzimas. Quando a síntese ocorre no interior das células, a passagem para o meio externo é um processo desafiador, pois os biopolímeros são hidrofílicos e de alto peso molecular o que pode comprometer a barreira citoplasmática e promover a lise celular. A produção de EPS é relacionada à fase exponencial do crescimento microbiano, sendo que há relatos de microrganismos que produzem o biopolímero no início da fase exponencial (FREITAS, ALVES & REIS 2011).

A produção e composição do EPS é influenciada por alguns fatores típicos, como o tipo de fonte de carbono e nitrogênio (substrato), condições operacionais como oxigênio disponível, forças de cisalhamento (agitação), tempo de fermentação e composição química do meio (pH e sais disponíveis) (ZENG et al, 2016). A síntese de EPS é normalmente favorecida pela presença em excesso da fonte de carbono contrastando com a limitação da fonte de nitrogênio ou de oxigênio, existindo uma concentração ótima desses substratos para cada microrganismo, sendo que a produção de EPS bacteriano normalmente ocorre em condições aeróbias (PINHEIRO, 2014).

As condições do meio fermentativo e do cultivo não altera de forma significativa a estrutura básica de carboidratos constituintes da maioria dos exopolissacarídeos, entretanto, o conteúdo dos grupos substituintes podem variar o que implica alterações nas propriedades do biopolímero (FREITAS, ALVES & REIS, 2011). No entanto, CASTELLANE e LEMOS (2007) utilizando diferentes fontes de carbono para produção de EPS a partir do cultivo de *Rhizobium tropici*, observaram que os EPS obtidos continham na sua constituição básica glicose, galactose, manose, ramnose e ácidos urônicos, entretanto as proporções de açúcar diferenciavam para cada EPS produzido.

A extração do EPS do meio fermentativo, envolve inicialmente processos físicos, como centrifugação e filtração, seguido de uma etapa onde são adicionados agentes precipitantes, como etanol, o mais comumente utilizado; solução de etanol-acetona; água destilada; formamida, entre outros (RIMADA et al, 2003; LIANG et al, 2010; HE et al, 2012; YU et al, 2017).

Vários estudos visando a produção de EPS têm sido desenvolvidos que utilizam diferentes microrganismos e exploram diferentes fontes de carbono, fontes de nitrogênio e meios de cultura. Características como temperatura, pH e agitação também são variáveis exploradas visando ao máximo rendimento, bem como as condições de recuperação desse biopolímero do meio fermentativo. A tabela 3 mostra diferentes trabalhos desenvolvidos nesse âmbito.

**Tabela 4:** Produção microbiana de exopolissacarídeos.

<b>Microrganismo</b>	<b>Fonte Carbono</b>	<b>Meio Fermentativo</b>	<b>T (°C)</b>	<b>pH</b>	<b>Agitação (rpm)</b>	<b>t (h)</b>	<b>Método extração</b>	<b>EPS (g/L)</b>	<b>Autores</b>
<i>Aspergillus sp.</i>	glicose	Meio líquido (extrato de levedura e sais)	25 °C	6,0–6,5	----	168	Lavagem com solvente/centrifugação/filtração membrana	0,60	Chen <i>et al</i> , 2011
<i>Aureobasidium pullulans</i>	sacarose	Meio SYP	28 °C	5,0	150	168	Lavagem com solvente/liofilização	42,24	Yadav, Rahi & Soni, 2014
<i>Cupriavidus necator</i>	glicerol bruto de biodiesel (CGB)	Meio mineral	35°C	7,0	180	72	Lavagem com solvente/centrifugação	1,93 ± 0,13	Assis <i>et al</i> , 2016
<i>Cryptococcus laurentii</i>	sacarose	Caldo de dextrose de batata	25 °C	6,0	150	144	Filtração/lavagem com solvente	4,3	Smirnou <i>et al</i> , 2014
<i>Fusarium oxysporum</i>	glicose	Meio líquido (extrato de levedura e sais)	25 °C	6,0–6,5	----	168	----	0,12	Guo <i>et al</i> , 2013
<i>Hypocreales sp.</i>	sacarose	Meio líquido (extrato de levedura, sais e vitaminas)	25 °C	6,5	100	120	Lavagem com solvente/centrifugação	1,33	Yeh <i>et al</i> , 2014
<i>Halolactibacillus miurensis</i>	glicose	Meio líquido (extracto de levedura e sais)	32°C	8,0	----	72	Lavagem com solvente/centrifugação	2,5	Arun <i>et al</i> 2017
<i>Lactobacillus plantarum</i>	glicerol	MRS	37 °C	----	----	----	Aquecimento /centrifugação/ lavagem com solvente/ centrifugação	0,325	Imran <i>et al</i> , 2016
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	glicose	MRS	37 °C	6,0	150	24	Lavagem com solvente/centrifugação	1,48 ± 0,23	Liu <i>et al</i> , 2016

**Tabela 4:** Produção microbiana de exopolissacarídeos (continuação).

<b>Microrganismo</b>	<b>Fonte Carbono</b>	<b>Meio Fermentativo</b>	<b>T (°C)</b>	<b>pH</b>	<b>Agitação (rpm)</b>	<b>t (h)</b>	<b>Método extração</b>	<b>EPS (g/L)</b>	<b>Autores</b>
<i>Laetiporus sulphureus</i>	glicose	Extracto de levedura Peptona de soja Extrato de malte	31 °C	4,0	150	----	Lavagem com solvente/centrifugação	0,22±0,004	Lung & Huang, 2011
<i>Morchella crassipes</i>	glicose	Meio GP	26°C	6,5	150	96	Filtração/lavagem com solvente/centrifugação	9,67	He <i>et al</i> , 2012
<i>Lactobacillus sp. Ca6</i>	sacarose	MRS	30 °C	6,5	----	48	Aquecimento /centrifugação/ lavagem com solvente/ centrifugação	2,4	Trabelsi <i>et al</i> , 2015
<i>Pestalotiopsis sp</i>	glicose	caldo de dextrose de batata	24 °C	6,93	----	90,2	Lavagem com solvente/centrifugação	4,32±0,022	Mahapatra & Banerjee, 2016
<i>Phellinus sp.</i>	glicose		28 °C	6,5	150	144	Lavagem com solvente/centrifugação	10,92 ±0,68	Ma <i>et al</i> 2014
<i>Rhodothermus marinus</i>	lactose	Caldo marinho	65 °C	----	200	48	Lavagem com solvente/centrifugação	0,137	Sardari <i>et al</i> , 2017
<i>Rhizobium tropici</i>	----	PSYL semi-líquido	29 °C	7,0	140	144	Lavagem com solvente/centrifugação	3,95 ± 0.11	Castellane, Lemos & Lemos, 2014
<i>Rhizobium leguminosarum bv trifolii</i>	glicerol	79CA	28 °C	----	160	96	Lavagem com solvente/centrifugação	1,48 ± 0.1	Janczarek <i>et al</i> , 2015
<i>Diaporthe</i>	glicose	VMSM	28 °C	5,8	180	96	Filtração/ lavagem com solvente/ centrifugação	1,76 ± 0.21	Orlandelli <i>et al</i> , 2016
<i>Serratia sp.1</i>	----	Lodo de água residual	30°C	7,0	220	72	Centrifugação/filtração	3,44	Bezawada <i>et al</i> , 2013
<i>Zunongwangia profunda</i>	lactose	Meio basal	15°C		200	144	Lavagem com solvente/centrifugação	6,5	Liu <i>et al</i> , 2011

A partir das informações da tabela 3, Yadav e colaboradores (2014) visando à otimização da produção de EPS a partir do cultivo da levedura *Aureobasidium pullulans* RYLF-10, utilizaram como fonte de carbono a sacarose e como fonte de nitrogênio o extrato de levedura nas concentrações de 50 g L<sup>-1</sup> e 1 g L<sup>-1</sup> respectivamente, numa proporção de 60:1. As condições ótimas de temperatura e pH para a produção de EPS foram de 28 ± 1 °C e 5,0, respectivamente, enquanto a velocidade de agitação foi de 150 rpm. Com uma concentração inicial de inóculo de 1% (v/v) e com um tempo fermentativo de 168 horas, obtiveram um rendimento muito expressivo de 45,24 g L<sup>-1</sup>. Para a extração do EPS inicialmente o meio foi filtrado e ao sobrenadante adicionada uma solução de tricloroacético 5% (TCA) que mantido durante a noite a 4 °C para remoção de proteínas e, ao filtrado foi adicionado etanol na razão 1:4 (v/v) para a precipitação do EPS sendo este posteriormente liofilizado e quantificado.

He e colaboradores (2012) a partir do cultivo de *Morchella crassipes* e tendo como fonte de carbono a maltose, 44,79 g L<sup>-1</sup>, e como fonte de nitrogênio a triptona, 4,21 g L<sup>-1</sup>, obtiveram um rendimento de 9,67 g L<sup>-1</sup> de EPS em frascos de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura e 4% (v/v) do inóculo, a uma temperatura de 26 °C, pH de 6,5 e agitação 150 rpm durante 96 horas. Para recuperação do EPS, o meio foi filtrado em membranas de 0,45 µm e o filtro lavado repetidas vezes com água destilada e seco a 70 °C durante a noite até atingir um peso constante. Ao filtrado do meio de cultura foi adicionado etanol absoluto na razão 1:4 (v/v) mantido durante a noite a 4 °C, em seguida, o EPS precipitado resultante foi centrifugado a 11.000 g durante 15 min, descartando-se o sobrenadante. A concentração de EPS foi determinada pelo método colorimétrico fenol-sulfúrico.

Ma e colaboradores (2014) usando como cultivo o fungo *Phellinus sp.* P0988, em erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio fermentativo tendo como fonte de carbono a glicose e 10% (v/v) do inóculo, em agitadores rotativos a 150 rpm, a 28 °C durante 144 horas conseguiram produzir 10,92 g L<sup>-1</sup> de EPS.

Liu e colaboradores (2011) utilizaram a bactéria marinha *Zunongwangia profunda* SM-A87 com diferentes fontes de carbono para a produção de EPS, em erlenmeyers de 500 mL contendo 100 mL de meio basal, a 15 °C e 200 rpm durante 144 horas adicionando inóculo a 2% (v/v). As amostras foram retiradas do meio de cultura pela adição de etanol absoluto a frio na razão 1:2 e centrifugadas a 10 000 rpm por 10 min. De modo a remover possíveis impurezas de baixo peso, o precipitado foi lavado por duas vezes com etanol absoluto e levado a uma nova centrifugação. A determinação da concentração de EPS foi feita pelo método fenol-sulfúrico. Os autores verificaram que a lactose foi a melhor fonte de carbono cujo rendimento foi mais significativo.

Castellane e colaboradores (2014) utilizaram a bactéria *Rhizobium tropici*, membro da família *Rhizobiaceae*, em erlenmeyers de 1000 mL contendo 500 mL do meio PSYL semilíquido a uma concentração do inóculo de 0,10% (v/v) incubados a 29 °C, sob uma agitação de 140 rpm durante 144 horas. Para recuperação do biopolímero, o caldo fermentativo foi centrifugado a 10.000 g durante 30 min a uma temperatura de 4 °C e, posteriormente ao sobrenadante foi adicionado etanol, 96%, a frio numa proporção 1:3 (v/v). Após um período de 24 horas em que a mistura foi refrigerada a 4 °C as amostras foram novamente centrifugadas nas mesmas condições, para separar o precipitado do solvente, sendo este, lavado várias vezes com etanol, e o resíduo de etanol, posteriormente evaporado. O produto precipitado foi seco utilizando um liofilizador até atingir um peso constante.

Liu e colaboradores (2016) utilizaram a estirpe de *Lactobacillus acidophilus* e estirpes modificadas dessas bactérias por acidificação das mesmas. Usando a estirpe selvagem foi obtido um rendimento de 1,48 g L<sup>-1</sup> com cultivo em 30 mL do meio MRS a uma temperatura de 37 °C por 24 horas. Os meios após esse período foram centrifugados a 10.000 g durante 30 min e o precipitado resultante descartado, sendo adicionado ao sobrenadante álcool, 70%, a 4 °C. Após 24 horas sem agitação, foi realizada uma nova centrifugação nas mesmas condições.

Os precipitados foram dissolvidos em 10 mL de água destilada para determinação quantitativa de EPS pelo método fenol-ácido sulfúrico usando glicose como padrão.

Assis e colaboradores (2016) produziram em simultâneo polihidroxialcanoatos (PHA) e o exopolissacarídeo ácido poliglutâmico (PGA) a partir do cultivo de *Cupriavidus necator*, utilizando como fonte de carbono glicerol bruto proveniente da indústria de biodiesel. Em meios de cultivo contendo 20 g L<sup>-1</sup> de glicerol bruto foram incubadas suspensões bacterianas de *Cupriavidus necator*, durante um período de 72 horas, à temperatura de 35 °C, pH neutro e sob agitação constante de 180 rpm. A extração do PGA foi feita pela adição de etanol absoluto a 4 °C numa proporção de 3:1 ao sobrenadante resultante da centrifugação do meio de cultivo a 42.200 g por 30 min a 5 °C. A mistura resultante foi mantida sob agitação por 24 horas e posteriormente precipitada, lavada com água destilada e liofilizada.

Luang e Huang (2011) visando à otimização do processo produtivo de EPS a partir do cultivo submerso de *Laetiporus sulphureus*, na tentativa de escalonar o processo testaram seis diferentes fontes de carbono como alternativas à glicose (sacarose, xilose, maltose, frutose, galactose e ribose), bem como cinco diferentes fontes de nitrogênio (triptona peptona de soja, peptona de carne, sulfato de amônio e ácido l-glutâmico), a concentrações de 10 g L<sup>-1</sup> e 5 g L<sup>-1</sup> respectivamente. Ainda análises da concentração ótima de glicose e extrato de levedura foram realizadas em frascos de 250 mL contendo 100 mL de meio. Para o scale up, utilizaram glicose e extrato de levedura nas concentrações de 10 g L<sup>-1</sup> e 5g L<sup>-1</sup> como fonte de carbono e nitrogênio respectivamente em um tanque fermentador agitado com aeração e temperatura controlada. Nas condições de 31 °C, pH de 4,0 e sob agitação constante de 150 rpm em volumes de 5 L e 20 L inoculadas com 5% (v/v) da suspensão bacteriana conseguiram obter um rendimento de 367 e 356 mg L<sup>-1</sup> respectivamente. Para a extração do biopolímero, o caldo fermentado foi centrifugado e o sobrenadante adicionado a quatro volumes de etanol e refrigerado a 4 °C. O precipitado foi precipitado por centrifugação e lavado sucessivamente com etanol e liofilizado.

Arun e colaboradores (2017) isolaram exopolissacarídeos oriundos do cultivo de *Halolactibacillus miurensis* em meio contendo glicose como fonte de carbono e peptona como fonte de nitrogênio nas concentrações de 10 g L<sup>-1</sup> e 75 g L<sup>-1</sup>, respectivamente. As condições utilizadas pelos autores foram temperatura de 32 °C, pH de 8,0 e período de fermentação de 72 horas. Para a extração do biopolímero utilizaram o método descrito por Arun, Sathishkumar e Muneeswaram (2014) que se baseia na precipitação do EPS presente no meio de cultura pela adição de etanol frio na proporção 1:2 e o precipitado resultante foi recolhido por centrifugação, sendo posteriormente dissolvido em água destilada e desproteinado. Os autores conseguiram um rendimento de 2,5 g L<sup>-1</sup> de exopolissacarídeo.

## 2.6.2 Aplicações do EPS

Os exopolissacarídeos têm uma vasta gama de aplicações tecnológicas, como a área farmacêutica, cosmética, alimentícia e agrícola, pelo importante papel que desempenham na proteção dos microrganismos responsáveis pela sua produção contra substâncias antimicrobianas, dessecação, bacteriófagos, estresse osmótico e anticorpos (JORUSZUK-OSÍNSKA et al, 2015, SARDARI et al, 2017). O EPS ainda pode servir como fonte de carbono para os microrganismos na ausência de nutrientes (ZENG et al, 2016), são utilizados como bioemulsificantes e auxiliam na solubilidade de hidrocarbonetos facilitando a sua degradação, aumentam a biofloculação e a bioadsorção de metais pesados em águas residuais e águas naturais. A característica que confere maior aplicabilidade ao exopolissacarídeo é sua capacidade de aumentar a viscosidade das soluções e emulsionar vários compostos formados principalmente por hidrocarbonetos, sendo que emulsificantes à base de polissacarídeos microbianos apresentam vantagens referentes à emulsificantes sintéticos na medida em que possuem menor toxicidade, maior degradabilidade, melhor compatibilidade com o meio

ambiente e maior resistência perante variações de pH, temperatura e salinidade (CASTELLANE et al, 2014).

Os exopolissacarídeos de origem bacteriana têm propriedades estruturais e funcionais específicas que lhes conferem propriedades como antioxidantes naturais e, em ambientes marinhos ajuda na formação de biofilmes e na proteção a condições externas (ARUN et al, 2017). São também usados como substituto de gengivas de plantas e algas marinhas devido a suas características físico-químicas que não alteram com variações climáticas, de cultivo, produção e poluição (BUENO & GARCIA-CRUZ, 2006). Na indústria médico-farmacêutica têm sido amplamente estudados para estabilização de agentes, produção de imunostimulantes, ações antitumorais e como cosméticos (GOMES et al, 2016).

Na agricultura torna-se viável a aplicação dos EPS pelo papel que desempenham na proteção de microrganismos responsáveis pela sua produção contra substâncias antimicrobianas, dessecação, bacteriófagos, estresses osmóticos e anticorpos. além do seu potencial como biofertilizante, na remoção de metais pesados e hidrocarbonetos, como biocontrole e indução de resistência nas plantas (SKA-JAROSZUKI et al, 2015; SARDARI et al, 2017).

A área de aplicação dos exopolissacarídeos está diretamente relacionada às propriedades, físicas e químicas específicas que caracterizam diferentes usos industriais conforme apresentado na tabela 4.

**Tabela 5:** Principais características físico-químicas e áreas de aplicação de Exopolissacarídeos microbianos.

Exopolissacarídeo	Componentes	Principais propriedades	Principais aplicações
Xantana	glicose, manose, ácido glicurônico, acetato, piruvato	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hidrocolóide</li> <li>- Rendimento de alta viscosidade a baixas taxas de cisalhamento mesmo em baixas concentrações;</li> <li>- Estabilidade em altas temperaturas, pH e elevadas concentrações de sais</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alimentos</li> <li>• Indústria petrolífera</li> <li>• Produtos farmacêuticos</li> <li>• Cosmética e produtos de cuidados pessoais</li> <li>• Agricultura</li> </ul>
Gelana	glicose, raamnose, ácido glicurônico, acetato, glicerato	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hidrocolóide</li> <li>- Estabilidade em toda a faixa de pH</li> <li>• Capacidade de gelificação</li> <li>• Géis termo-resistivos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alimentos</li> <li>• Alimentos para animais de estimação</li> <li>• Produtos farmacêuticos</li> <li>• Pesquisa: substituto de ágar e eletroforese em gel</li> </ul>
Alginato	ácido gulurônico, ácido manurônico, acetato	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hidrocolóide</li> <li>• Capacidade de gelificação</li> <li>• Formação de filmes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hidrocolóide alimentício</li> <li>• Medicina</li> <li>- Vasos cirúrgicos</li> <li>- Gerenciamento de feridas</li> <li>- Liberação de medicamentos controlados</li> </ul>
Celulose	Glicose	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alta cristalinidade</li> <li>• Insolubilidade na maioria dos solventes</li> <li>• Alta resistência à tração</li> <li>• Maleabilidade</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alimentos</li> <li>• Biomédico</li> <li>- Recuperação de cura</li> <li>- Vasos sanguíneos manipulados por tecidos</li> <li>- Áudio diafragmas de alto-falante</li> </ul>

**Tabela 5:** Principais características físico-químicas e áreas de aplicação de Exopolissacarídeos microbianos (continuação).

<b>Exopolissacarídeo</b>	<b>Componentes</b>	<b>Principais propriedades</b>	<b>Principais aplicações</b>
Dextrana	glicose	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Não iônico</li> <li>• Boa estabilidade</li> <li>• Comportamento de líquido newtoniano</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alimentos</li> <li>• Indústria farmacêutica:               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Expansor de volume sanguíneo</li> </ul> </li> <li>• Meios cromatográficos</li> </ul>
Curdana	glicose	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Capacidade de formação de gel</li> <li>• Insolubilidade da água</li> <li>• Comestíveis e não tóxicos</li> <li>• Atividade biológica</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alimentos</li> <li>• Indústria farmacêutica</li> <li>• Remoção de metal pesado</li> <li>• Aditivo de concreto</li> </ul>
Ácido hialurônico	ácido glicurônico acetilglucosamina	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Atividade biológica</li> <li>• Altamente hidrofílico</li> <li>• Biocompatível</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Remédio</li> <li>• Meio de cultura sólida</li> </ul>
Succinoglicano	glicose, G galactose, acetato, piruvato, succinato, 3-hidroxi-butirato	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Soluções aquosas viscosas de cisalhamento</li> <li>• Estabilidade ácida</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alimentos</li> <li>• Recuperação de óleo</li> </ul>
Levana	frutose	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Baixa viscosidade</li> <li>• Alta solubilidade em água</li> <li>• Atividade biológica:               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Atividade antitumoral</li> <li>- Anti-inflamatório</li> </ul> </li> <li>• Força adesiva</li> <li>• Capacidade de formação de filme</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alimentos (pré-bióticos)</li> <li>• Alimentação</li> <li>• Medicamentos</li> <li>• Cosméticos</li> <li>• Indústria</li> </ul>

Fonte: Adaptada de FREITAS, ALVES & REIS 2011

### **3 OBJETIVOS**

O presente trabalho de pesquisa teve como objetivo principal o desenvolvimento de veículos de inoculação à base de CMC/EPS (carboximetilcelulose/exopolissacarídeo) e CMC/amido/EPS para produção de inoculantes a partir das cinco estirpes de bactérias diazotróficas capazes de manter a viabilidade das células bacterianas durante o período de armazenamento e ser compatível com mudas pré-brotadas a partir da inoculação de minitoletes. para formulações contendo cinco estirpes de bactérias promotoras de crescimento do cultivo de cana-de-açúcar.

#### **3.1 Objetivos Específicos**

Explorar os efeitos da fonte de carbono e fonte de nitrogênio no rendimento da produção do exopolissacarídeo, no crescimento bacteriano e nas suas características físico-químicas. Avaliar as características reológicas e viscosimétricas dos veículos poliméricos produzidos à base de CMC, amido e exopolissacarídeo. Relacionar as características reológicas com a sobrevivência das estirpes bacterianas nos inoculantes desenvolvidos em dois meses de armazenamento, bem como avaliar o desenvolvimento de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar em casa-de-vegetação quando inoculadas com inoculantes poliméricos em comparação com inoculantes à base de material turfoso.

## 4 HIPÓTESES CIENTÍFICAS

A escolha das misturas CMC/EPS e CMC/Amido/EPS para formulações do cultivo de cana-de-açúcar advém do fato que em pesquisas anteriores com inoculantes poliméricos à base desses materiais, se mostraram promissores em inoculantes rizobianos. O fato desses materiais serem de fonte renovável, ambientalmente ecológicos, fácil manuseio e terem boa retenção de água lhes conferem vantagens quanto ao material tradicionalmente utilizado, a turfa. O EPS em baixas concentrações consegue alterar as características morfológicas do CMC permitindo a sobrevivência de estirpes bacterianas por longos períodos de armazenamento. Assim, as misturas envolvendo o EPS, além de se apresentarem como alternativas viáveis aos materiais turfosos representam uma diminuição nos custos de obtenção dos veículos de inoculação.

O EPS por reunir características que lhe conferem aplicações no sector agrícola, por si só pode trazer melhorias no desenvolvimento de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar ao serem inoculados com o veículo, tanto na ausência ou presença de bactérias promotoras de crescimento bacteriano.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Materiais e Equipamentos

#### 5.1.1 Materiais/reagentes

- Carboximetilcelulose (CMC), viscosidade média da marca QUIMESP;
- Amido tipo I da marca SIGMA;
- Estirpe bacteriana BR 3267 de *Bradyrhizobium yuanmingense*, BR 11281 de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, BR 11145 de *Nitrospirillum amazonense*, BR 11335 de *Herbaspirillum seropedicae*, BR 11504 de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* e BR 11366 de *Parabulkoherdia tropica* fornecidas pelo Centro de Recursos Biológicos Johanna Dobereiner da Embrapa Agrobiologia;
- Meios de cultivo YMA, LGI-P, LGI, JNFB e JMV;
- Soluções salinas, de 8,5 M de NaCl e própria para diluição;
- erlenmeyers 250 mL;
- Pipetas automáticas;
- Placas de petri;
- Ponteiras;
- Microtubos;
- Tubos falcons;
- Placa de Elisa
- Sacos autoclaváveis de polipropileno;
- Água destilada estéril;
- Etanol 70%;
- Fenol 5%;
- Ácido Sulfúrico 10%;
- Glicose;
- BSA (soro albumina bovina).

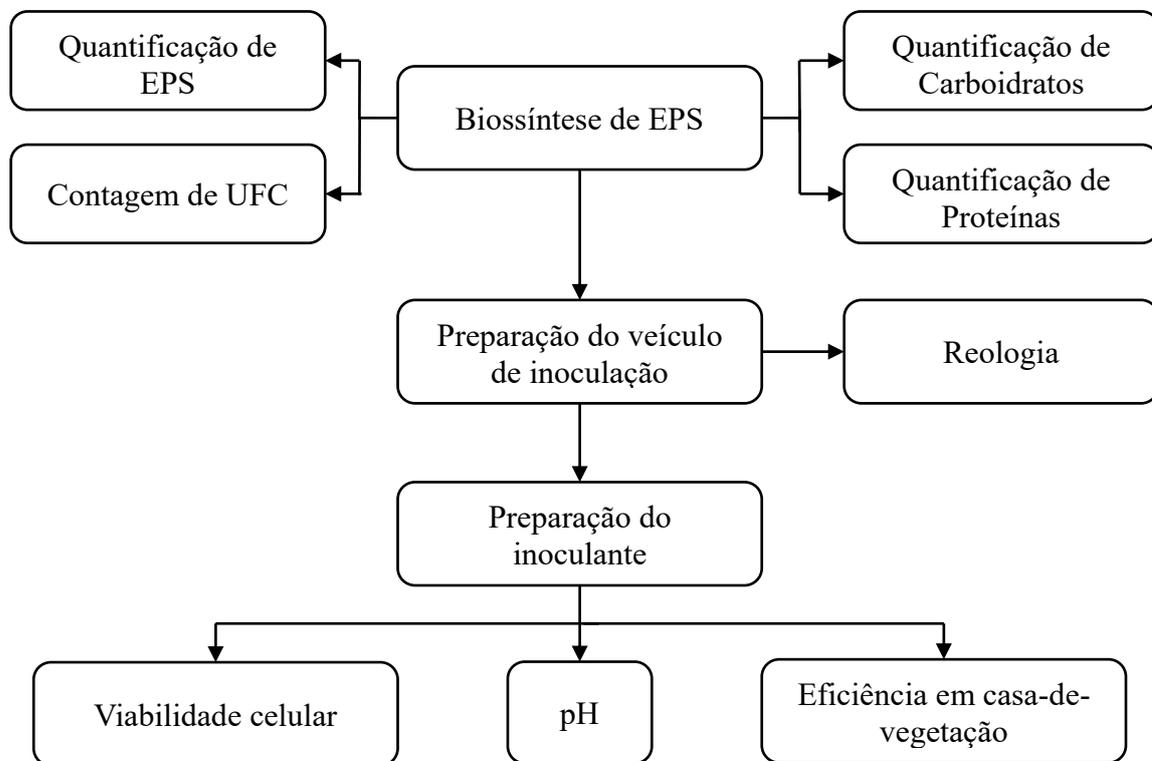
#### 5.1.2 Equipamentos

- Capela de fluxo laminar;
- pHmetro modelo Biovera;
- Mixer - Philips Walita;
- Autoclave;
- Seladora – Selaplast;
- Mesa de agitação;
- Centrifuga Beckman modelo J2 21;
- Concentrador;
- Balança analítica;
- Banho termostático;
- Reômetro de disco oscilatório Haake- sensor placa-placa PP35-Ti;
- Vortex;

### 5.2 Procedimento Experimental

O procedimento experimental adotado foi feito através de uma série de etapas, em que primeiramente fez-se a biossíntese de exopolissacarídeo, testando a influencia de fonte de carbono e de nitrogênio na quantificação e sua caracterização. Após a obtenção do biopolímero,

fez-se a preparação dos veículos de inoculação e posteriormente dos inoculantes, avaliando a eficiência dos mesmos na manutenção de células e caracterizando-os estruturalmente. Posteriormente foi montado o experimento de casa-de-vegetação para avaliar a eficiência dos inoculantes desenvolvidos, de acordo com o fluxograma 1.



Fluxograma 1: Esquema do procedimento experimental adotado.

### 5.2.1 Obtenção do exopolissacarídeo

Células da estirpe BR 3267 foram cultivadas em placas de petri contendo o meio YMA (sólido) e incubadas a 28 °C por 168 horas, de modo a verificar a pureza da bactéria. Dessas placas, foi retirada uma alçada da bactéria isolada e replicada em novas placas de petri contendo o meio sólido YMA (Anexo I) e incubada nas mesmas condições pelo mesmo período de tempo. Após esse período a massa resultante do crescimento bacteriano foi removida das placas e transferida para um tubo falcon de 50 mL onde foi acrescida água destilada estéril para formar uma suspensão bacteriana. A densidade óptica dessa suspensão, a comprimento de onda a 545 nm, foi verificada de modo a calcular a quantidade de inóculo necessário para garantir densidade óptica inicial de 0,1 no meio líquido.

A síntese de exopolissacarídeo foi feita em erlenmeyers de 250 mL contendo 150 mL de meio YM (líquido) (Anexo I), sob agitação constante de 150 rpm, por 168 horas a 28 °C e pH 6,8. A extração do EPS do meio foi feita pelo processo físico de centrifugação a 14000 rpm por 20 min a 4 °C, com descarte do sobrenadante. O precipitado resultante contendo o biopolímero foi lavado com etanol 70%, numa razão de 3:1. Após a adição de etanol as amostras ficaram sob refrigeração por 24 horas, sendo posteriormente submetidas a uma nova centrifugação a 5000 rpm, por 15 min a 4 °C, para a recuperação do EPS. O resíduo de etanol foi extraído em um concentrador à 25 °C. A quantificação do material foi realizada por pesagem em balança analítica.

### 5.2.2 Variação da concentração de carbono e nitrogênio no meio de cultura

De modo a avaliar a influência das quantidades de carbono e nitrogênio no meio fermentativo na composição química e estrutural dos exopolissacarídeos, foram feitas 9 combinações de concentrações de manitol (fonte de C) e extrato de levedura (fonte de N), (Tabela 5). Esse experimento foi baseado em um estudo prévio em que foi constatado que ao aumentar a quantidade de manitol e/ou extrato de levedura havia um favorecimento do crescimento bacteriano.

**Tabela 6:** Concentrações de manitol e extrato de levedura no meio YM usadas para otimizar a produção de EPS pela estirpe BR 3267.

Manitol (g/L)	Extrato de Levedura (g/L)
13,3	1,8
13,3	3,1
13,3	5,2
20,0	1,8
20,0	3,1
20,0	5,2
30,0	1,8
30,0	3,1
30,0	5,2

O procedimento experimental para a produção/obtenção do EPS é semelhante ao descrito anteriormente, sendo que para cada combinação foram realizadas 3 repetições.

### 5.2.3 Determinação de unidades formadoras de colônia no meio YM após 7 dias à 28 °C

A determinação da concentração de células bacterianas viáveis no meio YM foi feita por meio da leitura de densidade óptica dos meios de cultivo e a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC).

Foram retiradas alíquotas dos meios de cultura após 7 dias de cultivo para determinação da densidade óptica a 540 nm.

A determinação da concentração de células viáveis foi realizada a partir de uma série de diluições seriadas, 1:10 (DAMASCENO, 2011). A diluição seriada foi feita em microtubos contendo solução salina de NaCl a 8,5 g L<sup>-1</sup>, 100 µL da solução concentrada foi diluída em 900 µL dessa solução, formando uma mistura na razão 1:10 e dessa mistura uma alíquota de 100 µL é diluída em 900 µL de solução salina obtendo uma nova mistura na razão 1:100 e assim sucessivamente até a concentração de 10<sup>-8</sup>. Em seguida, pelo método de espalhamento em Superfície (*spread plate*), placas contendo YMA foram inoculadas com 10 µL das diluições de 10<sup>-3</sup> a 10<sup>-8</sup> (DAMASCENO, 2011). Após incubação das placas para crescimento em BOD a 30 °C, relaciona-se o número de colônias, a diluição da amostra e o volume incubado, calculado pela equação 1.

$$UFC = n \times D \times F \quad \text{(equação 1)}$$

Onde: n se refere ao número de colônias obtidas em uma dada diluição, D é a diluição onde foi realizada a contagem e F o fator de diluição que é dada pela primeira diluição e o volume de amostra.

#### 5.2.4 Quantificação de carboidratos totais

A determinação da quantidade de carboidratos presentes nas amostras de EPS foi feita utilizando o método fenol-sulfúrico utilizando glicose como padrão.

A glicose foi utilizada como composto padrão para esta análise por se tratar de um carboidrato bastante estudado e conhecida a sua constituição. As concentrações usadas para a construção da curva padrão estão na tabela 6.

**Tabela 7:** Concentrações indicadas para confecção da curva de calibração.

Concentração	Glicose a 100 µg/mL	Água destilada
20 µg/mL	100 µL	400 µL
40 µg/mL	200 µL	300 µL
60 µg/mL	300 µL	200 µL
80 µg/mL	400 µL	100 µL
100 µg/mL	500 µL	----

Com a densidade óptica dos pontos de concentração da glicose foi construída a curva de calibração que auxilia no cálculo da concentração de carboidratos nas amostras de interesse. O volume de amostra aplicada e as concentrações administradas para os ensaios foram os mesmos utilizados no padrão e todos os ensaios foram realizadas em triplicata. A partir da linha de tendência linear e da equação da reta fornecidas pelo gráfico e, substituindo o valor de y pela absorvância da amostra de interesse calculou-se a sua concentração.

#### 5.2.5 Quantificação de proteínas presentes

A determinação de proteínas presentes nas amostras de EPS foi feita de acordo com o método de Bradford usando BSA (soro albumina bovina) como padrão.

Inicialmente foi preparada uma curva de calibração a partir de uma solução padrão de BSA na concentração 10 mg/mL (10 mg de BSA e 1 mL de água destilada) (Tabela 8).

**Tabela 8:** Confecção dos pontos da curva de calibração empregando o método de diluição seriada.

Concentração	Soluções de BSA	Diluyente (água destilada)
2,0 mg/mL	20 µL da solução estoque (10 mg/mL de BSA)	80 µL
1,0 mg/mL	50 µL da solução padrão 2,0 mg/mL	50 µL
0,5 mg/mL	50 µL da solução padrão 1,0 mg/mL	50 µL
0,25 mg/mL	50 µL da solução padrão 0,5 mg/mL	50 µL
0,125 mg/mL	50 µL da solução padrão 0,25 mg/mL	50 µL

Em uma placa de elisa estéril foram transferidos para cada poço, 5 µL de água destilada (branco), e 5 µL das soluções preparadas para a curva de calibração e 5 µL das amostras a serem avaliadas. Em seguida, foram acrescentados 250 µL do reagente de Bradford. Os ensaios foram realizados em triplicata. Após a incubação da placa no escuro por 15 min, foi realizada a leitura das absorvâncias a 595 nm.

Com os dados foi construída a curva de calibração, estimada a concentração de proteínas nas amostras determinada a partir da média das triplicatas subtraída da média do branco.

### 5.2.6 Produção de veículos de inoculação

Foram preparados veículos de inoculação a partir das misturas poliméricas a base carboximetilcelulose/exopolissacarídeo (CMC/EPS) e da mistura ternária envolvendo carboximetilcelulose/amido/exopolissacarídeo (CMC/AM/EPS). A composições das misturas são apresentadas nas tabelas 9 e 10 e baseou-se no trabalho desenvolvido por Sousa (2017).

**Tabela 9:** Composição e teores de EPS nas misturas CMC/EPS.

CMC (g/L)	EPS (g/L)	Teor de EPS na mistura
64,00	0,00	0,0 %
63,68	0,32	0,5%
63,36	0,64	1,0%
62,72	1,28	2,0%

Para a mistura CMC/Amido/EPS, o teor de exopolissacarídeo escolhido representa 1% da base seca, sendo os restantes 99% distribuídos em 60% de carboximetilcelulose e 40% de amido, cujas quantidades em gramas encontram-se expressas na tabela 10.

**Tabela 10:** Composição de teor de EPS na mistura CMC/Amido/EPS.

CMC (g/L)	Amido (g/L)	EPS (g/L)	Teor de EPS na mistura
38,016	25,344	0,64	1,0%

A preparação da mistura seguiu o trabalho de Rohr (2007), considerando como base seca da mistura 64 g de polímero para 1000 mL de água destilada. Em relação à mistura CMC/EPS, foi adicionado o EPS à água destilada e, posteriormente, a CMC. Para a mistura CMC/AM/EPS, o EPS produzido foi solubilizado em água destilada, adicionando o amido e, por último, a CMC. As misturas foram homogeneizadas com auxílio de um mixer. Em seguida, 10 g de cada mistura polimérica foram transferidas para saquinhos de polipropileno, selados termicamente e autoclavados a 120 °C, 1 atm por 20 minutos. As embalagens foram armazenadas à temperatura ambiente durante 15 dias antes da aplicação da suspensão bacteriana.

### 5.2.1 Obtenção de massa celular das estirpes bacterianas eficientes para a cana-de-açúcar

Amostras das estirpes bacterianas listadas na secção 5.1.1 foram retiradas do superfreezer e ativadas em tubos de ensaio contendo os meios líquidos específicos incubados a 30 °C por 12 horas. Em seguida, o caldo foi transferido para erlenmeyers com o meio líquido fresco e mantidos sob agitação de 150 rpm a 30 °C. Ao final da fase exponencial, o caldo de cultivo foi centrifugado a 5.000 rpm durante 5 min a 4 °C e, a massa celular precipitada ressuspensa em água destilada estéril.

### 5.2.2 Inoculação dos veículos

A cada amostra de 10 gramas de veículo de inoculação polimérico foi adicionado 1 mL da suspensão bacteriana da estirpe selecionada. O inoculante foi armazenado em sala refrigerada, à temperatura de 20 °C ± 2 °C acondicionados em caixas de isopor.

### **5.2.3 Ensaio de reologia**

A avaliação da reológica das amostras foi realizada em ensaio oscilatórios em reômetro modelo Haake RheoStress 1 usando geometria placa-placa para ensaios de varredura de frequência, com precisão de 0,1 °C temperatura de 25 °C. Dados de módulos viscoso ( $G''$ ) e módulo elástico ( $G'$ ) foram obtidos por ensaios de varredura de frequência na faixa de 0,1 a 100 Hz com amplitude de 10 Pa, dentro da região da viscoelasticidade linear (RHOR, 2007).

### **5.2.4 Viabilidade celular nos inoculantes poliméricos**

De cada embalagem foram transferidas 5 g de inoculante para um tubo falcon e adicionados 25 mL de água destilada estéril, configurando uma diluição inicial de 1:6. Em seguida foi aplicado o método da diluição seriada (solução salina própria para diluição- Anexo II) descrito na seção 5.2.3 e espalhamento em placas contendo os respectivos meios de cultivo (Anexo III). As avaliações foram feitas aos 30, 60, 90 e 120 dias pós inoculação.

### **5.2.5 Experimentos realizados em casa-de-vegetação**

#### **a) Escolha das composições**

A partir dos resultados obtidos nos testes de viabilidade celular nos diferentes veículos, foram selecionadas composições para a realização de testes em casa de vegetação.

O inoculante foi diluído para aplicação nos mini-toletes de cana-de-açúcar seguindo especificação de estudos anteriores realizados no laboratório de gramíneas da Embrapa Agrobiologia. Foram utilizadas 1000 gramas de inoculante turfoso para 100 litros de inoculante líquido, obtendo-se uma concentração média de  $1,25 \cdot 10^9$  UFC.L<sup>-1</sup>.

#### **b) Montagem de experimento**

Foi conduzido um experimento com mini-toletes de cana-de-açúcar cultivar RB 867515 tratados termicamente a 52 °C por 30 min e inoculados. Os mini-toletes foram plantados em tubetes contendo substrato Carolina esterilizado e mantidos em casa de vegetação.

Foi adotado o desenho experimental em blocos ao acaso com 10 repetições. Foram testados dois tratamentos: aplicação de composições poliméricas (CMC/EPS; CMS/AM/EPS e turfa); e inoculação (com as cinco estirpes eficientes para a cana-de-açúcar e controle (ausência de bactérias) em um esquema fatorial (3 x 2). Foi ainda acrescentado um controle onde o mini-tolete tratados com fungicida, não receberam aplicação das composições poliméricas. No total foram contabilizados catorze tratamentos e 70 amostras.

Os toletes de cana foram cortados transversalmente com cerca de 2 cm de comprimento e selecionados quanto ao diâmetro visando reduzir a variabilidade entre as mudas pré-brotadas (MPB). Após o corte dos mini-toletes esses foram sujeitos a tratamento térmico a 52 °C durante 30 minutos, em banho termostático, a seguir, efetuou-se o tratamento fúngico para os mini-toletes que receberam o tratamento fúngico consistindo de imersão numa solução de 0,1 do fungicida comercial Comet® (BASF) durante 3 minutos (apêndice I).

#### **c) Avaliação do experimento**

Foi determinada o índice de velocidade de brotação (IVB), bem como o número total de mudas brotadas ao longo dos primeiros 13 dias após o planto. Nesta fase, o broto se desenvolve a partir do rompimento das folhas da gema e sai por poros germinativos, desenvolvendo-se em direção à superfície do solo (MANHÃES et al, 2015). O cálculo do IVB é dado pelo somatório da razão da quantidade de toletes brotados pelo tempo de experimento.

No final de 40 dias após o plantio as MPB foram coletadas, removendo-se o substrato e separando-se a parte aérea da raiz. A parte aérea foi avaliada quanto ao diâmetro e altura, matérias secas de parte aérea e raiz e volume da raiz. A medição do diâmetro foi realizada com

um parquímetro digital e, a altura da parte aérea, com uma régua de 50 cm. A secagem da parte aérea e raiz foi feita em uma estufa laminar a 60 °C durante 4 dias. O volume de raiz foi feito em uma proveta de 50 mL, contendo um volume conhecido de água e, registrando o aumento de volume proporcionado após adição da raiz. O volume de raiz foi calculado a partir da diferença entre os dois volumes.

### **5.3 Análise Estatística**

A análise estatística dos dados experimentais foi feita utilizando o programa estatístico SISVAR desenvolvido pela Universidade federal de Lavras. Os resultados foram submetidos à análise de variância ANOVA, e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de significância.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Influência de Fonte de Carbono e de Nitrogênio na Produção de Exopolissacarídeo e Crescimento Bacteriano

De acordo com DOGAN e colaboradores (2015), os principais componentes dos exopolissacarídeos são os carboidratos e proteínas, sendo que as respectivas concentrações são fortemente influenciadas pelas condições do cultivo, métodos de extração, parâmetros de processamento, ferramenta analítica usada, fase do crescimento microbiano e tipo de biorreator utilizado.

O estudo das condições de cultivo sobre a produção de EPS pode ser uma estratégia útil no sentido de otimizar o rendimento por manipulação de composição do meio, como fonte de carbono e levedura (SCHIAVÃO-SOUZA et al, 2007). Neste estudo, diferentes concentrações de manitol (fonte de carbono) e de extrato de levedura (fonte de nitrogênio) foram utilizados para a biossíntese de exopolissacarídeo.

Como forma de relacionar a síntese de exopolissacarídeo e a concentração de células no meio, foram quantificadas concentrações das unidades formadoras de colônias (UFC) presentes no meio de cultivo (Tabela 11).

**Tabela 11:** Quantificação de EPS produzido e e log de unidades formadoras de colônias (UFC) presentes em cada combinação de YM após 168 h de cultivo a 30 °C.

E. Levedura (g/L)	EPS (g/L de meio)			UFC (log)		
	Manitol (g/L)			Manitol (g/L)		
	13,3	20,0	30,0	13,3	20,0	30,0
1,8	1,79±0,04	1,09±0,02	1,71±0,10	10,08	9,79	10,08
3,1	1,49±0,08	2,73±0,04	3,22±0,03	10,41	10,16	10,09
5,2	2,46±0,12	0,15±0,01	0,20±0,01	10,13	7,70	6,81

Analisando os resultados apresentados na tabela 11, observou-se que a maior quantidade de EPS foi obtida com 30 g/l de manitol e 3,06 g/l de extrato de levedura. Esse resultado contradiz a hipótese de que tendo a bactéria mais nutriente disponíveis, fonte de C e fonte de N em simultâneo, para sua sobrevivência e crescimento, seria maior a produção de exopolissacarídeo.

Segundo Assis e colaboradores (2016), para a produção de exopolissacarídeo, além de condições de estresse e altas taxas de cisalhamento, torna-se necessário uma elevada razão entre fonte de carbono/ fonte de nitrogênio. A razão entre fonte de carbono e nitrogênio que proporcionou maior rendimento neste estudo foi de cerca de 10:1 (30 g/L de manitol e 3,06 g/L de extrato de levedura).

A concentração de 5,2 g/l de levedura conjugada a 20 e 30 g/l de manitol forneceu os piores resultados em termos de quantidade de EPS e de concentração de UFC. O baixo crescimento microbiano conjuntamente com o baixo rendimento da produção de EPS pode ser justificado pelo fato do crescimento bacteriano ao fim das 168 horas de cultivo estar em declínio após a fase estacionária, o que pode estar associado à síntese de enzimas que degradam o EPS pelo próprio microrganismo produtor, como relatado por MORE e colaboradores (2014) e por GOMES e colaboradores (2016). Esse facto ainda pode ser relacionado ao facto da razão entre o extrato de levedura e manitol utilizados defasar da razão utilizada no cultivo da estirpe bacteriana, sendo que normalmente são utilizadas 0,4 g/L de extrato de levedura e 10 g/L de manitol assim, sugere-se que nessas condições (baixa razão entre extrato de levedura e manitol) o crescimento bacteriano esteja sendo limitado pela falta de nutrientes em proporções ideais.

Quanto à combinação contendo 3,06 g/l de extrato de levedura e 13 g/l de manitol, ele forneceu o melhor resultado quanto ao crescimento microbiano, no entanto não foi a que apresentou melhor rendimento na produção de EPS. A quantidade de manitol nessa combinação é próxima a utilizada no meio YM que é própria para favorecer o crescimento da estirpe bacteriana, e não representa condições de estresse ao microrganismo. Segundo DONOT e colaboradores (2012), a produção de EPS geralmente é favorecida pelo excesso da fonte de carbono concomitante à limitação de outro nutriente, nomeadamente nitrogênio e/ou oxigênio.

De acordo com Fernandes Júnior e colaboradores (2010), a produção de exopolissacarídeos é, de modo geral, inversamente proporcional ao crescimento bacteriano, o que sugere uma relação reguladora entre o metabolismo bacteriano e o catabolismo. No entanto, Castellane, Lemos e Lemos (2014) relatam que a fase de crescimento em que ocorre a produção de exopolissacarídeo depende do organismo produtor, sendo que pode ocorrer durante o crescimento microbiano, na fase exponencial, ou na fase estacionária.

A produção de exopolissacarídeo por bactérias de mesmo gênero pode variar, independentemente se as condições de cultivo forem as mesmas, caso específico das bactérias do grupo de rizóbio (CASTELLANE, LEMOS & LEMOS, 2014), como por exemplo, o *Bradyrhizobium yuanningense* utilizado nesta pesquisa.

## 6.2 Determinação de Carboidratos e Proteínas

Segundo Jiao e colaboradores (2010) a composição detalhada dos exopolissacarídeos nem sempre é fácil de ser determinada, pois trata-se de mistura complexa de carboidratos, proteínas lipídios, DNA e substâncias de ácido húmico.

O efeito da concentração de manitol e extrato de levedura nas quantificações de carboidratos e proteínas estão representados na tabela 12.

**Tabela 12:** Carboidratos e proteínas totais presentes nas amostras de exopolissacarídeos cultivadas em meio YM após 168 h de cultivo a 30 °C

E. Levedura (g/L)	Carboidratos totais (mg/ mL de EPS)			Proteínas totais (µg/ mL de EPSL)		
	Manitol (g/L)			Manitol (g/L)		
	13,3	20,0	30,0	13,3	20,0	30,0
1,8	1,21	1,21	1,05	0,68	0,64	0,59
3,1	1,76	1,49	1,36	1,34	0,69	0,60
5,2	1,40	---	---	0,69	---	---

Analisando a tabela 12, os valores máximos de carboidratos e de proteínas ocorreram nas concentrações de 13,3 g/L de manitol e de 3,1 g/L de extrato de levedura, atingindo 1.760 µg/mL e 134,2 µg/mL respectivamente, representando no total cerca de 64% e 4% da amostra de EPS. Em contrapartida, os menores teores de carboidratos e proteínas se registraram na concentração máxima de manitol conjugada com a mínima de extrato de levedura.

De acordo com Monteiro e colaboradores (2012), a partir do cultivo de *Bradyrhizobium pachyrhizi* foi produzido exopolissacarídeo de alto teor em açúcares totais e baixo percentual em açúcares redutores, indicando que particamente todo o carboidrato presente encontra-se na forma de polissacarídeo. Ainda segundo os autores, a presença de baixo teor em proteínas pode ser atribuída à presença de uma exoenzima produzida pelo próprio microrganismo capaz de promover a sua desnaturação.

Como a quantidade do biopolímero nas combinações de 20 g/L e 30 g/L de manitol e 5,2 g/L de extrato de levedura, foi muito baixa, não foi possível a determinação de carboidratos

e nem de proteínas totais nessas amostras em razão do limite de detecção dos métodos utilizados.

### 6.3 Análise de Viabilidade Celular das Estirpes Bacterianas de Cana-de-Açúcar na Mistura CMC/Amido/EPS e CMC/EPS.

O tempo de prateleira dos inoculantes representa um grande desafio para a agroindústria sendo que, a manutenção de células com as suas características de interesse devem ser mantidas durante mais do que uma estação de crescimento, que para a legislação Brasileira é de 6 meses (IN 13, MAPA). As formulações que utilizam os os veículos tradicionais e as formulações líquidas tempo de armazenamento recomendado nem sempre é alcançado. Até agora as soluções encontradas para prolongar o tempo de sobrevivência das BPCV passam pelo armazenamento em ambiente refrigerado e pela redução da água livre nas formulações, produzindo produtos secos provenientes de processos como a secagem em leito fluidizado, liofilização e ainda secagem ao ar livre (BASHAN, et al, 2014). A diminuição da água presente nas formulações poliméricas desenvolvidas nesta pesquisa tem a finalidade de aumentar o tempo de armazenamento dos inoculantes mantendo a sobrevivência dessas bactérias dentro dos padrões exigidos.

A determinação da qualidade do inoculante usa a determinação do número de células viáveis (DAMASCENO, 2011). Os resultados de sobrevivências das células bacterianas de cana-de-açúcar armazenadas por até 4 meses são apresentados na tabela 13.

**Tabela 13:** Dados da viabilidade celular dos inoculantes durante armazenamento à temperatura de 20 °C por até quatro meses.

<b>Estirpe BR11335</b>	<b>Log de UFC/mL</b>							
<b>Tratamento</b>	<b>30 dias</b>		<b>60 dias</b>		<b>90 dias</b>		<b>120 dias</b>	
CMC puro	7,677	bA	7,621	aA	7,215	bAB	6,123	bB
CMC/EPS 0,5%	7,418	bA	7,929	aA	8,190	abA	5,744	bB
CMC/EPS 1%	7,432	bA	7,584	aA	8,364	abA	7,961	aA
CMC/EPS 2%	7,513	bB	7,672	aAB	7,924	abAB	8,724	aA
CMC/Amido/EPS 1%	9,011	aA	8,753	aA	8,783	aA	8,541	aA
<b>Estirpe BR 11145</b>	<b>Log do UFC/mL</b>							
<b>Tratamento</b>	<b>30 dias</b>		<b>60 dias</b>		<b>90 dias</b>		<b>120 dias</b>	
CMC puro	5,732	bB	6,328	bB	8,418	abA	6,854	aAB
CMC/EPS 0,5%	6,343	bB	8,069	abAB	8,631	aA	8,284	aAB
CMC/EPS 1%	7,232	abA	6,672	bA	7,189	abA	7,809	aA
CMC/EPS 2%	6,250	bA	6,309	bA	6,205	bA	6,820	aA
CMC/Amido/EPS 1%	8,942	aA	8,906	aA	8,495	aA	7,785	aA
<b>Estirpe BR 11366</b>	<b>Log do UFC/mL</b>							
<b>Tratamento</b>	<b>30 dias</b>		<b>60 dias</b>		<b>90 dias</b>		<b>120 dias</b>	
CMC puro	8,363	aAB	7,167	bB	8,677	aA	6,906	bB
CMC/EPS 0,5%	8,688	aA	7,072	bB	6,772	bB	7,648	abAB
CMC/EPS 1%	8,792	aA	7,222	bB	7,181	abB	7,109	bB
CMC/EPS 2%	8,793	aA	8,840	aA	8,512	aA	7,822	abA
CMC/Amido/EPS 1%	9,003	aA	8,629	abA	8,569	aA	8,789	aA

Estirpe BR 11504	Log de UFC/mL							
	30 dias		60 dias		90 dias		120 dias	
CMC puro	7,571	aA	7,978	aA	7,247	abA	7,925	aA
CMC/EPS 0,5%	8,016	aA	6,844	aAB	5,732	bB	8,462	aA
CMC/EPS 1%	8,462	aA	7,881	aA	7,655	aA	6,860	aA
CMC/EPS 2%	8,294	aAB	7,872	aAB	8,820	aA	6,662	aB
CMC/Amido/EPS 1%	8,673	aA	8,035	aA	8,142	aA	8,237	aA
Estirpe BR 11281	Log de UFC/mL							
	30 dias		60 dias		90 dias		120 dias	
CMC puro	6,270	aA	5,732	bA	Nd		Nd	
CMC/EPS 0,5%	5,836	aA	5,732	bA	Nd		Nd	
CMC/EPS 1%	6,876	aA	5,732	bB	Nd		Nd	
CMC/EPS 2%	6,143	aB	7,974	aA	Nd		Nd	
CMC/Amido/EPS 1%	6,281	aB	8,182	aA	Nd		Nd	

\*Letras distintas para cada estirpe, minúsculas nas colunas, e maiúsculas nas linhas diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Médias de 2 repetições.

\* Nd Não detectável

Analisando a tabela 13, observa-se que as formulações poliméricas contendo a estirpe *Herbaspirillum seropedicae* (Br 11335) até 90 dias de armazenamento não apresentaram diferenças significativas entre si, exceto para o CMC puro e a CMC/Amido/EPS que mostraram diferenças significativas aos 30 e 90 dias de armazenamento.

Os melhores resultados obtidos para essa estirpe foram para as amostras contendo 2% de teor de EPS e para as misturas ternárias, em ambas, a população alcançou cerca de  $10^8$  ufc/mL aos 120 dias de armazenamento.

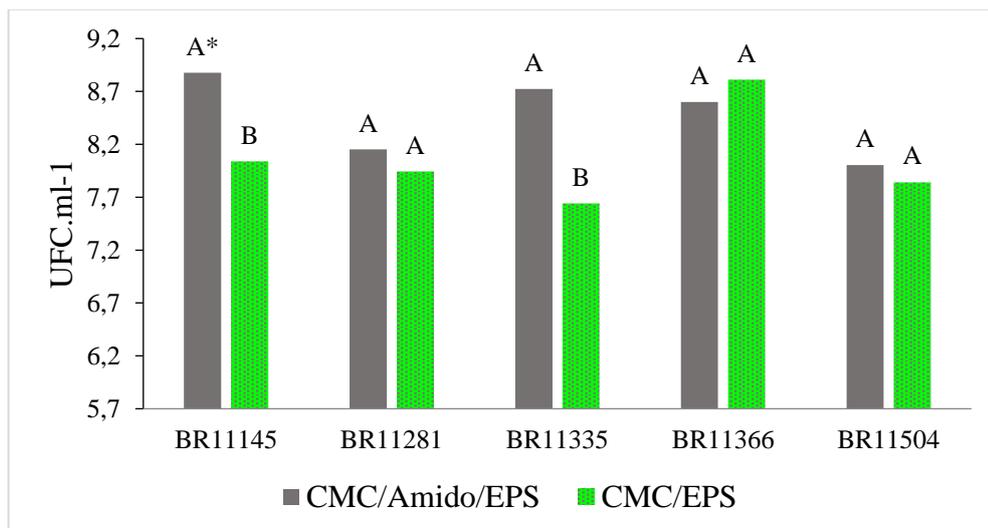
Para a estirpe de *Nitrospirillum amazonense* (BR 11145), a formulação que apresentou a melhor sobrevivência foi aquela contendo 0,5% de EPS. Em relação as composições inoculadas com a estirpe *Parabulkuholderia tropica* (BR 11366), os melhores resultados de sobrevivência foram obtidos para mistura ternária contendo amido e 1% de EPS ( $10^8$ .ufc/mL) e entre as amostras CMC/EPS, o melhor resultado foi alcançado com 2% EPS na mistura.

Para a estirpe *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BR 11504), o melhor resultado foi obtido com 0,5%, de EPS ( $10^8$  UFC/mL) e também para mistura ternária contendo 1% de EPS ( $10^8$  UFC/mL).

Por outro lado, células da estirpe bacteriana de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11281) não sobreviveram durante o período de armazenamento avaliado para as outras bactérias, sendo que não foi possível a sua detecção após dois meses de armazenamento. Entretanto, aos dois meses de armazenamento, o melhor resultado foi obtido para a composição contendo 2% de EPS e para mistura ternária (CMC/Amido/EPS) contendo 1% de EPS.

No trabalho desenvolvido por SOUSA (2017) usando veículo polimérico à base de CMC e EPS, a estirpe BR 3267 de *Bradyrhizobium yuanmingense*, conseguiu alcançar 120 dias com viabilidade celular entre  $10^8$  e  $10^9$ UFC/mL. Rhor (2007) mostrou que misturas CMC/amido apresentaram viabilidade celular similares às obtidas com os inoculantes turfosos. A mistura EPS/Amido formulada por Coutinho (2013) mostrou ser capaz de manter a sobrevivência da estirpe de *Bradyrhizobium yuanmingense* num período de 12 semanas (84 dias) com uma população de até  $10^8$ , resultados próximos aos encontrados pela turfa no mesmo período.

Foi realizada uma análise utilizando a viabilidade celular e comparando as estirpes formuladas com os melhores veículos poliméricos CMC/EPS e na formulação CMC/amido/EPS, figuras 4 e 5, que se referem às leituras de 60 e 120 dias, respectivamente.

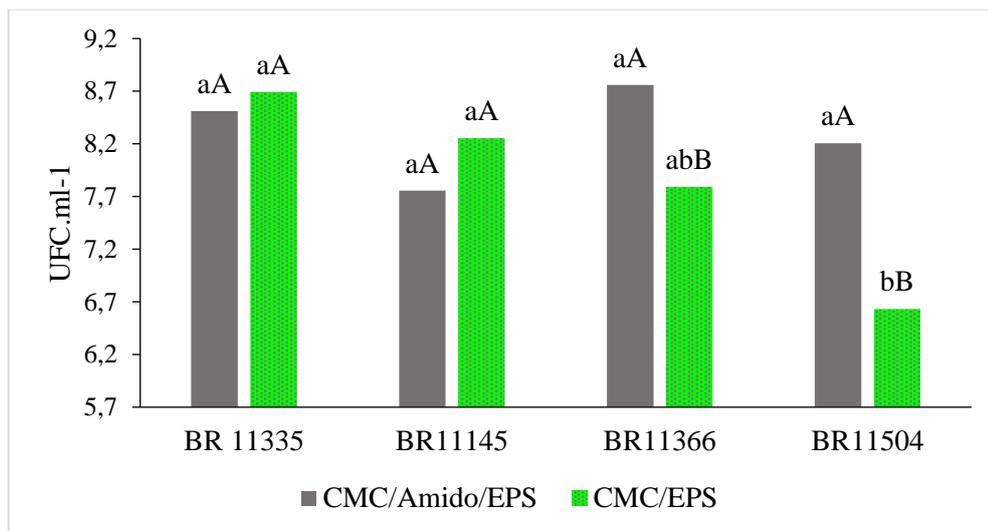


**Figura 4:** Avaliação da manutenção das estirpes bacterianas nas duas formulações com 2 meses de armazenamento.

\*Letras distintas para cada estirpe diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, exceto \*:  $p=0,082$ . Médias de 2 repetições.

Dois das estirpes avaliadas, BR 11145 e BR 11335, as melhores concentrações foram alcançadas com o veículo CMC/amido/EPS, e para as demais não houve diferença significativa durante 60 dias de armazenamento. De acordo com a RELARE um bom veículo de inoculação deverá ser capaz de manter a viabilidade celular em torno de  $10^8$ , assim sendo para todas as estirpes bacterianas, a formulação CMC/Amido/EPS tem potencial como veículo de inoculação para as estirpes BR 11145 e BR 11335 durante um período de até 2 meses de armazenamento. A estirpe BR 11366 manteve viabilidade celular acima de  $10^8$  UFC ml<sup>-1</sup> com ambas as formulações. Já com a formulação CMC/EPS, verificaram-se diferenças acentuadas quando comparadas as estirpes entre si, não conseguiu manter as unidades formadoras de colônias exigidas pela RELARE para todas as estirpes bacterianas, satisfazendo essa exigência apenas para as estirpes da BR 11366 e BR 11145, sendo que os restantes ficaram bem próximos do valor exigido.

A figura 5 retrata a comparação entre o veículo composto por CMC e EPS e o veículo composto por CMC / Amido / EPS (1%) após quatro meses de armazenamento para cada estirpe bacteriana.



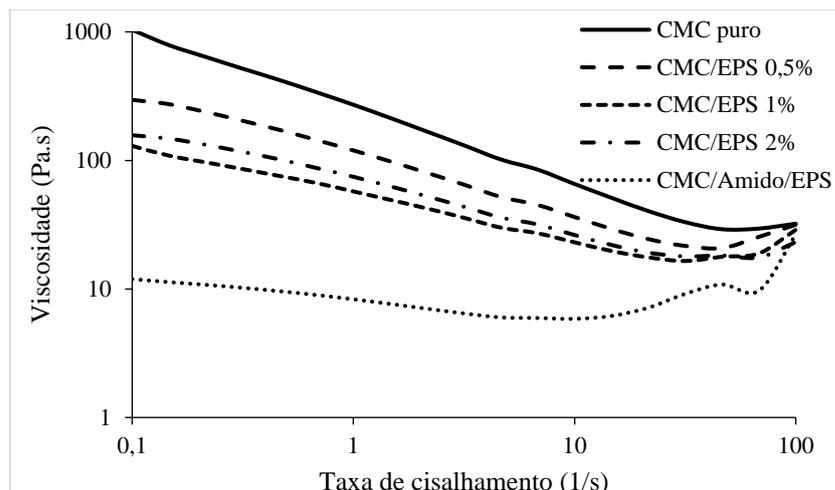
**Figura 5:** Avaliação da manutenção das estirpes bacterianas nas duas formulações com 4 meses de armazenamento.

Analisando a figura 5, observa-se que ao fim de 4 meses de armazenamento, a formulação de CMC/Amido/EPS obteve os melhores resultados quanto à sobrevivência de células para as estirpes de BR 11366 e BR 11504.

#### 6.4 Avaliação das Propriedades Reológicas dos Veículos de Inoculação

A figura 6 mostra o efeito da adição de EPS na viscosidade em função da taxa de cisalhamento. Observa-se que todas as misturas apresentaram comportamento de fluido pseudoplástico, diminuição da viscosidade com o aumento da taxa cisalhamento. Este comportamento, segundo Santos (2010) é esperado em soluções poliméricas de polissacarídeos microbianos. Em baixas taxas de cisalhamento, as misturas poliméricas, mantêm as suas cadeias macromoleculares noveladas, resultando uma maior resistência inicial ao fluxo. Com o aumento do cisalhamento, os polímeros sofrem maior deformação alinhamento suas cadeias na direção do fluxo, ocasionando a diminuição da viscosidade.

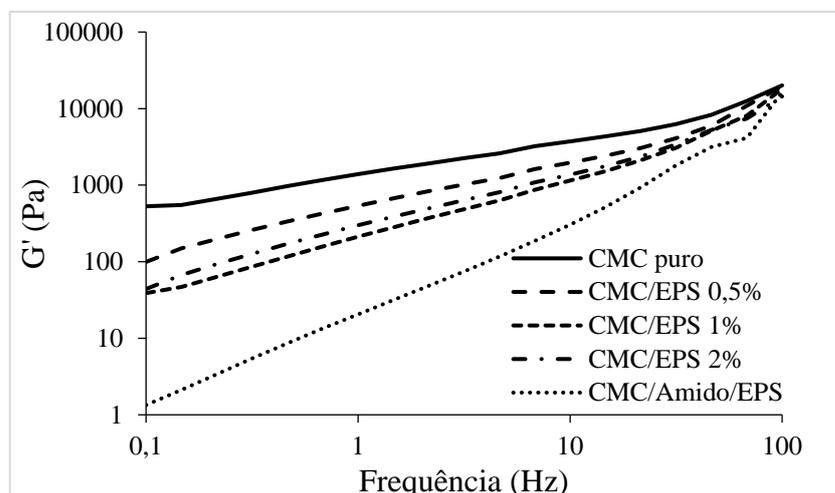
O CMC puro apresenta maior viscosidade devido as fortes interações entre as cadeias poliméricas o que lhe confere uma estrutura gelificada. Para mistura CMC/EPS, a adição de 0,5% de EPS já é suficiente para promover uma diminuição da viscosidade da mistura, o que acontece com o aumento da quantidade de EPS. A menor viscosidade foi obtida com a mistura ternária contendo 1% de EPS (CMC/Amido/EPS), sendo que esse fato pode ser atribuído a presença do amido na mistura. Estudos reológicos envolvendo a mistura CMC/Amido mostraram que a viscosidade diminui com o aumento da quantidade de amido na mistura. Nesse caso, a diminuição da viscosidade foi atribuída a diminuição interação intermoleculares da CMC promovida pelo amido (RHOR, 2007).



**Figura 6:** Variação da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento para as misturas CMC/eps e CMC/Amido/EPS.

Relacionando o comportamento da viscosidade das amostras com os dados de viabilidade celular, constata-se que as formulações menos viscosas, no caso CMC/eps 2% e CMC/Amido/EPS a 1%, foram aquelas que apresentaram melhores resultados de sobrevivência para as estirpes BR 11366, BR 11335 e BR 11281.

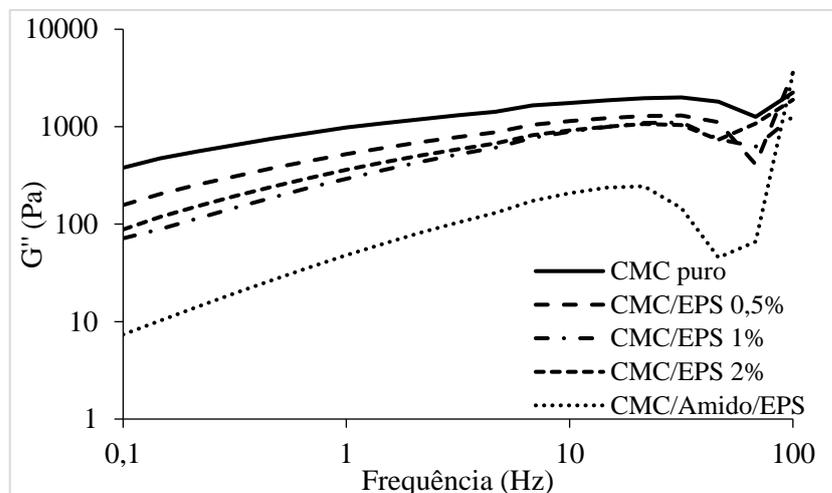
A figura 7 fornece informações sobre o comportamento elástico das misturas em função frequência nos testes oscilatórios. É interessante observar que o módulo elástico ( $G'$ ) diminui com o aumento do teor de eps, sendo o menor valor alcançado para mistura ternária CMC/Amido/EPS. Nota-se que os valores dos módulos elásticos das misturas CMC/eps e CMC/Amido/EPS tendem a um mesmo valor a altas frequências. Este resultado foi também observado por Sousa (2017) no veículo desenvolvido à base de CMC e eps cultivado em 150 mL de meio fermentativo.



**Figura 7:** Comportamento do módulo elástico ( $G'$ ) em função da frequência para as misturas CMC/eps e CMC/Amido/EPS.

A figura 8 relaciona o comportamento viscoso, expresso pelo módulo viscoso com a varredura de frequência em ensaios oscilatório. O módulo viscoso expressa as perdas de energia de um material quando sujeito a taxas de cisalhamento. O aumento da quantidade de eps reduz o módulo  $G''$  tornando a mistura com comportamento cada vez mais viscoso. Correlacionando os resultados de sobrevivência celular com os resultados de reologia, fica evidenciado que o

aumento do teor de EPS aumenta a sobrevivência das estirpes bacterianas, enquanto que a viscosidade,  $G'$  e  $G''$  diminuem.

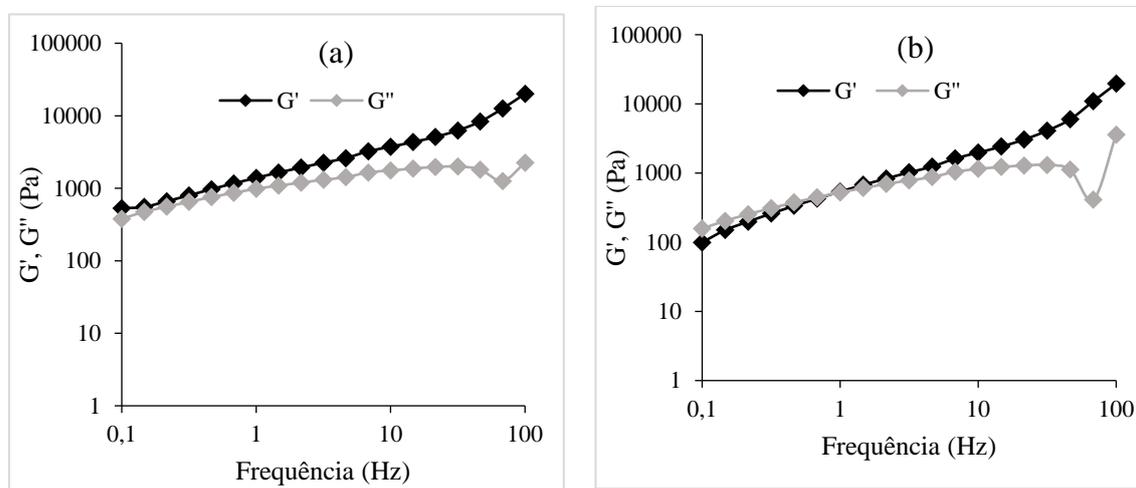


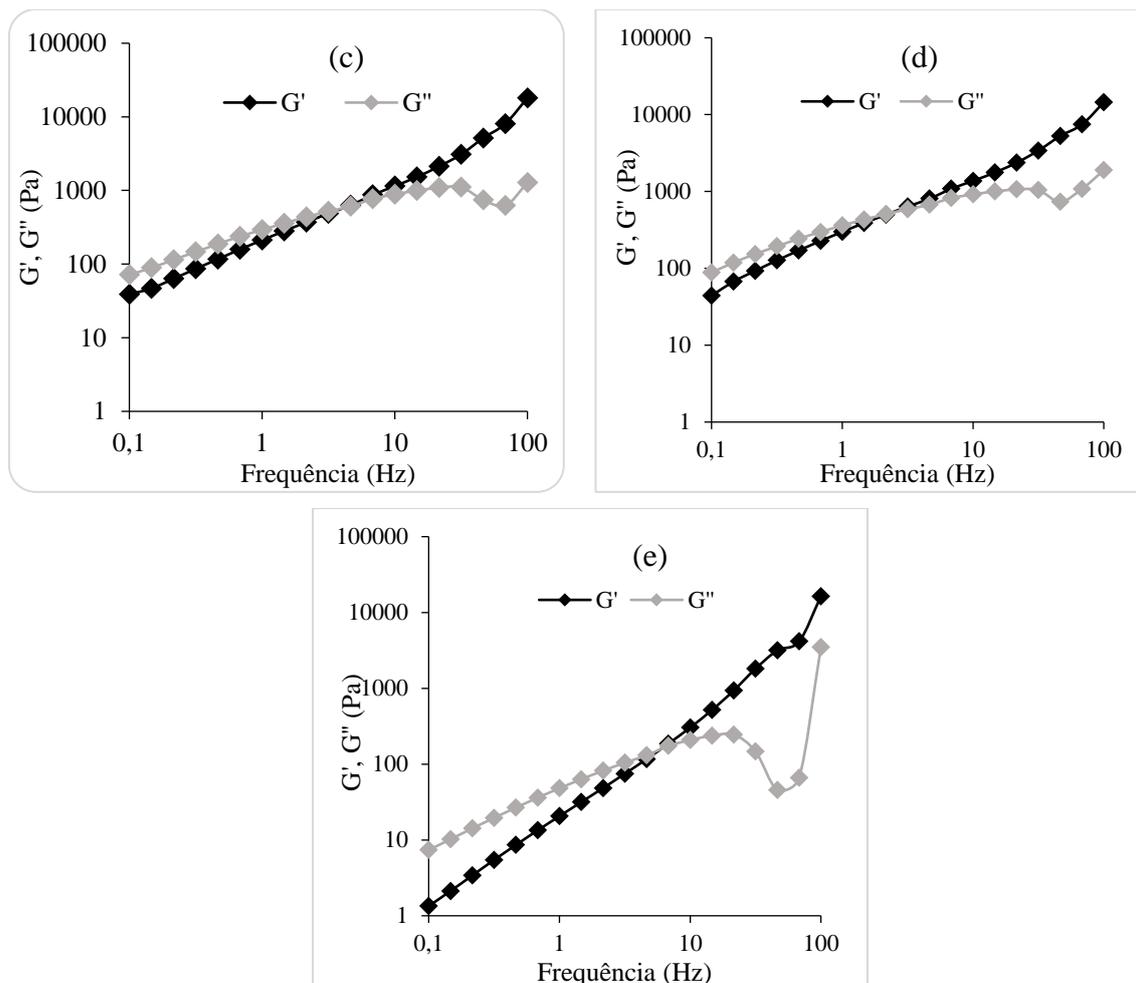
**Figura 8:** Comportamento do módulo viscoso ( $G''$ ) em função da frequência para as misturas CMC/EPS e CMC/Amido/EPS.

O comportamento do módulo elástico ( $G'$ ) e do módulo viscoso ( $G''$ ) encontra-se expressa na figura 9 em que foi avaliado o momento que se registra a inversão de comportamento das amostras, ponto esse conhecido por *crossover* em que os módulos se igualam ( $G'=G''$ ). Esse ponto fornece informações qualitativas quanto a estabilidade dimensional das misturas, separação de fases, quando submetidas a elevadas deformações. Um resultado que permite tecer consideração a respeito das interações intermoleculares.

Na figura 9 (a) observa-se que a amostra de CMC puro tem um comportamento predominantemente elástico em faixa de varredura de frequência estudada. Esse comportamento é típico de materiais com características de gel, presença de fortes interações intermoleculares. Resultado semelhante foi observado por RHOR (2007).

No que se refere as misturas CMC/EPS, figuras 9 (b-d), dois comportamentos foram observados: o primeiro, predominante viscoso a baixas frequências e o segundo, predominantemente elástico a frequências mais elevadas. Esse resultado pode ser atribuído, como uma consequência das interações entre as moléculas de EPS e de CMC, uma vez que essas interações são mais fracas do que as estabelecidas entre as moléculas de CMC. A formulação de CMC/Amido/EPS, figura 9 (e), observou-se uma predominância do comportamento viscoso.





**Figura 9:** Comportamento do módulo elástico ( $G'$ ) e viscoso ( $G''$ ) em função da frequência para as misturas CMC puro (a), CMC/EPS 0,5% (b), 1% (c) e 2% (d) e CMC/Amido/EPS (e).

O aumentando do teor de EPS nas misturas provoca um deslocamento do crossover para frequências mais altas. Esse resultado sugere a presença de interação entre as macromoléculas de CMC/EPS.

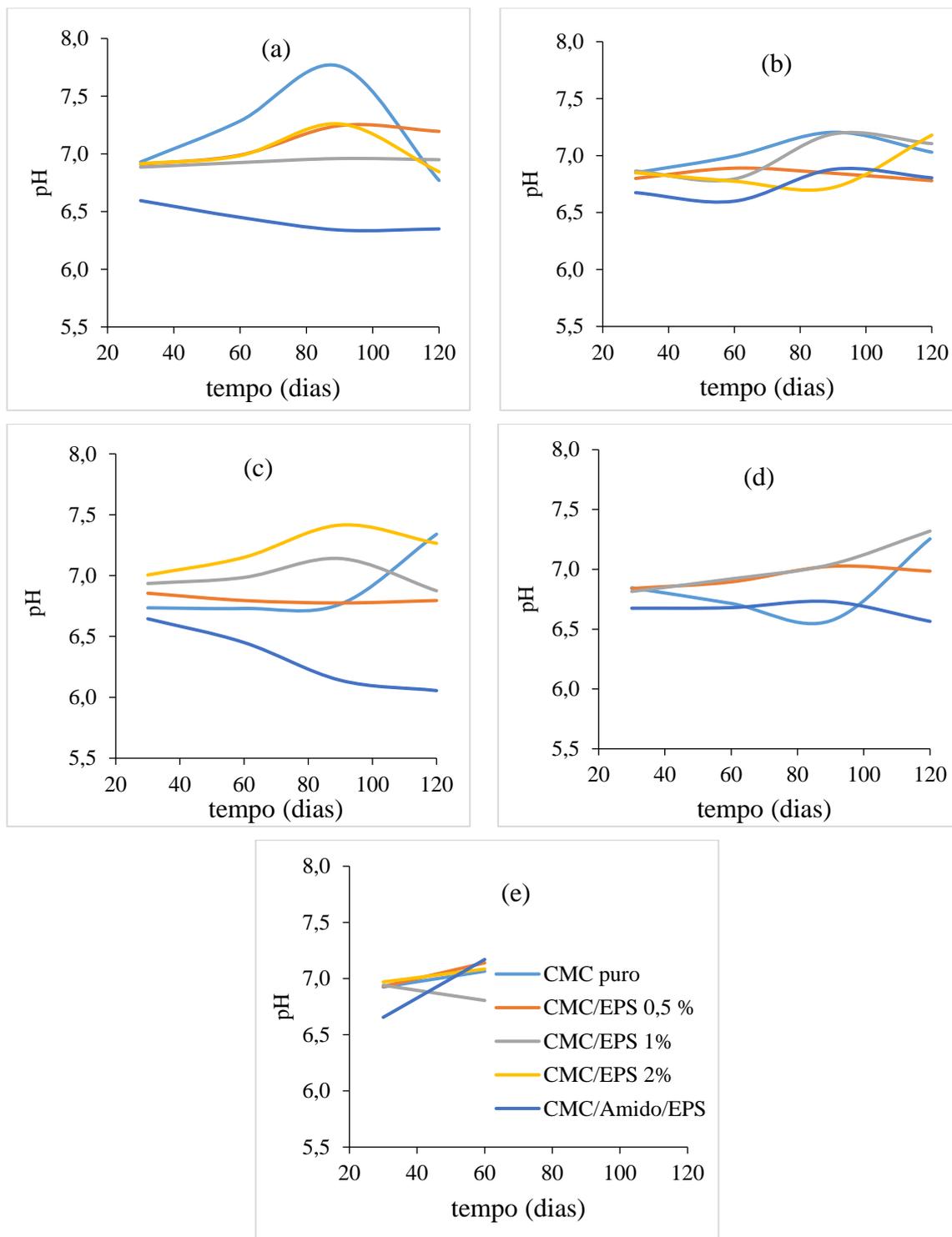
Resultados semelhantes foram obtidos por Sousa (2017) na mistura CMC/EPS, por Freitas (2015) na mistura CMC/Espirulina e por Rhor (2007) na mistura CMC/Amido, em que foi observado um deslocamento do crossover para frequências mais elevadas com o aumentando as concentrações de EPS.

## 6.5 Análise de Variação de pH

A análise de pH do veículo de inoculação com o tempo de armazenamento é um parâmetro que permite relacionar as condições do meio com a manutenção das células bacterianas. Os valores de pH das amostras são apresentados figura 10 a-e.

Os resultados mostram que os valores de pH dos veículos de inoculação mantiveram-se entre 6 e 8, que para estirpes bacterianas de cana-de-açúcar, valores próximos aos próprios para o cultivo destas estirpes.

Favero e colaboradores (2015) relataram que pH elevados em inoculantes à base de CMC e amido, na faixa de 10 a 11, influenciam negativamente na sobrevivência de estirpes bacterianas, sendo que o pH ótimo dessas estirpes bacterianas varia de 5,8 a 6,8, apesar se serem resistentes em valores de pH diferentes destes, em pH muito baixo ou ate muito elevado, nestas condições comprometem a sobrevivência das bactérias.



**Figura 10:** Variação do pH em relação ao tempo das amostras de inoculantes à base de CMC/EPS e CMC/Amido/EPS para as 5 estirpes bacterianas: (a) estirpe BR 11335; (b) Estirpe BR 11504; (c) Estirpe 11145; (d) Estirpe BR 11366 e (e) Estirpe BR11281.

### 6.6 Desempenho de Mini-Toletes Inoculados com Formulações Poliméricas Contendo Cinco Estirpes Pré-Selecionadas de Bactérias Diazotróficas Armazenadas Por 60 Dias à Temperatura Ambiente.

Mini-toletes de cana-de-açúcar variedade RB 867515 foram inoculados com cinco estirpes de bactérias diazotróficas e transferidos para tubetes preenchidos por substrato

desinfestado mantidos em casa de vegetação. Foram testados dois tipos de formulações poliméricas, CMC/EPS e CMC/Amido/EPS, e um inoculante turfoso já usado em experimentos anteriores.

Para o experimento de casa de vegetação foram selecionadas as concentrações de EPS que proporcionou a melhor manutenção das estirpes bacterianas no final de dois meses de armazenamento. Assim para o inoculante à base de CMC/EPS foram selecionados para cada estirpe a melhor concentração e calculado a quantidade necessária de modo que a população microbiana fosse de  $10^8$  UFC, quantidade recomendada RELARE, de acordo com a tabela 14.

**Tabela 14:** Formulações de CMC/EPS selecionadas para experimento de casa de vegetação.

Estirpe	Teor de EPS	Quantidade necessária (g)
BR 11145	0,5 %	3,80
BR 11281	2,0 %	10,00
BR 11335	0,5 %	5,36
BR 11366	2,0 %	0,68
BR 11504	2,0 %	3,91

Para o inoculante à base de CMC/Amido/EPS, os teores das formulações foram calculados considerando a quantidade de cada estirpe bacteriana de acordo com os dados de viabilidade celular. A tabela 15 apresenta as quantidades para cada estirpe bacteriana.

**Tabela 15:** Formulações de CMC/Amido/EPS selecionadas para experimento de casa de vegetação.

Estirpe	Quantidade necessária (g)
BR 11145	0,93
BR 11281	10,00
BR 11335	1,32
BR 11366	1,73
BR 11504	5,37

### 6.6.1 Germinação dos mini-toletes de cana-de-açúcar inoculados com estirpes diazotróficas pré-selecionadas

Foram determinados o número e a velocidade de germinação dos mini-toletes com as observações obtidas de 4 a 13 dias após o plantio (Tabelas 16 e 17) provenientes de 20 mini-toletes.

**Tabela 16:** Índice de velocidade de germinação (IVG) dos mini-toletes de cana-de-açúcar.

Tratamentos	IVG	
	Sem Fungicida	Com Fungicida
Controle CMC/amido/EPS	2,480	2,231
Controle CMC/EPS	2,380	1,903
Controle turfa	2,364	2,587
Inoculante CMC/amido/EPS	2,482	1,997
Inoculante CMC/EPS	1,764	1,672
Inoculante turfoso	2,019	2,346
Tolete	1,897	2,196

**Tabela 17:** Número de mini-toletes germinadas 14 dias após plantio.

Tratamentos	Número de mini-toletes germinadas	
	Sem Fungicida	Com Fungicida
Controle CMC/amido/EPS	17	16
Controle CMC/EPS	17	14
Controle turfa	15	20
Inoculante CMC/amido/EPS	16	15
Inoculante CMC/EPS	12	12
Inoculante turfoso	14	14
Tolete	13	14

O tratamento com fungicida seguido da aplicação dos inoculantes com as bactérias diazotróficas mostra uma tendência de redução no índice de velocidade de germinação (IVG), de 2,29 para 1,90 com a formulação à base de CMC/AM/EPS e de 2,48 para 1,72 com a formulação contendo CMC/EPS, cerca de 17 e 30%, respectivamente. Uma tendência similar pode ser observada nos dados que contabilizaram o total de mini-toletes germinados para cada tratamento. Por outro lado, na ausência do fungicida, mas com a aplicação do inoculante, os valores de IVG e de número de mini-toletes germinados são semelhantes aos observados na ausência de fungicida e do inoculante. Esses dados sugerem que o fungicida exerce um efeito negativo sobre a germinação do mini-tolete que é maximizado na presença da inoculação. Ambos os veículos poliméricos testados mostraram uma tendência na reversão desse efeito, o que não foi observado para a turfa.

O uso de fungicida durante a produção de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar tem sido frequentemente recomendado (FERREIRA et al, 2008). Veículos poliméricos contendo EPS podem atuar como um protetor contra o efeito negativo sobre a germinação dos mini-toletes.

#### **6.6.2 Desempenho de mudas pré-brotadas inoculadas com cinco estirpes de bactérias diazotróficas cultivadas em tubetes por 40 dias mantidos em casa de vegetação**

O experimento em casa-de-vegetação de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar foi avaliado quanto ao diâmetro de caule, tamanho de parte aérea, volume de raiz e massas secas de parte aérea e raiz.

Será analisado inicialmente o efeito da inoculação com formulações poliméricas e turfosa das cinco estirpes diazotróficas em mini toletes que receberam o tratamento com fungicida.

A tabela 18 apresenta o diâmetro da parte aérea aos 27 e 40 DAP quanto ao efeito dos veículos utilizados, inoculados e controle negativo.

**Tabela 18:** Diâmetro da parte aérea aos 27 e 40 DAP para mudas pré-brotadas (MPB) de cana-de-açúcar inoculadas com cinco estirpes de bactérias diazotróficas: BR 11145, BR 11281, BR 11335, BR 11366 e BR 11504; formuladas nos veículos CMC/Amido/EPS, CMC/EPS e turfa; e, controle com aplicação dos veículos citados; mini-toletes cultivados em condições de casa de vegetação em tubetes com substrato Carolina após tratamento com fungicida comercial (0,1 % por 3 minutos)\*.

Veículo de inoculação	Diâmetro da parte aérea aos 27 DAP (mm)		Diâmetro da parte aérea aos 40 DAP (mm)	
	Inoculante	Controle	Inoculante	Controle
CMC/Amido/EPS	7,84 aA	7,6 bA	8,34 aA	8,16 bA
CMC/EPS	7,92 aB	8,67 aA	8,45 aB	8,98 aA
turfa	7,29 aA	7,17 bA	8,26 aA	8,39 bA
média	7,68 A	7,81 A	8,35 A	8,51 A

Letras distintas dentro de cada nível, minúsculas nas colunas, e maiúsculas nas linhas para cada variável diferem entre si pelos testes F e Tukey, a 5% de probabilidade. Médias de 8 repetições.

\* p.a. piraclostrobina.

A avaliação não revelou diferenças significativas entre as formulações inoculadas e controles tanto para 27 quanto para 40 DAP na média geral do diâmetro da parte aérea.

Analisando a tabela 18 observa-se que no geral, se verificou um aumento de cerca de 10% nas medidas de diâmetro de caule dos 27 aos 40 DAP. Não foi observado efeito positivo decorrente da inoculação com qualquer das formulações. Esses resultados podem ser decorrentes de efeito do fungicida sobre as bactérias diazotróficas. Já nos controles, quando os mini toletes foram tratados apenas com os veículos da formulação, a mistura CMC/EPS resultou em maiores valores quando comparado com os demais veículos, CMC/Amido/EPS e turfa.

Quando comparadas ao inoculante turfoso, o inoculante polimérico à base de CMC/EPS apresentou maiores valores para o diâmetro da parte aérea nas mudas de cana-de-açúcar. Este resultado é positivo, sendo que o principal objetivo da pesquisa é a obtenção de um inoculante polimérico que possa substituir a turfa como veículo de inoculação.

A tabela 19 apresenta os resultados obtidos da altura e matéria seca da parte aérea (MSPA) relativamente ao efeito dos veículos de inoculação testados quanto à presença das bactérias diazotróficas inoculados e controles negativos (sem as bactérias diazotróficas).

**Tabela 19:** Altura e matéria seca de parte aérea (MSPA) aos 40 DAP em mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar inoculadas com cinco estirpes de bactérias diazotróficas: BR 11145, BR 11281, BR 11335, BR 11366 e BR 11504; formuladas nos veículos CMC/Amido/EPS, CMC/EPS e turfa; e, controle com aplicação dos veículos citados; mini-toletes cultivados em condições de casa de vegetação em tubetes com substrato Carolina após tratamento com fungicida comercial (0,1 % por 3 minutos)\*<sup>a</sup>

Veículo de inoculação	Altura da MPB (cm)		MSPA (g)	
	inoculante	controle	inoculante* <sup>1</sup>	controle
CMC/Amido/EPS	61,55 bB	70,34 aA	2,15 aB* <sup>2</sup>	2,37 bA
CMC/EPS	67,41 bA	67,37 aA	2,33 aB* <sup>3</sup>	2,59 aA
turfa	74,99 aA	72,39 aA	2,31 aA	2,32 bA
média	67,98 A	70,03 A	2,27 B	2,43 A

Letras distintas dentro de cada nível, minúsculas nas colunas, e maiúsculas nas linhas para cada variável diferem entre si pelos testes F e Tukey, a 5% de probabilidade, exceto \*<sup>1</sup> p=0,097; \*<sup>2</sup> p=0,093 \*<sup>3</sup> p=0,053. Médias de 8 repetições.

\* p.a. piraclostrobina.

Analisando a tabela 19, verifica-se que a inoculação das MPB pelas bactérias diazotróficas não teve influência positiva na média geral da altura e MSPA das MPB e nem para cada formulação, conforme observado nas análises de diâmetro da parte aérea aos 27 e 40 DAP.

As MPB tratadas com os veículos poliméricas CMC/amido/EPS e CMC/EPS, sem estirpes bacterianas, apresentaram maiores valores quanto à MSPA, enquanto o veículo CMC/Amido/EPS proporcionou um acréscimo também na altura das plantas. Semelhante ao observado com a avaliação do diâmetro da parte aérea, os veículos poliméricos exercem um efeito de promoção sobre as MPB que não se expressão na presença das bactérias diazotróficas. É possível que o efeito positivo possa ser devido ao EPS, uma vez que, o biopolímero por si só possui características como biofertilizante, no biocontrole e indução de resistência nas plantas, o que pode ter garantido proteção contra microrganismos patogênicos e influenciado no desenvolvimento das MPB.

Os resultados referentes à matéria seca da raiz (MSR) e ao volume de raiz, são apresentados na tabela 20.

**Tabela 20:** Matéria seca de raiz (MSR) e volume de raiz aos 40 DAP em mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar inoculadas com cinco estirpes de bactérias diazotróficas: BR 11145, BR 11281, BR 11335, BR 11366 e BR 11504; formuladas nos veículos CMC/Amido/EPS, CMC/EPS e e turfa; e, controle com aplicação dos veículos citados; mini-toletes cultivados em condições de casa de vegetação em tubetes com substrato Carolina após tratamento com fungicida comercial (0,1 % por 3 minutos)\*.

Veículo de inoculação	MSR (g)		Volume raiz (mL)	
	Inoculante	Controle	Inoculante	Controle
CMC/Amido/EPS	1,18 aA	1,18 aA	11,06 aA	11,62 aA
CMC/EPS	1,13 aA	1,18 aA	10,5 aB	13,31 aA
turfa	0,74 bA	0,72 bA	7,87 bA	7,62 bA
média	1,01 A	1,03 A	9,81 A	10,85 A

Letras distintas dentro de cada nível, minúsculas nas colunas, e maiúsculas nas linhas para cada variável diferem entre si pelos testes F e Tukey, a 5% de probabilidade. Médias de 8 repetições.

\* p.a. piraclostrobina.

Analisando a média geral, da tabela 20, verifica-se que tanto a MSR quanto o volume de raiz não responderam positivamente à inoculação, fato também verificado quando comparadas as diferentes formulações inoculadas com os seus respectivos controles negativos. De forma semelhante aos parâmetros analisados anteriormente pode-se prever um efeito negativo do fungicida na atividade das bactérias diazotróficas uma vez que, os valores registrado no volume de raiz de MPB tratadas com veículo CMC/EPS supera o registrado nas MPB que receberam a formulação polimérica.

As MPB tratadas com o veículo turfoso com ou sem bactéria apresentaram uma redução de cerca de um terço na MSR e no volume de raiz em relação aquelas que receberam os veículos poliméricos. A redução de MSR e volume de raiz é uma característica que pode reduzir o sucesso do transplântio das mudas para o campo.

O veículo CMC/EPS na ausência de bactéria proporcionou um acréscimo estaticamente comprovado, no volume das raízes em comparação com os demais veículos, o que não foi observado para MSR. O aumento de volume de raízes não acompanhado do aumento de MSR,

pode ser associado ao aumento de raízes finas, o que pode representar uma vantagem para a MPB relacionada a maior absorção de água e assimilação de nutrientes, quando comparada ao veículo CMC/amido/EPS.

De modo a avaliar o efeito do fungicida na MSR e volume de raiz das MPB, a tabela 21 apresenta os resultados referentes ao MSR e volume de raiz aos 40 DAP.

**Tabela 21:** Matéria seca de raiz (MSR) e volume de raiz aos 40 DAP em mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar tratadas com veículos de inoculação CMC/Amido/EPS, CMC/EPS, turfa e controle (sem tratamento) e cultivadas em condições de casa de vegetação em tubetes com substrato Carolina com e sem tratamento dos mini-toletes com fungicida comercial (0,1 % por 3 minutos)\*.

Veículo de inoculação	MSR		Volume raiz	
	com fungicida	sem fungicida	com fungicida	sem fungicida
CMC/Amido/EPS	1,18 aA	1,33aA	11,62 abA	12,25 aA
CMC/EPS	1,18 aA	1,02 bB	13,31 aA	11,00 aB
turfa	0,72 bB	1,345 aA	7,62 cB	13,00 aA
Controle (tolete sem tratamento)	1,23 aA	1,19 abA	10,69 bA	11,50 aA
média	1,08 B	1,22 A	10,81B	11,94 A

Letras distintas dentro de cada nível, minúsculas nas colunas, e maiúsculas nas linhas para cada variável diferem entre si pelos testes F e Tukey, a 5% de probabilidade. Médias de 8 repetições.

\* p.a. piraclostrobina

Na tabela 21, observa-se nas médias gerais que a MSR e o volume de raiz responderam negativamente ao tratamento fúngico quando analisadas as mudas que não receberam o inoculante e os toletes não tratados que representam o controle.

Como visto na tabela anterior, os toletes tratados com turfa apresentaram cerca de 60% da MSR e 70% do volume de raiz, valores significativamente menores do que o controle não tratado. Na presença do fungicida, o tratamento com turfa se iguala aos demais, sugerindo uma possível influência negativa de populações fúngicas presentes nesse substrato.

O veículo polimérico CMC/Amido/EPS registrou acréscimos na MSR e no volume de raiz na ausência do tratamento fúngico.

## 7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos durante a realização dessa dissertação,

As misturas CMC/EPS e CMC/amido/EPS mantiveram a viabilidade celular durante o período de armazenamento de 4 meses, excetuando a estirpe bacteriana de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11281), o que se sugere uma otimização das condições de crescimento dessa estirpe.

As alterações nos valores de pH das formulações poliméricas observadas não estão correlacionadas com a viabilidade das células bacterianas e, também, não se observou separação de fase demonstrando a estabilidade dinâmica das formulações propostas.

A adição de um aditivo (EPS e/ou amido) ao CMC puro foi caracterizado por decréscimos nas propriedades reológicas, sendo que com o aumento de teor do aditivo o decréscimo é mais acentuado, denotando assim as interações entre o CMC e o aditivo e o enfraquecimento das interações intramoleculares do CMC.

Os resultados reológicos, quanto à viscosidade, módulos elástico e viscoso e a análise do crossover corroboram com os dados de viabilidade celular em que, as amostras contendo menor viscosidade, menor módulo elástico e viscoso e cujo crossover ocorre a frequências mais elevadas foram capazes de manter o mais elevado número de células bacterianas por período de tempo mais longo.

Os dados experimentais para a brotação dos mini toletes, diâmetro da parte aérea, altura de parte aérea, volume de raiz e massas secas da parte aérea e da raiz mostraram que ocorreu uma resposta positiva das mudas de cana-de-açúcar quando submetidas ao tratamento com veículo polimérico (controle negativo), igualando ou mesmo sendo superior à turfa em alguns desses parâmetros, tendo o veículo CMC/EPS registado efeito positivo nas raízes, sugerindo aumento de raízes finas. Se verificou um efeito inibitório da turfa na presença do fungicida sobre as MPB, principalmente sobre as raízes (MSR e volume). Nas condições do experimento realizado, não houve efeito da inoculação talvez em função da aplicação do fungicida o que deve ser objeto de estudos futuros.

## 8 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como sugestões para trabalhos futuros:

- Avaliar o efeito de outras variáveis, como diferentes meios com outras fontes de carbono, e condições de cultivo fermentativo, como temperatura e agitação, para obtenção de um melhor panorama da biossíntese do biopolímero;
- Investigar a composição de carboidratos presentes no EPS produzido;
- Avaliar propriedades como a temperatura de degradação, as propriedades reológicas e os grupos funcionais em condições de cultivo diferentes;
- Aperfeiçoar o crescimento de estirpe BR 11281 em meio polimérico na presença de EPS;
- Efectuar novos estudos em MPB de cana-de-açúcar em casa-de-vegetação de forma a verificar a influencia das BPCVs no desenvolvimento das plantas;
- Montar experimentos em casa de vegetação de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar avaliando o efeito do EPS, experimentos na presença e/ou ausência de EPS;
- Avaliar em condições de campo o potencial das formulações desenvolvidas como inoculantes para o cultivo de cana-de-açúcar.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHEMAD, M.; MALIK, A. Bioaccumulation of heavy metals by zinc resistant bacteria isolated from agricultural soils irrigated with wastewater. **Bacteriol. J.**, v. 2, p.12–21, 2011.

AMORIM, A.A.P.O. **Caracterização reológica da mistura de carboximetilcelulose com amido de milho e avaliação da microestrutura para estudo de viabilidade em aplicações tecnológicas**. TCC, Graduação em Tecnologia de Polímeros, Centro Universitário Estadual Zona Oeste, Rio de Janeiro, 2012.

ASSIS, D.J. et al. Simultaneous Biosynthesis of Polyhydroxyalkanoates and Extracellular Polymeric Substance (EPS) from Crude Glycerol from Biodiesel Production by Different Bacterial Strains. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 180, p. 1110–1127, 2016.

ARRUDA, A.M. **Avaliação de cultivares de feijão caupi quanto à eficiência para fixação biológica de nitrogênio com estirpes isoladas de solos do semiárido de Pernambuco** Dissertação de mestrado, Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2016.

ARUN, J.; SELVAKUMAR, S.; SATHISHKUMAR, R.; MOOVENDHAN, M.; ANANTHAN, G.; MARUTHIAH, T.; PALAVESAM, A. In vitro antioxidant activities of an exopolysaccharide from a salt pan bacterium *Halolactibacillus Miurensis*. **Carbohydrate Polymers**, v. 155, p. 400–406, 2017.

ARUN, J.; SATHISHKUMAR, R.; MUNEESWARAN, T. Optimization of extracellular polysaccharide production in *Halobacillus trueperi* AJSK using response surface methodology. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, p. 4449-4457, 2014.

BALDANI, J.I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M.; DOBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*, inclusion of “*Pseudomonas*” *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov. and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, p. 802-810, 1996.

BARBOSA, A.M.; CUNHA, P.D.T.; PIGATTO, M.M.; SILVA, M.L.C. Produção e Aplicações de Exopolissacarídeos Fúngicos. **Ciências Exatas e Tecnológicas** 25(1): 29-42, 2004

BARBOSA, E.A.; PERIN, L.; REIS, V.M. Uso de diferentes fontes de carbono por estirpes de *Gluconacetobacter diazotrophicus* isoladas de cana-de-açúcar. **Pesq. agropec. bras**, Brasília, v.41, p. 827-833, maio 2006.

BARRETO, M.C.S. **Inovação tecnológica baseada na produção de biopolímero com viabilidade para inoculante rizobiano**. Dissertação (Mestrado, Ciências Biológicas), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008.

BASHAN, Y.; DE BASHAN, L. E.; PRABHU, S. R. Superior Polymeric Formulations and Emerging Innovative Products of Bacterial Inoculants for Sustainable of Bacterial Inoculants for Sustainable. In: SINGH, H. B.; SARMA, B. K.; KESWANI, C. **Agriculturally Important Microorganisms**. Singapore: Springer, p. 15-46, 2016.

BASHAN, Y. et al. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). **Plant and Soil**, v. 378, p. 1-33, May 2014.

BASHAN, Y.; GONZALES, L. E. Long-term survival of the plant-growth-promoting bacteria *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* in dry alginate inoculant. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, p. 262–266, 1999.

BERG, G. et al. Plant microbial diversity is suggested as the key to future biocontrol and health trends. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 93, 2017.

BHATTACHARYYA, P.N. and JHA D.K. Plant growth -promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World J. Microbiol. Biotechnol**, v. 28, p. 1327– 1350, 2012.

BEZAWADA, J. et al. Production of extracellular polymeric substances (EPS) by *Serratia sp.1* using wastewater sludge as raw material and flocculation activity of the EPS produced. **Journal of Environmental Management**, v. 128, p. 83-91, 2013.

BUENO, S.M.; GARCIA-CRUZ, C.H. Optimization of polysaccharides production by bacteria isolated from soil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 296-301, 2006.

CARVALHO, J.F. **Aprimoramento de veículo polimérico para inoculação de toletes de cana-de-açúcar com bactérias diazotróficas**. Tese (Doutorado em Fitotecnia), Departamento e Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, [S.l.]. em elaboração.

CASTELLANE, T.C.L.; LEMOS, E.G.M. Composição de exopolissacarídeos produzidos por estirpes de rizóbios cultivados em diferentes fontes de carbono. **Pesq. agropec. Bras.**, v. 42, p. 1503-1506, 2007.

CASTELLANE, T.C.L.; LEMOS, M.V.F.; LEMOS, E.G.M. Evaluation of the biotechnological potential of *Rhizobium tropici* strains for exopolysaccharide production. **Carbohydrate Polymers**, v. 111, p. 191–197, 2014.

CHEN, Y. et al. Structural characterization and antioxidant properties of an exopolysaccharide produced by the mangrove endophytic fungus *Aspergillus sp.* Y16. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 8179–8184, 2011.

COMTE, S.; GUIBAUD, G.; BAUDU, M. Relations between extraction protocols for activated sludge extracellular polymeric substances (EPS) and EPS complexation properties Part I. Comparison of the efficiency of eight EPS extraction methods. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 237–245, 2006.

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

COSTA, H.T. **Efeito do uso de inoculante e da adubação nitrogenada em soqueira de cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

COUTINHO, M.S. **Estudo reológico e da biocompatibilidade das misturas de CMC/Amido e CMC/EPS e seu uso como veículo de inoculação**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química, Tecnologia Química). Instituto de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013

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

DOGAN, N.M.; DOGANLI, G.A.; DOGAN, G.; BOZKAYA, O. Characterization of Extracellular Polysaccharides (EPS) Produced by Thermal Bacillus and Determination of Environmental Conditions Affecting Exopolysaccharide Production. **Int. J. Environ. Res.**, v. 9, p. 1107-1116, 2015.

DONOT, F.; FONTANA, A.; BACCOU, J.C.; SCHORR-GALINDO, S. Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. **Carbohydr. Polym.** V. 87, p. 951-962, 2012.

FAVERO, V.O. et al. **Efeito de diferentes amidos e concentrações de agente compatibilizante no pH de veículo polimérico**. SEMANA CIENTÍFICA JOHANNA DÖBEREINER (caderno de resumos), Seropédica, 2015.

FAVERO, V.O. **Desenvolvimento de formulações poliméricas para inoculação de feijão-caupi com a estirpe BR 3262 de *Bradyrhizobium parchyrrhizi***. Dissertação, Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica: UFRRJ. 2018.

FERNANDES, V.H. et al. Cultivo de *Azospirillum Amazonense* BR11145 Para Produção de Inoculantes Promotores de Crescimento Vegetal. **Rev. de Ci. Exatas**, v. 33, p. 87-97, 2014.

FERNANDES JÚNIOR, P. I. **Composições poliméricas a base de carboximetilcelulose (CMC) e amido como veículos de inoculação de rizóbio em leguminosas**. Dissertação, Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica: UFRRJ. 2006.

FERNANDES JÚNIOR, P.I. et al. Produção e comportamento reológico de exopolissacarídeos sintetizados por rizóbios isolados de guandu. **Pesq. agropec. bras.**, v. 45, p. 1465-1471, 2010.

FERNANDES JUNIOR, P.I.; OLIVEIRA, P.J.; RUMJANEK, N.G.; BODDEY, R.M.; XAVIER, G.R. Agronomic efficiency of a new rhizobial inoculant formulation for use in cowpea. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, p. 138-141, 2012.

FERREIRA, M.C. et al. Tratamento de toletes de cana-de-açúcar para o controle da podridão-abacaxi em pulverização conjugada ao plantio mecanizado. **Eng. Agríc., Jaboticabal**, v. 28, p. 263-273, 2008.

FINKEL, O. M. et al. Understanding and exploiting plant beneficial microbes. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 38, p. 155-163, 2017.

FREITAS, C. S. **Mistura polimérica spirulina/carboximetilcelulose como veículo de inoculação para estirpes de *Bradyrhizobium* sp. em feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)**. Dissertação de mestrado; Engenharia Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. [S.l.]. 2015.

FREITAS, F., ALVES, V. D., & REIS, M. A. M. Advances in bacterial exopolysaccharides: From production to biotechnological applications. **Trends Biotechnology**, v. 29, 388–398, 2011.

GOMES, R.P. et al. Produção de exopolissacarídeos a partir de bastonetes grampositivos isolados de contaminantes de cultura de tecido vegetal. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, v. 13, p. 1316-1328, 2016.

GUO, S. et al. Structural elucidation of the exopolysaccharide produced by fungus *Fusarium oxysporum* Y24-2. **Carbohydrate Research**, v. 365, p. 9-13, 2013.

HE, P.; GENG, L.; MAO, D.; XU, C. Production, characterization and antioxidant activity of exopolysaccharides from submerged culture of *Morchella crassipes*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, p. 1325–1332, 2012.

HERMANN, L.; LESUEUR, D. Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 97, p. 8859–8873, 2013.

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

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo**. Londrina: Embrapa Soja, 38 p. (Embrapa Soja. Documentos, 325), 2011.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção Agrícola Municipal, Culturas Temporárias e Permanentes. **IBGE**, 2012.

IMRAN, M.Y.M. et al. Statistical optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus plantarum* NTMI05 and NTMI20. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 93, p. 731–745, 2016.

JANCZAREK, M. et al. Production of exopolysaccharide by *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and its role in bacterial attachment and surface properties. **Plant Soil**, v. 388, p. 211–227, 2015.

JORUSZUK-OSÍNSKA, M. et al Extracellular polysaccharides from Ascomycota and Basidiomycota: production conditions, biochemical characteristics, and biological properties. **World J Microbial Biotechnol**, v. 31, p. 1823-1844, 2015.

JIAO, Y. et al. Characterization of Extracellular Polymeric Substances from Acidophilic Microbial Biofilms. **Applied and Environmental microbiology**, v. 76, p. 2916–2922, 2010.

JOHN, R.P.; TYAGI, R.D.; BRARI, S.K.; SURAMPALLI, R.Y.; PRÉVOST, D. Bio-encapsulation of microbial cells for targeted agricultural delivery. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 31, p. 211–226, 2011.

KONRAD, D. **Avaliação do tempo de armazenagem sobre a microbiota de inoculantes encapsulados**. Palotina, 2016

KUMAR, M.A.; ANANDAPANDIAN, K.T.K.; PARTHIBAN, K. Production and characterization of exopolysaccharides (EPS) from biofilm forming marine bacterium. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, p. 259-265, 2011.

LANGE, A.; MOREIRA, F. M. S. Detecção de *Azospirillum amazonense* em raízes e rizosfera de orchidaceae e de outras famílias vegetais. **R. Bras. Ci. Solo**, v. 26, p. 529-533, 2002.

LEO DANIEL, A.E. et al. Effect of Polymeric Additives, Adjuvants, Surfactants on Survival, Stability and Plant Growth Promoting Ability of Liquid Bioinoculants. **J Plant Physiol Pathol**, v. 1, 2013.

LIANG, H.; LI, W.; YANG, S.; DU, P. Extraction and structural characteristics of extracellular polymeric substances (EPS), pellets in autotrophic nitrifying biofilm and activated sludge. **Chemosphere**, v. 81, p. 626–632, 2010.

LIU, Q.; HUANG, X.; YANG, D.; SI, T.; PAN, S.; YANG, F. Yield improvement of exopolysaccharides by screening of the *Lactobacillus Acidophilus* ATCC and optimization of the fermentation and extraction conditions. **EXCLI Journal**, v. 15, p. 119-133, 2016.

LUNG, M.Y.; HUANG, W.Z. Production, purification and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) release capability of exopolysaccharide from *Laetiporus sulphureus* (Bulliard: Fries) Bondartsev & Singer in submerged cultures. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 433–439, 2011.

MA, X-K.; ZHANG H.; PETERSON, E.C.; CHEN, L. Enhancing exopolysaccharide antioxidant formation and yield from *Phellinus* species through medium optimization studies. **Carbohydrate Polymers**, v. 107, p. 214–220, 2014.

MAHAPATRA, S.; BANERJEE, D. Production and structural elucidation of exopolysaccharide from endophytic *Pestalotiopsis* sp. BC55, **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 182–191, 2016.

MAHESWARI, N. U.; KALAIYARASI, M. Comparative Study of Liquid Biofertilizer and Carrier Based Biofertilizer on Green Leafy Vegetables. **Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.**, v. 33, p. 229-232, 2015.

MALUSA, E.; SAS-PASZT, L; CIESIELSKA, J. Technologies for Beneficial Microorganisms Inocula Used as Biofertilizers. **The Scientific World Journal**, p. 1-12, 2012.

MELO, S.R.; ZILLI, J.E. Fixação biológica de nitrogênio em cultivares de feijão-caupi recomendadas para o Estado de Roraima, **Pesq. agropec. bras., Brasília**, v. 44, p. 1177-1183, 2009.

MELO, S.R. **Desempenho da fixação biológica de nitrogênio em cultivares de feijão-caupi em Roraima**, Dissertação de mestrado; Agronomia, Universidade Federal de Roraima, 2009.

MONTEIRO, N.K. et al. Caracterização química dos géis produzidos pelas bactérias diazotróficas *Rhizobium tropici* e *Mesorhizobium sp.* **Quim. Nova**, v. 35, p. 705-708, 2012.

MORE, T. T.; YADAV, J. S. S.; YAN, S.; TYAGI, R. D.; SURAMPALLI, R. Y. Extracellular polymeric substances of bacteria and their potential environmental applications. **Journal of Environmental Management**, v. 144, p. 1-25, 2014.

MUBARAK, H.M.; AMER, S.M. Purification and characterization of exopolysaccharides (Eps) extracted from *Saccharomyces Cerevisiae*, **Egyptian Journal of Experimental Biology**, v. 9, p. 249-258, 2013.

MUNÓZ-ROJAS, J.; CABALLERO-MELLADO, J. Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane cultivars and its effect on plant growth. **Microbiology Ecology**, v. 46, n. 4, p. 454-464, 2003.

MUTHUKUMARASAMY, R.; GOVINDARAJAN, M.; VADIVELU, M.; REVATHI, G. N-fertilizer saving by the inoculation of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum sp.* in micropropagated sugarcane plants. **Microbiological Research**, v. 161, p. 238-245, 2006.

NEHRA, V.; CHOUDHARY, M. A review on plant growth promoting rhizobacteria acting as bioinoculants and their biological approach towards the production of sustainable agriculture. **J Appl Nat Sci.**, v. 7, p. 540–556, 2015.

NOGUEIRA, E.M. et al. Expression of sugarcane genes induced by inoculation with *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 24, p. 199-206, 2001.

OLIVEIRA, D.C. **Caracterização e potencial tecnológico de amidos de diferentes cultivares de mandioca (*Manihot esculenta Crantz*)**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

ORLANDELLI, R.C. et al. Screening of endophytic sources of exopolysaccharides: Preliminary characterization of crude exopolysaccharide produced by submerged culture of *Diaporthe sp.* JF766998 under different cultivation time. **Biochimie Open**, v. 2, p. 33-40, 2016.

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

PEDROSA, F.O. et al. Genome of *Herbaspirillum seropedicae* Strain SmR1, a Specialized Diazotrophic Endophyte of Tropical Grasses. **PLoS Genetics**, v. 7, p. 1-10, 2011.

PEREIRA, W. et al. Acúmulo de biomassa em variedades de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes estirpes de bactérias diazotróficas. **Revista Ciência Agronômica**, v. 44, p. 363-370, 2013.

PILIZOTA, V.; SUBARIC, D.; LOVRIC, T. Rheological properties of CMC dispersions at low temperatures. **Food Technology and Biotechnology**, v. 34, p. 87–90, 1996.

PINHEIRO, J.B. **Fungos produtores de exopolissacarídeos e suas aplicações funcionais e industriais**. TCC (Bacharelado), Universidade Federal de São João Del-Rei, Sete Lagoas – MG, 2014.

PRADO JÚNIOR, J.P. **Qualidade e produtividade da cana-de-açúcar inoculada com *Gluconacetobacter diazotrophicus* e adubada com nitrogênio mineral e orgânico**. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical), Instituto Agronômico de Campinas, São Paulo, 2008.

REIS, V. M. et al. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 2155-2162, 2004.

REIS JÚNIOR, F.B.; MACHADO, C.T.T.; MACHADO, A.T.; SODEK, L. Inoculação de *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio. **R. Bras. Ci. Solo**, v. 32, p. 1139-1146, 2008.

RHOR, T.G. **Estudo reológico da mistura carboximetilcelulose/amido e sua utilização como veículo de inoculação bacteriano**. 98p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007.

RIMADA, P.; ABRAHAM, A. Comparative study of different methodologies to determine the exopolysaccharide produced by kefir grains in milk and whey. **Le Lait**, INRA Editions, v. 83, p. 79-87, 2003.

RIVERA, D. et al. Evaluation of polymers for the liquid rhizobial formulation and their influence in the Rhizobium-Cowpea interaction. **Univ. Sci.**, v. 19, p. 265-275, 2014.

ROCHA, J.F. **Estudo da mistura carboximetilcelulose (CMC) e Lithothanum como veículo para inoculantes rizobianos**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química, Tecnologia Química). Instituto de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018

RODRIGUES, E.P. et al. *Azospirillum amazonense* inoculation: effects on growth, yield and N<sub>2</sub> fixation of rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Soil**, v. 302, p. 249–261, 2008.

RODRIGUES, L.D. **A cana-de-açúcar como matéria-prima para a produção de biocombustíveis: impactos ambientais e o zoneamento agroecológico como ferramenta para mitigação**, Faculdade de Engenharia da UFJF, Juiz de Fora, 2010.

RODRÍGUEZ-ANDRADE, O. et al. The decrease in the population of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane after nitrogen fertilization is related to plant physiology in split root experiments. **Rev Argent Microbiol**. V. 47, p. 335-343, 2015.

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

SARDARI, R.R.R. et al. Evaluation of the production of exopolysaccharides by two strains of the thermophilic bacterium *Rhodothermus marinus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 156, p. 1–8, 2017.

SCHIAVÃO-SOUZA, T.D. et al. Produção de Exopolissacarídeos por Bactérias Probióticas: Otimização do Meio de Cultura. **Braz. J. Food Technol.**, v. 10, p. 27-34, 2007.

SCHMIDT, M.A. et al. The type III secretion system is necessary for the development of a pathogenic and endophytic interaction between *Herbaspirillum rubrisubalbicans* and Poaceae. **BMC Microbiology**, v. 12, p. 1-13, 2012.

SCHOEBITZ, M.; LÓPEZ, M. D.; ROLDÁN, A. Bioencapsulation of microbial inoculants for better soil–plant fertilization. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 33, p. 751-765, 2013.

SCHOEBITZ, M.; SIMONIN, H.; PONCELET, D. Starch filler and osmoprotectants improve the survival of rhizobacteria in dried alginate beads. **J Microencapsul**, v. 29, p. 532–538, 2012.

SCHUH, C.A. **Biopolímeros como suporte para inoculantes**, Dissertação de mestrado, Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

SCHULTZ, N. et al. Avaliação agronômica de variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas e adubadas com nitrogênio. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 47, p. 261-268, 2012.

SCHULTZ, N. et al. Inoculation of sugarcane with diazotrophic bacteria, **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 38, p. 407-414, 2014.

SILVA JUNIOR, E. B. et al. Agronomic efficiency of a new rhizobial inoculant formulation for use in cowpea. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, p. 138-141, 2012.

SILVA., M. F. et al. Inoculantes formulados com polímeros e bactérias endofíticas para a cultura da cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, p. 1437-1443, 2009.

SILVA., M.F. **Uso de Inoculante Polimérico contendo Bactérias Diazotróficas na Cultura da Cana-de-açúcar**. Tese (Doutorado em Ciências em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo). Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ, 2009

SKA-JAROSZUKI, M.O. et al. Extracellular polysaccharides from Ascomycota and Basidiomycota: production conditions, biochemical characteristics, and biological properties. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, p. 1823–1844, 2015.

SMIRNOU, D. et al. *Cryptococcus laurentii* Extracellular Biopolymer Production for Application in Wound Management. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 174, p. 1344-1353, 2014.

SOARES, B.L. **Eficiência simbiótica de estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio de diferentes procedências em caupi (*vigna unguiculata*) e sua identificação**, Dissertação de mestrado; Ciência do solo, Universidade Federal de Lavras. [S.l.]. 2009.

SOUSA, E. B. **Preparação de veículo de inoculação à base de CMCEPS: Obtenção, caracterização e desempenho**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Instituto de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

SQUILLACI, G. et al. Production and properties of an exopolysaccharide synthesized by the extreme halophilic archaeon *Haloterrigena turkmenica*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 100, p. 613–623, 2016.

TITTABUTR, P. et al. Growth, Survival and Field Performance of Bradyrhizobial Liquid Inoculant Formulations with Polymeric Additives. **ScienceAsia**, v. 33, p. 69-77, 2007.

TRABELSI, I.; SLIMA, S.B.; HELA CHAABANE, H.; RIADH, B.S. Purification and characterization of a novel exopolysaccharides produced by *Lactobacillus sp.* Ca6. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 74, p. 541–546, 2015.

WEBER, F.H.; COLLARES-QUEIROZ, F.P.; CHANG, Y.K. Caracterização físico-química, reológica, morfológica e térmica dos amidos de milho normal, ceroso e com alto teor de amilose. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 29, p. 748-753, 2009.

YADAV, R.L.; SUMAN, A.; PRASAD, S.R.; PRAKASH, O. Effect of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Trichoderma viride* on soil health, yield and N-economy of sugarcane cultivation under subtropical climatic conditions of India. **European Journal of Agronomy**, v. 30, p. 296-303, 2009

YADAV, K.L.; RAHI, D.K.; SONI, S.K. n Indigenous Hyperproductive Species of *Aureobasidium pullulans* RYLF-10: Influence of Fermentation Conditions on Exopolysaccharide (EPS) Production. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 172, p. 1898–1908, 2014.

YEH, C-W. et al. Quantitative and morphologic analysis on exopolysaccharide and biomass production from a truffle endophytic fungus *Hypocreales sp.* NCHU01. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 45, p. 108–114, 2014.

YU, X.H.; LIU, Y.; WU, X.L.; LIU, L.Z.; FU, W.; SONG, D.D. Isolation, purification, characterization and immunostimulatory activity of polysaccharides derived from American ginseng. **Carbohydrate Polymers**, v. 156, p. 9–18, 2017.

ZENG, J. et al. Composition and aggregation of extracellular polymeric substances (EPS) in hyperhaline and municipal wastewater treatment plants. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1-9, 2016.

ZHANG, L. et al. Antioxidant activity of an exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus plantarum* C88. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 54, p. 270–275, 2013.

ZILLI, J.É.; SMIDERLE, O.J.; FERNANDES JÚNIOR, P.I. Eficiência agronômica de diferentes formulações de inoculantes contendo *Bradyrhizobium* na cultura da soja em Roraima, **Revista Agro@mbiente On-line**, v. 4, p. 56-61, 2010.

## 10 ANEXOS

### Anexo I- Meios de cultivo para produção de EPS

**Tabela 22:** Composição do meio de cultura YMA.

Reagente	Quantidade para 1 L de solução
Manitol	10 g
Solução de K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 10%	1 mL
Solução de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10%	4 mL
Solução de MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 10%	2 mL
Solução de NaCl 10%	1 mL
Azul de Bromotimol	5 mL
Extrato de Levedura	400 mg
Ágar bacteriológico	15 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL
KOH q.s.p	pH = 6,8

**Tabela 23:** Composição do meio de cultura YM.

Reagente	Quantidade para 1 L de solução
Manitol	10 g
Solução de K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 10%	1 mL
Solução de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10%	4 mL
Solução de MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 10%	2 mL
Solução de NaCl 10%	1 mL
Azul de Bromotimol	5 mL
Extrato de Levedura	400 mg
Água destilada q.s.p.	1000 mL
KOH q.s.p	pH = 6,8

### Anexo II- Solução Salina para diluição

**Tabela 24:** Composição da solução salina para diluição seriada.

Solução salina (1 L)	1,0 mL de K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,5 mL de MgSO <sub>4</sub> 0,5 mL de NaCl 1,0 mL de FeEDTA sol. 1,64% 0,5 mL de Sol. de micronutrientes para meio de cultura
----------------------	---

### Anexo III- Estirpes bacterianas diazotróficas de cana-de-açúcar e respectivos meios de cultivo

**Tabela 25:** Informações quanto ao meio e tempo de cultivo das estirpes bacterianas de cana-de-açúcar.

Estirpe bacteriana	Meio de cultivo	Tempo de crescimento
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> (BR 11281)	LGI-P	3 dias
<i>Nitrospirillum amazonense</i> (BR 11145)	LGI	3 dias
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> (BR 11335)	JNFB	3 dias
<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i> (BR 11504)	JNFB	3 dias
<i>Parabulkkholderia tropica</i> (BR 11366)	JMV	3 dias

**Tabela 26:** Especificações dos meios de cultura das estirpes de cana-de-açúcar.

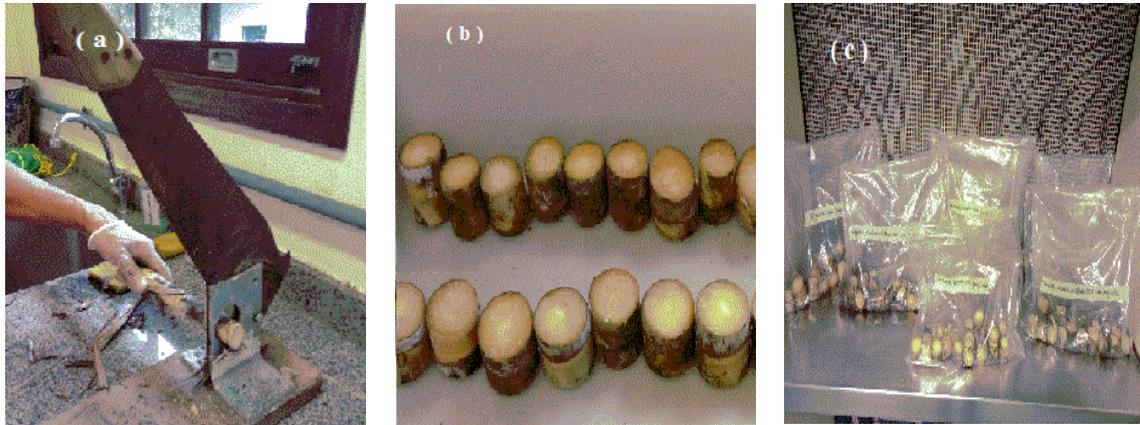
Meios de cultivo	Reagentes/Quantidades para 1 L de meio
LGI	5 g de Açúcar cristal 2 mL de K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> sol. 10% 6 mL de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> sol. 10% 2 mL de MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O sol. 10% 2 mL de CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O sol. 1% 4 mL de FeEDTA sol. 1,64 % 2 mL de Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O sol.0,1% 1 mL de Vitamina para meio de cultura Azul de bromotimol sol. 0,5% Ajustar o p.H para 6,0 – 6,2 com H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> sol. 5%
LGI-P	100 g de Açúcar cristal 2 mL de K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> sol. 10% 6 mL de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> sol. 10% 2 mL de MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O sol. 10% 2 mL de CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O sol. 1% 1 mL de FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O sol. 1 % 2 mL de Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O sol.0,1% 1 mL de Vitamina para meio de cultura 5 mL de Azul de bromotimol sol. 0,5% em 0,2 N de KOH Ajustar o pH para 5,5 com ácido acético sol. 10%
JMV	5 g de Manitol 6 mL de K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> sol. 10% 18 mL de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> sol. 10% 2 mL de MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O sol. 10% 2 mL de CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O sol. 1% 1 mL NaCl sol. 10% 4 mL de FeEDTA sol. 1,64 % 1 mL de Vitamina para meio de cultura 2 mL de Sol. de micronutrientes para meio de cultura 2 mL de Azul de bromotimol sol. 0,5% Ajustar o p.H para 5,0 – 5,4

**Tabela 25:** Especificações dos meios de cultura das estirpes de cana-de-açúcar (continuação).

JNFB	5 g de Ácido Málico 6 mL de $K_2HPO_4$ sol. 10% 18 mL de $KH_2PO_4$ sol. 10% 2 mL de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ sol. 10% 2 mL de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ sol. 1% 1 mL NaCl sol. 10% 4 mL de FeEDTA sol. 1,64 % 1 mL de Vitamina para meio de cultura 2 mL de Sol. de micronutrientes para meio de cultura 2 mL de Azul de bromotimol sol. 0,5% 4,5 g de KOH Ajustar o p.H para 5,8
------	--

## 11 APÊNDICE

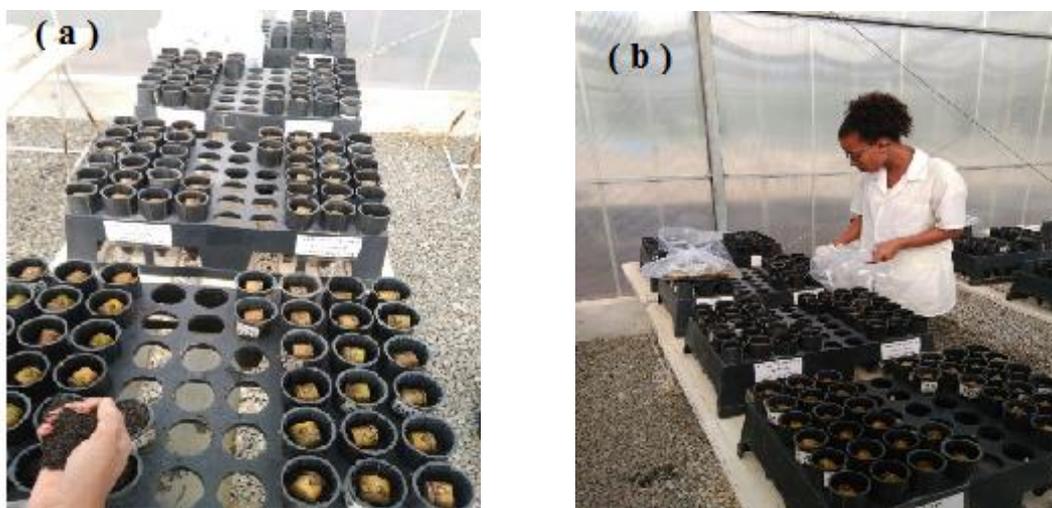
### Apêndice I- Montagem de experimento de casa-de-vegetação



**Figura 11:** (a) Corte dos mini-toletes; (b) Separação por diâmetro; (c) Separação por tratamento.



**Figura 12:** (a) Tratamento térmico; (b) Tratamento fúngico.



**Figura 13:** Montagem do experimento em tubetes.