

UFRRJ

**INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CIÊNCIA DO SOLO**

DISSERTAÇÃO

**Desenvolvimento de Bioprocessos para Produção de
Inoculante de Cana-de-açúcar através do Co-Cultivo
das Espécies *Herbaspirillum seropedicae* BR11335 e
H. rubrisubalbicans BR11504**

Priscila Pereira Bahia

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CIÊNCIA DO SOLO

DESENVOLVIMENTO DE BIOPROCESSO PARA PRODUÇÃO DE
INOCULANTE DE CANA-DE-AÇÚCAR ATRAVÉS DO CO-CULTIVO
DAS ESPÉCIES *HERBASPIRILLUM SEROPEDICAE* BR11335 E *H.*
***RUBRISUBALBICANS* BR11504**

PRISCILA PEREIRA BAHIA

Sob a Orientação da Professora
Veronica Massena Reis

e Co-orientação do Pesquisador
Luis Henrique de Barros Soares

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestra**, no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo.

Seropédica, RJ
Abril de 2017

Bahia, Priscila Pereira, 1991-
B151d Desenvolvimento de Bioprocessos para Produção de
Inoculante de Cana-de-açúcar através do Co-cultivo das
Espécies Herbaspirillum seropedicae BR11335 e H.
rubrisubalbicans BR11504 / Priscila Pereira Bahia. -
2017.
50 f.
Orientadora: Veronica Massena Reis.
Coorientador: Luis Henrique de Barros Soares.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em
Agronomia - Ciência do Solo, 2017.

1. Cultivo simultâneo. 2. Bactérias promotoras de
crescimento. 3. qPCR. I. Massena Reis, Veronica, 1961
, orient. II. de Barros Soares, Luis Henrique, 1970-,
coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência
do Solo. IV. Título.

É permitida a cópia parcial ou total desta Dissertação, desde que seja citada a fonte.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA - CIÊNCIA DO SOLO

PRISCILA PEREIRA BAHIA

Dissertação requerida como requisito parcial para a obtenção de grau de **Mestra** no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Ciência do Solo.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 11/04/2017

Luis Henrique de Barros Soares Dr. Embrapa Agrobiologia
(Co-orientador)

Luiz Augusto da Cruz Meleiro. Dr. UFRRJ

Adelson Paulo de Araújo. Dr. UFRRJ

Jean Luiz Simões de Araújo Dr. Embrapa Agrobiologia

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu grande amigo, que está comigo em todos os momentos, me guiando e permitindo conquistas tão importantes como essa.

Aos meus pais Shirlei e Dirceu e ao meus pais de coração Júlia e José, fonte de inspiração, amor e carinho. Não sou nada sem vocês!

A toda minha família que sempre me apoiou, me deu força e entendeu as diversas vezes que não pude estar presente. A vocês meu muito obrigada!

A todos os amigos, que se tornaram minha família em Seropédica, que estiveram comigo nos momentos de festa, alegrias e também naqueles momentos mais difíceis, quando o desânimo e o cansaço tomam conta de nós. Obrigada pela força, carinho e todos os momentos e sorrisos juntos! Agradeço aos meus amigos e companheiros de pós-graduação: Áurea, Andréa, Mayan, Dani Cabral, Dani Barbosa, Júlio, Carlinha, Fernando, Gustavo, Thiago, Danilo.

Agradecimento especial para amiga Liliandra que sempre esteve comigo, nas alegrias e também nas tristezas desde o início da graduação e tenho certeza que estará para sempre em minha vida. Minha amiga, quase irmã, obrigada por tudo! Sempre juntas!

A queria amiga Juliane, um grande presente dessa fase do mestrado. Companheira de casa e também de laboratório. Ju, sua companhia foi essencial e tornou meus últimos anos muito mais agradáveis. Obrigada pela amizade!

Ao Cleudson Gabriel, pela amizade e por toda a ajuda, principalmente, com as PCRs. Sua ajuda foi muito importante para a realização desse trabalho. MUITÍSSIMO obrigada por tudo!

A todos os colegas de trabalho da Embrapa Agrobiologia. Aqui deixo meu agradecimento especial para o senhor Claudinho e Amarildo, responsáveis pela esterilização de todo o material utilizado neste trabalho, aos guardas pela segurança proporcionada nas noites no laboratórios; e à analista do laboratório de Bioquímica, Carolina, pela ajuda em tudo o que era preciso.

Um agradecimento especial para orientadora Dra^a Veronica, uma grande profissional, pela oportunidade do trabalho e ensinamentos.

Agradecimento também especial ao meu co-orientador Dr. Luis Henrique que muito me ensinou na área de Bioprocessos e me mostrou um outro lado do produto inoculante. Muito obrigada por tudo!

Agradeço ao Dr. Jean por toda paciência e ajuda prestada para a realização deste trabalho. Sua ajuda foi essencial! Muito obrigada!

A todos os demais membros da banca pela disponibilidade e participação.

A todos os professores que muito me ensinaram. Admiro muito essa profissão que tanto acrescenta na nossa formação.

A minha querida UFRRJ, minha casa nos últimos 7 anos, onde tanto aprendi e ainda tenho muito a aprender.

Ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo pela oportunidade de formação e suporte.

Um grande agradecimento à Embrapa Agrobiologia pelos ensinamentos e pela estrutura.

À CAPES pela bolsa concedida no primeiro ano e à FAPERJ pela bolsa aluno nota 10 concedida no último ano. Muito obrigada!

RESUMO

BAHIA, Priscila Pereira. **Desenvolvimento de bioprocessos para produção de inoculante de cana-de-açúcar através do co-cultivo das espécies *Herbaspirillum seropedicae* BR11335 e *H. rubrisubalbicans* BR11504.** 2017. 50f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

O objetivo deste trabalho foi o estabelecimento de parâmetros de crescimento adaptados para o sistema de co-cultivo das bactérias diazotróficas endofíticas *Herbaspirillum seropedicae* (estirpe BR11335) e *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BR11504), que compõem o inoculante recomendado para a cana-de-açúcar. Foram construídas curvas de crescimento individuais em agitador orbital (*shaker*) e biorreator de bancada, avaliando condições de temperatura de 30°C e 35°C e vazão de aeração de 1,0 a 6,0 L min⁻¹, onde as condições que melhor favoreciam ambas as estirpes, foram reproduzidas em sistema de co-cultivo também em *shaker* e biorreator de bancada. Para acompanhar o crescimento das estirpes em co-cultivo, foram retiradas amostras do caldo fermentativo em intervalos regulares de 4 horas para extração de DNA e realização de PCR em tempo real (qPCR) para a quantificação de cada bactéria no sistema. Para tal, desenharam-se pares de *primers* espécie-específicos para cada uma das estirpes. As condições que favoreceram ambas as estirpes individualmente foram: temperatura de 35°C e aerações de 5,0 e 6,0 L min⁻¹. Avaliando as amostras temporais dos co-cultivos nas condições anteriores por meio de qPCR, observou-se presença das duas estirpes nos co-cultivos, mostrando que é possível aplicar esse sistema para essas bactérias. Houve diferença significativa ($\alpha = 0,05$) entre as médias gerais das estirpes BR11335 e BR11504, sendo o crescimento de BR11504 superior nas duas condições de aeração. Porém, os resultados temporais da qPCR não acompanharam as curvas de crescimento das quais as alíquotas foram retiradas, evidenciando que, provavelmente o método de extração de DNA influenciou nos resultados e necessita de ajustes, principalmente pela ocorrência de grande concentração de material viscoso durante a extração, o que pode estar evidenciando grande produção de polissacarídeos pelas estirpes durante o cultivo simultâneo das mesmas, alterando, assim, os resultados da qPCR.

Palavras-chave: Bactérias promotoras de crescimento. Cultivo simultâneo. *Herbaspirillum*, qPCR.

ABSTRACT

BAHIA, Priscila Pereira. **Bioprocess for producing sugarcane inoculant by co-cultivation of the species *Herbaspirillum seropedicae* BR11335 and *H. rubrisubalbicans* BR11504.** 2017. 50p. Dissertation (Master Science in Agronomy, Soil Science). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

The objective of this work was the establishment of a growth system fitted for the co-cultivation of endophytic bacteria *Herbaspirillum seropedicae* (strain BR11335) and *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BR11504), which make up the recommended inoculant for a sugarcane. Individual growth curves were constructed in an orbital shaker (floor incubator) and bench bioreactor, evaluating two temperature levels, 30°C and 35°C, and air flow from 1.0 to 6.0 L min⁻¹. It was obtained the process conditions that favored both strains, and they were reproduced in co-cultivation systems either in shaker or in bench bioreactor. To follow the behavior of the strains in co-cultivation, samples of fermentative broth were taken at regular intervals of 4 hours and performed real-time PCR (qPCR) to identify a concentration of each bacterium in the system. For this, pairs of species-specific primers were designed for each of the strains. The conditions that favored both strains were: 35° C temperature and 5.0 to 6.0 L min⁻¹ of aeration for. Evaluating temporal samples of the co-cultivations under the previous conditions by means of qPCR, the presence of the two strains in the co-cultures was observed, showing that it was possible to apply this system to the bacteria. There was significant difference ($\alpha = 0.05$) between the average growth of strains BR11335 and BR11504, with BR11504 growth being higher in both aeration conditions. However, the temporal results of the qPCR did not follow the growth curves from which the aliquots were removed, evidencing that the DNA extraction method probably influenced the results and needs adjustments, mainly due to the occurrence of a high concentration of viscous material during extraction, which may be evidencing large production of polysaccharides by the strains during the simultaneous cultivation of them, thus altering the results of the qPCR.

Keywords: Plant growth promoting. Simultaneous culture. *Herbaspirillum*. qPCR.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Cana-de-açúcar	3
2.2 Fixação Biológica de Nitrogênio	3
2.2.1 Fixação biológica de nitrogênio em cana-de-açúcar	4
2.3 Inoculantes.....	5
2.3.1 Inoculante para cana-de-açúcar	6
2.4 Caracterização do Gênero <i>Herbaspirillum</i>	7
2.4.1 <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	7
2.4.2 <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	8
2.5 Bioprocessos.....	9
2.5.1 Aeração e agitação dos processos fermentativos.....	12
2.6 Co-cultivo de Micro-organismos.....	12
2.7 PCR em Tempo Real	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 Localização.....	15
3.2 Material Biológico.....	15
3.3 Meio de Cultura	15
3.4 Estoque de Bactérias.....	15
3.5 Ensaio Fermentativos em Shaker	15
3.5.1 Ensaio fermentativos individuais	16
3.5.2 Ensaio fermentativos em co-cultivo.....	16
3.6 Ensaio Fermentativos em Biorreator.....	16
3.6.1 Ensaio fermentativos individuais	16
3.6.2 Ensaio fermentativos em co-cultivo.....	17
3.7 Concentração Celular Mássica	17
3.8 Análises Moleculares.....	17
3.8.1 Extração de DNA.....	18
3.8.2 Desenho e validação de <i>primer</i>	18
3.8.3 qPCR em tempo real.....	18
3.9 Análise Estatística.....	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
4.1 Ensaio Fermentativos Individuais em Shaker	20
4.2 Ensaio Fermentativos Individuais em Biorreator.....	21
4.3 Ensaio Fermentativos sob Co-cultivo	26
4.4 PCR em Tempo Real	27
5. CONCLUSÕES.....	36
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	37
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
8. ANEXOS.....	50

1. INTRODUÇÃO

A cultura da cana-de-açúcar apresenta grande importância para a economia do país, visto que o Brasil, além de ser o maior produtor da cultura, também é o primeiro do mundo na produção de açúcar e etanol de cana e conquista, cada vez mais, o mercado externo com o uso do biocombustível como alternativa energética (MAPA, 2016).

Quando os adubos nitrogenados são aplicados no cultivo da cana, há um aumento nos custos de produção, principalmente nos ciclos de soqueira. Além disso, a fabricação desses adubos se dá por meio de um processo bastante dispendioso em energia, o processo industrial Haber Bosch. Este processo, simplificado, é uma reação entre nitrogênio atmosférico (N_2) e hidrogênio (H_2) sob alta temperatura e pressão formando moléculas de amônia. Todavia, o H_2 é obtido a partir de compostos derivados de petróleo, os quais contribuem na emissão de gases de efeito estufa (GEE) acarretando, portanto, danos ao meio ambiente. Além disso, o manejo incorreto dos fertilizantes nitrogenados também ocasiona danos ambientais com a liberação de GEE, como o N_2O , e contaminação (eutrofização) dos lençóis freáticos e cursos d'água, por exemplo. Como alternativa ao uso desses fertilizantes químicos, a fixação biológica de nitrogênio (FBN) contribui com a preservação ambiental, eliminando o impactos negativos causados por esses produtos (STRALIOTTO et al., 2002).

A aplicação de bactérias diazotróficas em cana-de-açúcar tem sido alvo de diversos estudos, os quais ainda não elucidaram totalmente a interação entre esses micro-organismos e a cana, interação que pode variar em função de fatores como condições edafoclimáticas e, principalmente, o genótipo da planta. Resultados de pesquisas mostraram que, dependendo desses fatores, até 60% do N exigido pela cana pode ser oriundo da FBN (URQUIAGA et al., 1992). Além do suprimento de N, essas bactérias podem influenciar positivamente no desenvolvimento radicular, por meio da produção de fitormônios, como o ácido indol acético, que reflete na melhoria da absorção de água e nutrientes do solo; aumentar a velocidade de brotação das gemas e emissão de raízes em colmos (CHAVES et al., 2015); proporcionar aumento de produtividade de colmos e matéria seca total similares ao efeito da adubação com 120 kg ha^{-1} de N (SCHULTZ et al., 2012); entre outros benefícios comprovados em pesquisas.

Diversas espécies de bactérias diazotróficas, de distintos gêneros, naturalmente estão associadas à planta de cana, principalmente *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter* e *Burkholderia*. Com base nessas associações e seus benefícios, em 2008, a Embrapa Agrobiologia, lançou o inoculante para a cultura da cana-de-açúcar, recomendando para sua composição, uma mistura de cinco estirpes de espécies isoladas da própria cultura, capazes de promover seu crescimento de forma significativa, quando inoculadas em conjunto: *Gluconacetobacter diazotrophicus* (estirpe BR11281^T), *Herbaspirillum seropedicae* (BR11335), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BR11504), *Nitrospirillum amazonense* (BR11145) e *Paraburkholderia tropica* (BR11366^T). Entretanto, segundo Pereira (2011), questionamentos como a eficiência do inoculante em diferentes genótipos de cana-de-açúcar, resposta da inoculação em associação com doses de N-fertilizante e a viabilidade operacional e econômica da tecnologia desenvolvida ainda necessitam de respostas.

A indústria de base agrobiotecnológica no Brasil é focada na produção de inoculantes rizobianos, e 95% destes são para a cultura da soja. Embora seja crescente a demanda por produtos contendo micro-organismos promotores de crescimento vegetal, a maioria das biofábricas não possui estrutura para cultivar estas cinco estirpes de forma eficiente. Os sistemas de co-cultivo de micro-organismos surgem como uma alternativa de produção para

diminuir o número de processos fermentativos exigidos na produção do inoculante da casa, porém são difíceis de monitorar, principalmente no que diz respeito à fisiologia de crescimento das estirpes, na conversão de substratos e na produção de biomassa microbiana. Entretanto, com o auxílio de técnicas de biologia molecular, algumas dessas questões podem ser avaliadas, como, por exemplo, o acompanhamento do crescimento de casa bactéria envolvida pela quantificação de células por meio de PCR em Tempo Real, uma técnica bastante específica, sensível e confiável.

Um dos principais objetivos do desenvolvimento em co-cultivo é mimetizar o ambiente natural, o qual apresenta grande diversidade e não apenas um micro-organismo isoladamente. Dessa forma, é possível a indução de produção de metabólitos secundários de interesse ou mesmo avaliação de inibição de um organismo em relação a outros. Porém, ainda não há indícios do uso desse sistema para a finalidade de produção de inoculantes mistos, como o da cana-de-açúcar, resultando em melhor adequação das fábricas devido a simplificação do processo, economia de tempo, energia, insumos e, principalmente, de custos de produção.

Para a elaboração desse tipo de cultivo com bactérias, faz-se necessário o ajuste de condições que favoreçam todos os micro-organismos envolvidos no sistema. Os principais parâmetros de crescimento a serem observados, pois influenciam de forma direta o desenvolvimento bacteriano são: nutrição, temperatura, pH, agitação e aeração.

Tendo em vista a necessidade de otimizar o processo de produção do inoculante misto da cana-de-açúcar e, que entre as estirpes recomendadas, duas pertençam ao gênero *Herbaspirillum*, portanto, possuem características mais próximas entre si do que com as demais, o sistema de co-cultivo das estirpes de tal gênero fornecerá condições otimizadas para a produção de inoculante tais como: maior obtenção de células de ambas as estirpes em um único procedimento, menor gasto com matéria-prima para a indústria e manutenção celular.

Além disso, o sucesso do estabelecimento do co-cultivo servirá de base para estudos futuros que envolvam as demais estirpes que compõem o inoculante.

Portanto, para avaliar se *Herbaspirillum seropedicae* estirpe BR11335 e *H. rubrisubalbicans* estirpe BR11504 podem ser cultivadas em sistema de co-cultivo e quais os parâmetros de crescimento que refletem em maior obtenção de ambas as estirpes, foram propostos os seguintes objetivos:

- a) Construção de curvas de crescimento individuais em *shaker* e em biorreator de bancada, avaliando o crescimento das estirpes sob as temperaturas de 30° e 35°C e aeração de 1,0 a 6,0 L min⁻¹;
- b) Aplicar as condições de temperatura e aeração que favoreceram ambas as estirpes em sistema de co-cultivo das mesmas;
- c) Desenhar *primer* espécie-específico para cada bactéria;
- d) Analisar o comportamento de crescimento das estirpes em co-cultivo por meio de quantificação por PCR em tempo real.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cana-de-açúcar

Atualmente, o Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e, dessa forma, a cultura apresenta grande importância para o agronegócio do país. De acordo com a CONAB (2016), a produção brasileira de cana-de-açúcar na safra 2015/2016 foi de 665,6 milhões de toneladas de colmos frescos e estima-se um aumento de 2,9% para a safra 2016/2017. Além disso, o Brasil é responsável por mais de 50% do açúcar comercializado no mundo, o que caracteriza o país como o maior produtor desta commodity. O país também se destaca como potência na produção de etanol, um subproduto da cana-de-açúcar, considerado como um combustível mais limpo em relação aos fósseis, devido sua menor emissão de CO₂, conferindo, portanto, um importante papel ambiental para cultura da cana.

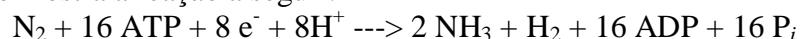
A cana-de-açúcar é uma planta semi-perene originária do continente africano, pertencente à família Poaceae, gênero *Saccharum*. Suas principais espécies são: *Saccharum officinarum* L, *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. sinense* e *S. barberi* (SILVA, 2009). A cana possui metabolismo do tipo C₄ o que lhe confere eficiência em capturar e utilizar gás carbônico atmosférico e grande adaptabilidade às condições de alta luminosidade e temperatura (SEGATO, 2016). O nitrogênio é um elemento essencial às plantas, ou seja, não pode ser substituído por outro nutriente e seu déficit limita o desenvolvimento vegetal, logo é preciso que as exigências nutricionais do vegetal, associadas a outros fatores, como um bom manejo, por exemplo, sejam atendidas para garantir boa produtividade (ISHIKAWA et al., 2007). Embora o N constitua, aproximadamente, 1% da matéria seca da cana-de-açúcar, desempenha papel fundamental no desenvolvimento da planta, visto que constitui moléculas essenciais como proteínas, ácidos nucleicos e também a molécula de clorofila (MALAVOLTA et al., 1997).

Em decorrência dos custos elevados dos fertilizantes nitrogenados e das grandes perdas na sua aplicação, ocasionando danos ambientais e econômicos, há uma grande busca por alternativas que reduzam custos e aumentem a eficiência do uso do N sem que o balanço energético da cultura seja comprometido (OLIVEIRA et al., 2006; REIS et al., 2009a; PEREIRA et al., 2013). Ainda que necessitem de melhores elucidações dos processos, diversos estudos têm demonstrado que a inoculação de bactérias diazotróficas às plantas de cana promove benefícios ao seu desenvolvimento, quer seja pela fixação de nitrogênio propriamente dita, ou por outros mecanismos de promoção de crescimento como, por exemplo, a produção de fitormônios que induzem um melhor desenvolvimento radicular.

2.2 Fixação Biológica de Nitrogênio

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é vista como um dos processos naturais mais importantes do planeta. A dinâmica da matéria orgânica no solo reflete diretamente na disponibilidade de nitrogênio para os vegetais. Nos solos tropicais, essa dinâmica resulta em baixas taxas de nitrogênio disponível, o que reflete em acentuada necessidade de adubação nitrogenada. Em contrapartida, há uma grande abundância deste elemento na atmosfera em forma de gás nitrogênio (N₂), porém quimicamente inerte e poucos são os organismos capazes de utilizá-lo. A FBN surge, então, como uma alternativa sustentável e de baixo custo em comparação ao N-fertilizante, para a utilização do N₂ atmosférico como fonte nutricional. De acordo com Moreira e Siqueira (2002), a FBN é responsável por cerca de 139 Mg de nitrogênio fixado por ano, só nos ecossistemas terrestres. Este processo biológico é realizado por organismos denominados diazotróficos que, segundo Cardoso et al. (1992), representam uma pequena parcela de espécies dos procariotos e nos ecossistemas terrestres são

representados por bactérias. As bactérias diazotróficas possuem o complexo enzimático da nitrogenase, capaz de quebrar a tripla ligação do N₂ atmosférico e reduzi-lo a duas moléculas de amônia como mostra a reação a seguir:



Onde: e⁻ representa elétron e P_i, fosfato inorgânico.

Essas bactérias se associam a diversas espécies de plantas em diferentes graus de especificidade levando à classificação como bactérias diazotróficas: de vida livre, simbióticas ou associativas (HUNGRIA et al., 2007). As bactérias de vida livre são, em sua maioria, organismos heterotróficos, e necessitam de um sistema que forneça carbono como fonte de energia para a fixação do nitrogênio. Estas bactérias podem ser encontradas na rizosfera das plantas onde há a liberação de exsudados pela planta que são utilizados como fonte de energia pelas bactérias (MARIN et al., 1999).

A associação simbiótica se dá entre as bactérias do grupo rizóbio e plantas da família *Fabaceae*, também conhecidas como leguminosas. Nessa interação, há a formação de uma estrutura diferenciada nas raízes dos vegetais, denominada nódulo, onde a planta hospedeira fornece nutrientes e proteção física aos micro-organismos e estes, por sua vez, fornecem nitrogênio. Muitos estudos foram e ainda são realizados com base nessa interação e o caso de maior sucesso da simbiose com leguminosas é o da soja (*Glycine max* (L.) Merr.), onde a adubação nitrogenada pôde ser totalmente substituída pela FBN. De acordo com Hungria et al. (2007), a soja dispensa totalmente a adubação nitrogenada, uma vez que, em condições normais de cultivo, a FBN é capaz de suprir as necessidades de N da cultura com taxas de fixação de N superiores a 300 kg de N ha⁻¹ ano⁻¹.

Já as bactérias associativas colonizam o interior dos tecidos de plantas não leguminosas, e não formam estruturas especializadas para tal. Diferentemente das bactérias simbióticas, as associativas excretam somente uma parte do nitrogênio fixado diretamente para a planta associada e, posteriormente, a mineralização das bactérias pode contribuir com aportes adicionais de nitrogênio para as plantas. Além disso, vale ressaltar que a fixação de nitrogênio por esses organismos não supri totalmente as necessidades nutricionais do vegetal (URQUIAGA et al., 1992; 2012). As bactérias diazotróficas associativas podem ser divididas em dois grupos: as endofíticas facultativas, que podem colonizar tanto a rizosfera quanto o interior das plantas; e as endofíticas obrigatórias, que colonizam somente o interior das plantas. Representantes importantes de cada um seriam o gênero *Azospirillum* sp. como facultativo e o gênero *Herbaspirillum* sp. como obrigatório (BALDANI et al., 1997; 2014).

2.2.1 Fixação biológica de nitrogênio em cana-de-açúcar

Diversos estudos realizados com cana-de-açúcar a fim de analisar respostas da cana planta à adubação nitrogenada, apresentaram resultados contraditórios, onde observou-se ausência de resposta à adubação nitrogenada em inúmeros casos (AZEREDO et al., 1986; ROSSIELO, 1987; VITTI et al., 2010). Após a colheita da cana, quase não resta nitrogênio no sistema, pois a palha, geralmente, é queimada antes do corte e dessa forma quantidades insignificantes de nitrogênio permanecem nas cinzas. A quantidade de adubo nitrogenado aplicado tanto para a cana planta, quanto para a cana soca, é inferior ao que a planta extrai do sistema. Mesmo que não houvessem perdas de nitrogênio por lixiviação ou volatilização, ainda assim a cultura retiraria do campo mais nitrogênio do que é adicionado, logo, se esperaria que as reservas de nitrogênio no solo diminuíssem com o tempo, o que não ocorre (BODDEY, et al., 1992). A hipótese de FBN em cana-de-açúcar foi embasada nos trabalhos pioneiros de Johanna Döbereiner na década de 50, quando foi verificada a ocorrência de *Beijerinckia fluminensis* (bactéria diazotrófica renomeada para *Azorhizophilus paspali* e *Azotobacter paspali*) na rizosfera de plantas de cana-de-açúcar, em solos da Baixada

Fluminense no Estado do Rio de Janeiro (DÖBEREINER; RUSCHEL, 1958). Anos mais tarde, com o surgimento dos métodos de quantificação de N por meio do isótopo ^{15}N , ensaios conduzidos na Embrapa Agrobiologia fazendo uso das técnicas de balanço de N total e diluição isotópica de ^{15}N , comprovaram a contribuição da FBN às diversas variedades da cultura da cana-de-açúcar (URQUIAGA et al., 1992, 2012).

A associação entre bactérias diazotróficas e a cana-de-açúcar envolve diversos gêneros (JAMES, 2000) tais como *Gluconacetobacter diazotrophicus*; *Herbaspirillum* spp., *Burkholderia* que foram renomeadas para o novo gênero *Paraburkholderia*; *Pseudomonas*; e muitas outras (TAULÉ et al., 2012). As bactérias do gênero *Herbaspirillum* são naturalmente associadas às gramíneas e aí se incluem as espécies *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* (BALDANI et al., 1986; 1996), objetos de estudo do presente trabalho. Em plantas micropropagadas de cana-de-açúcar, foi possível observar o potencial de promoção de crescimento pela inoculação de estirpes selecionadas de *G. diazotrophicus* e *H. seropedicae*, com incrementos na biomassa radicular entre 50 e 350% em relação ao controle não inoculado (OLIVARES et al., 2000; MARQUES JÚNIOR, 2008). A cana-de-açúcar pode se beneficiar pela interação com bactérias diazotróficas pois estas, além de fixar nitrogênio atmosférico, podem promover o crescimento vegetal por meio da produção de fitormônios como o ácido indol acético, por exemplo, solubilizar fosfatos inorgânicos, aumentar o teor de carbono orgânico no solo, inibir alguns patógenos, produzir sideróforos, entre outros benefícios. Sobretudo, a resposta à inoculação de bactérias diazotróficas em cana é diferenciada de acordo com o genótipo da planta, o tipo de solo e ambiente (OLIVEIRA et al., 2006; PEREIRA et al., 2013). Uma possível explicação para essas variações seria o fato de que diferentes genótipos podem conter distintas populações de bactérias endofíticas (REIS JÚNIOR et al., 2000). Além disso, embora se conheça a importância do nitrogênio para o crescimento vegetal, muito pouco foi feito sobre a distribuição de suas diferentes formas na cana-de-açúcar, e sobre como esses compostos se comportam em relação à população de bactérias diazotróficas naturalmente presentes na cultura (GOMES et al., 2005). Para Pereira et al. (2013), essas questões devem ser esclarecidas para que haja maior eficiência no uso da associação das bactérias diazotróficas com a cana, o que contribuirá para a redução da necessidade de adubação nitrogenada assim como para a sustentabilidade dos agroecossistemas.

2.3 Inoculantes

De acordo com o protocolo da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbiológicos de Interesse Agrícola (RELARE), um inoculante é “todo produto que contenha micro-organismos com ação estimulante para o crescimento das plantas”. Portanto, podemos considerar que os inoculantes são formulações com alta concentração de bactérias capazes de promover crescimento para uma cultura de interesse, podendo ser aplicados às semente ou no solo durante a semeadura (SOUSA, 2011).

No Brasil, a produção de inoculantes iniciou-se na década de 1950 (FREIRE, 1968) e, atualmente são comercializados em forma turfosa ou líquida e têm sua qualidade controlada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, que utiliza os parâmetros determinados pelo protocolo da RELARE (FERNADES JÚNIOR, 2006). A turfa é o veículo mais utilizado pois proporciona boa retenção de umidade. Entretanto, este veículo apresenta algumas desvantagens, tais como: reservas restritas e pouco acessíveis, alto custo de esterilização e dificuldades na aplicação em grande escala no campo (ALVAREZ et al., 2010; TITTABUTR et al., 2007; SOUSA, 2011). Em consequência disso, veículos inoculantes de baixo custo e com potencial para aplicação na agricultura têm sido alvo de intensas pesquisas

como, por exemplo, bagaço de cana, serragem, turfa derivada de cacau, casca de arroz, farelo de trigo, carvão vegetal, fosfato de rocha, pó de carvão, lignita, entre outros (PANDEY; MAHESHWARI, 2007; SILVA et al., 2009).

O mercado de produção de inoculantes nacional é um dos maiores no mundo (CHUEIRE et al., 2003; SILVA et al., 2009). Cerca de 19,5 milhões de doses de inoculantes foram comercializados no Brasil no ano de 2011 (ANPII, 2015). Não existem dados muito recentes, mas até 2003 o Brasil importava, anualmente, em média 40% de todo inoculante vendido internamente, principalmente de seus vizinhos do cone-sul. Isto evidencia, em parte, certo atraso tecnológico do país em relação a produção de insumos biológicos.

2.3.1 Inoculante para cana-de-açúcar

O inoculante para cana-de-açúcar é composto por estirpes de cinco espécies isoladas da própria cultura: *Gluconacetobacter diazotrophicus* (estirpe BR11281^T), *Herbaspirillum seropedicae* (BR11335), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BR11504), *Nitrospirillum amazonense* (BR11145) e *Paraburkholderia tropica* (BR11366^T). Todas as estirpes foram descritas pela Embrapa Agrobiologia e são bactérias capazes de fixar nitrogênio e produzir hormônios de crescimento, além de outros efeitos benéficos, como controle de algumas doenças (REIS et al., 2009d). Tem sido demonstrado que estirpes isoladas de uma espécie vegetal são mais aptas a se reestabelecer nas raízes quando inoculadas na mesma espécie vegetal (BALDANI; BALDANI, 2005).

Oliveira et al. (2006) avaliaram o efeito da inoculação dessa mesma mistura bacteriana em material micropropagado das variedades SP701143 e SP813250 e verificaram resposta positiva sobre a fixação biológica de nitrogênio atmosférico (FBN), com contribuição média de aproximadamente 30% do nitrogênio acumulado. De acordo com Schultz et al. (2012), na inoculação dessas bactérias diazotróficas na cultura da cana-de-açúcar em condições controladas e também no campo, tem se observado incremento de biomassa que, em algumas situações, pode ser comparado à adição de 120 kg de N ha⁻¹.

Em experimento de campo, Silva et al. (2009) aplicaram inoculantes formulados pela mistura das estirpes recomendadas para a cana e por polímeros carboximetilcelulose e amido, e observaram aumento na produtividade de colmos e massa de matéria seca da cultura 11 meses após o plantio. Outros estudos com inoculação da mistura das cinco estirpes em cana-de-açúcar, em fase de desenvolvimento pela Embrapa Agrobiologia em várias regiões produtoras do Brasil, indicam que esta tecnologia apresenta grande potencial na nutrição nitrogenada da cultura da cana (SCHULT et al., 2012; 2014).

Estes resultados ajudam a explicar a baixa resposta da cultura à adubação nitrogenada, especialmente no primeiro ciclo, e evidenciam a importância da contribuição da FBN para a cana-de-açúcar, não apenas para a economia de fertilizantes nitrogenados, mas também para a preservação do meio ambiente (BALDANI et al., 2009).

A estimativa de economia pelo uso de organismos diazotróficos em lavouras de cana-de-açúcar brasileiras com a substituição de 50% da dose recomendada de N fertilizante (60 kg N ha⁻¹), representaria uma economia de 150.000 Mg de N por ano, que corresponderia a 735 milhões de reais, tornando os derivados da cultura (etanol e açúcar) ainda mais competitivos no mercado internacional, além de contribuir na preservação do meio ambiente (REIS et al., 2008; REIS et al., 2009d; OLIVER, 2014).

2.4 Caracterização do Gênero *Herbaspirillum*

O gênero *Herbaspirillum* pertence à Família *Oxalobacteraceae* dentro da classe β do Filo Proteobacteria, apresentando células com coloração Gram negativa, geralmente com formato vibrióide, mas dependendo das condições de crescimento podem ser espiraladas, com diâmetro de aproximadamente 0,6 a 0,7 μm . O comprimento das células depende do meio de cultura e varia de 1,5 a 5,0 μm . São móveis na presença de oxigênio, usando de um a três flagelos em um ou ambos os polos. A temperatura ótima de crescimento é de 30 a 34°C e o pH ótimo de 5.3 a 8.0 (BALDANI et al., 1986). Micro-organismos desse gênero são denominados diazotrofos endofíticos obrigatórios, pois apresentam baixa sobrevivência no solo (Baldani et al., 1997).

Atualmente, o gênero *Herbaspirillum* possui onze espécies descritas, mas apenas três são fixadoras de nitrogênio atmosférico: *Herbaspirillum seropedicae* (BALDANI et al., 1986), *H. rubrisubalbicans* (BALDANI et al., 1996) e *H. frisingense* (KIRCHHOF et al., 2001). As espécies *H. seropedicae* estirpe BR11335 e *H. rubrisubalbicans* estirpe BR11504 são recomendadas para a inoculação em cana-de-açúcar, as quais apresentaram, em diversos estudos realizados, grande concentração no interior da planta, principalmente nas raízes, e contribuições significativas no aporte de N para a cultura (OLIVEIRA et al., 2002). Essas espécies são capazes de colonizar os tecidos internos das raízes, caules e folhas de gramíneas sem causar patogenicidade para a maioria das variedades, mas sim benefícios como a fixação de nitrogênio e produção de fitormônios, por exemplo (BOA SORTE, 2013).

2.4.1 *Herbaspirillum seropedicae*

A espécie *Herbaspirillum seropedicae* foi a primeira a ser descrita do gênero por Baldani et al. (1986). Foi isolada de raízes lavadas e esterilizadas de milho, sorgo e arroz. *H. seropedicae* é promotora do crescimento vegetal e melhora a produtividade através da fixação de nitrogênio e da produção de fitohormônios (BALDANI et al., 1995). Assim como descrito para o gênero, as células de *H. seropedicae* possuem diâmetro de 0,6 a 0,7 μm , comprimento variando de 1,5 a 5,0 μm e podem apresentar de um a dois flagelos por polo como mostra a Figura 1 (BALDANI et al., 1986).

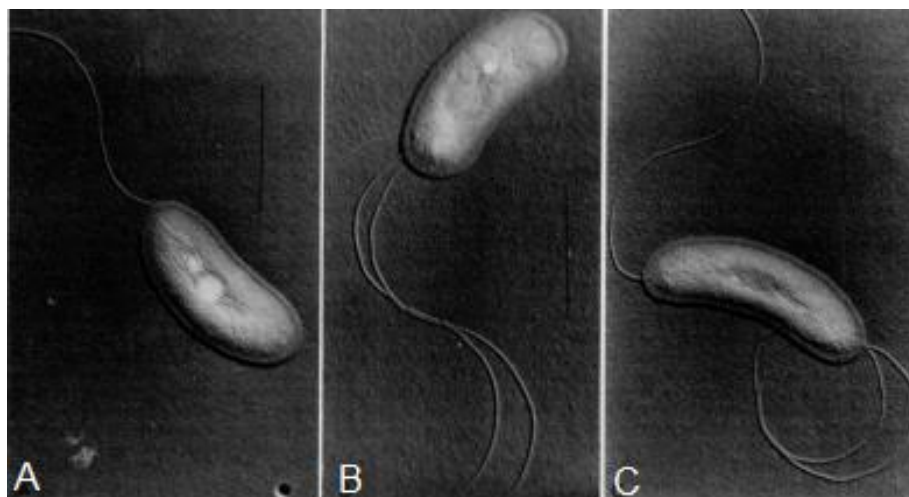


Figura 1 Microscopia eletrônica das células da bactéria *Herbaspirillum seropedicae* crescida em Agar nutriente. a) presença de um flagelo em um pólo; b) dois flagelos em um pólo; c) bactéria com três flagelos (Adaptado de BALDANI et al., 1986).

Ao contrário dos organismos diazotróficos que habitam a rizosfera e que necessitam competir com a microflora do solo por fontes de carbono, os organismos diazotróficos endofíticos, como *H. seropedicae*, podem ser encontrados no interior dos tecidos das plantas, ambientes protegidos. Isto pode explicar a alta contribuição da fixação biológica de nitrogênio (OLIVARES et al., 1996).

Essa espécie já foi isolada de diversas culturas, tais como cana-de-açúcar, arroz, milho, sorgo e gramíneas forrageiras. A Embrapa recomendou como inoculante a estirpe BR11335, juntamente com outras espécies, para a cultura da cana-de-açúcar, em 2008 (REIS, et al., 2009d), e a estirpe BR11417, para a cultura do milho, em 2009 (REIS, et al., 2009b). Diversos trabalhos científicos já demonstraram os incrementos que estas proporcionam às culturas. Dotto e colaboradores (2010) constataram que a inoculação com *H. seropedicae* resultou em incremento de 8,6% na produtividade do milho. Ferreira et al. (2010), observaram que a inoculação da estirpe ZAE 94 (BR11417) de *H. seropedicae* em plantas de arroz resultou aumento em até 13% da produtividade e 19% do N-total dos grãos. Em estudo mais recente, Breda et al. (2016) concluíram que a inoculação em milho de *H. seropedicae*, estirpe BR11417, nos híbridos simples de milho BRS 1030 e BRS 1060, favorece o acúmulo de P nos grãos, mas tem efeito positivo sobre a produtividade somente em combinação com doses de N mineral, o que indica que seu efeito é mais destacado na promoção de crescimento do que na fixação biológica de nitrogênio. Na associação de inoculação de *Azospirillum brasilense* (estirpe Ab-V5) e *Herbaspirillum seropedicae* (estirpe SmR1) na cultura do milho, Dartora e colaboradores (2013) observaram incrementos de 12% na matéria seca da parte aérea e 7% na produtividade em relação à testemunha, indicando benefícios da combinação de bactérias diazotróficas que interagem de forma diferenciada com a planta.

Na inoculação individual de *H. seropedicae*, estirpe BR11335, nas variedades RB867515 e IACSP95-5000 de cana-de-açúcar, Chaves et al. (2015) observaram aumento da massa seca da parte aérea da var. IACSP95-5000. Na inoculação de *H. seropedicae* em minitoletes da variedade RB72454 de cana, tratados termicamente, Marques Junior et al. (2008) também observaram aumento significativo de massa seca da parte aérea após 45 dias de cultivo em casa de vegetação.

2.4.2 *Herbaspirillum rubrisubalbicans*

A bactéria *Pseudomonas rubrisubalbicans* foi reclassificada em 1996 por Baldani et al. como uma nova espécie do gênero *Herbaspirillum* renomeada, então, para *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. A espécie coloniza as raízes, caules, e principalmente folhas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) e é capaz de fixar nitrogênio (Figura 2).

H. rubrisubalbicans tem sido encontrada em associação com cana-de-açúcar e raízes de *Digitaria insularis* crescida no interior dos canaviais (OLIVARES et al., 1996; SILVA, 2009). Esta espécie causa a doença da estria mosqueada na variedade norte americana B-4362 de cana-de-açúcar e estrias vermelhas em variedades de sorgo. O nome da espécie deriva de *ruber*, vermelho, e *subalbicans*, esbranquiçado, uma referência ao sintoma da doença, caracterizada pelo desenvolvimento de estrias vermelhas com manchas brancas nas folhas de cana de-açúcar (OLIVARES et al., 1997; BALSANELI, 2007). A estria mosqueada é uma doença de pouca importância econômica, que apenas diminui a área fotossintética e a vida útil da folha (CHRISTOPHER & EDGERTON, 1992; OLIVARES et al., 1997).

A maioria dos trabalhos que utilizam a estirpe BR11504 (ou HCC103) para inoculação em cana-de-açúcar, a inocula juntamente com as demais estirpes recomendadas para o inoculante da cultura. Porém, alguns trabalhos demonstraram o efeito dessa espécie inoculada individualmente. Chaves et al. (2015) concluíram que a inoculação individual da BR11504 aumenta o índice de velocidade de brotação nas variedades de cana RB867515 e IACSP95-

5000 e promove aumento de massa seca da parte aérea da var. IACSP95-5000. Além disso, a *H. rubrisubalbicans* e *H. seropedicae* são as com maior produção de compostos indólicos entre as cinco estirpes avaliadas neste trabalho.



Figura 2. Célula de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (cedida por OLIVARES, F.O. em GARRITY, 2005)

Lambais et al. (2001) relataram que a presença das bactérias endofíticas *Gluconacetobacter diazotrophicus* ou *Herbaspirillum rubrisubalbicans* em cana-de-açúcar induziu a expressão de genes relacionados ao sistema de defesa vegetal. Essa indução pode ser observada por meio da super-expressão de genes que codificam proteínas relacionadas à defesa como quitinases, β^{-1} ,3-glucanases, fenilalanina amônia liases (PAL), chalcona sintases, chalcona isomerases, isoflavona redutases, glicoproteínas, peroxidases, catalases, superóxido dismutases, fatores de transcrição similares a WRKY e proteínas envolvidas no controle de morte celular programada.

2.5 Bioprocessos

A Biotecnologia é um ramo da ciência que estuda e desenvolve tecnologias a partir de processos realizados por ação de organismos vivos ou parte deles denominados bioprocessos. A disponibilização de novos produtos e insumos biológicos em ampla escala para a agricultura, incluindo inoculantes, deve ser vista além do processo de escolha dos microrganismos adequados. A eficiência e a produtividade dos bioprocessos devem ser considerados pois são componentes importantes para viabilizar um produto, e se relacionam diretamente com os processos de conversão e o estabelecimento das condições operacionais ideais dos sistemas de cultivo, condicionamento e estabilização biológica (SOARES et al., 2011).

A condução de um bioprocessos ocorre em biorreatores de diferentes escalas, também chamados de fermentadores, na indústria. Entende-se por biorreatores convencionais tanques providos de dispersor de gás e agitador mecânico, constituído de motor, eixo e impelidores (BADINO JR.; SCHMIDELL, 2001). Os processos de produção podem ser descontínuos, semicontínuos, descontínuos alimentados (*fed-batch*) ou contínuos (SCHMIDELL; FACCIOTTI, 2001). Nas indústrias de inoculante, os biorreatores geralmente são conduzidos por cultivo descontínuo (ou em batelada), que consiste em duas fases: a de esterilização e a de

inoculação. Após a inoculação do volume específico de meio, com o inóculo selecionado e na densidade celular determinada, acompanha-se o processo observando ou controlando parâmetros, tais como pH, aeração e agitação. O acompanhamento do processo é feito até atingir o máximo de crescimento celular ou produção do metabólito de interesse (SINGH; KAPOOR, 2010; WAITES et al., 2001; SOUSA, 2011).

De acordo com Badino Jr. e Schimidell (2001), o desenvolvimento de processos fermentativos acontece, habitualmente, em três estágios: escala de bancada, escala piloto e escala industrial. A escala de bancada é aquela que ocorre no início dos estudos do processo fermentativo, quando se tem pouca ou nenhuma informação acerca do processo. Esse estágio é realizado em laboratórios de pesquisa, onde a obtenção de biomassa de micro-organismos, ou outro produto de interesse, é realizada em frascos pequenos, como erlenmeyers, cujos volumes variam entre 125 mL a 2,0 L ou em biorreatores de bancada, que apresentam pequenos volumes que variam de 2,0 a 7,0 L. Ainda de acordo com os autores, devido a maior flexibilidade e menores custos dos ensaios em escala de bancada, dados básicos sobre o processo devem ser explorados no maior nível de detalhamento possível. Alguns exemplos de informações a serem obtidas nesse estágio são: melhores micro-organismos a serem utilizados, meio de cultura ideal, otimização de parâmetros de crescimento como temperatura e pH, assim como a melhor forma de operação dos biorreatores.

Apesar das fermentações em escala de bancada poderem ser realizadas em vidrarias incubadas em agitadores orbitais (também conhecidos como shaker) e em biorreatores, esses procedimentos diferem significativamente entre si, principalmente pelo maior controle das condições de crescimento oferecido pelo biorreator, como temperatura, agitação, pH e aeração, ao passo que agitadores orbitais só oferecem controle de agitação e temperatura. Tendo em vista que a maioria dos processos fermentativos de interesse biotecnológicos são aeróbicos, o controle de aeração se torna um parâmetro imprescindível em bioprocessos. Portanto, geralmente os ensaios são realizados em um primeiro momento em Erlenmeyer e depois, aprimorado em biorreator de bancada. Se os resultados forem satisfatórios e viáveis economicamente, inicia-se o estágio de escala piloto (BADINO JR.; SCHIMIDELL, 2001).

A escala piloto visa a reprodutibilidade das condições fixadas na escala de bancada. Esse estágio é mais oneroso em relação ao anterior e, portanto, objetiva especialmente o teste de ampliação de escala e não o estudo da influência dos fatores. Finalmente, a escala industrial, devido a própria dimensão, visa o lado econômico do processo, ou seja, a produção em larga escala (BADINO JR.; SCHIMIDELL, 2001).

Em escala industrial, a produção de bioprodutos, entre eles os inoculantes agrícolas, se dá por meio de uma série de etapas que caracterizam um bioprocessos. Cada bioprocessos possui suas peculiaridades, mas, de forma geral, as etapas a serem seguidas são: o tratamento da matéria-prima, o preparo dos meios de propagação e produção, a esterilização do substrato, quando necessário, a transformação do substrato em produto e posterior separação e purificação destes e tratamento dos resíduos e efluentes (PEREIRA JR. et al., 2008).

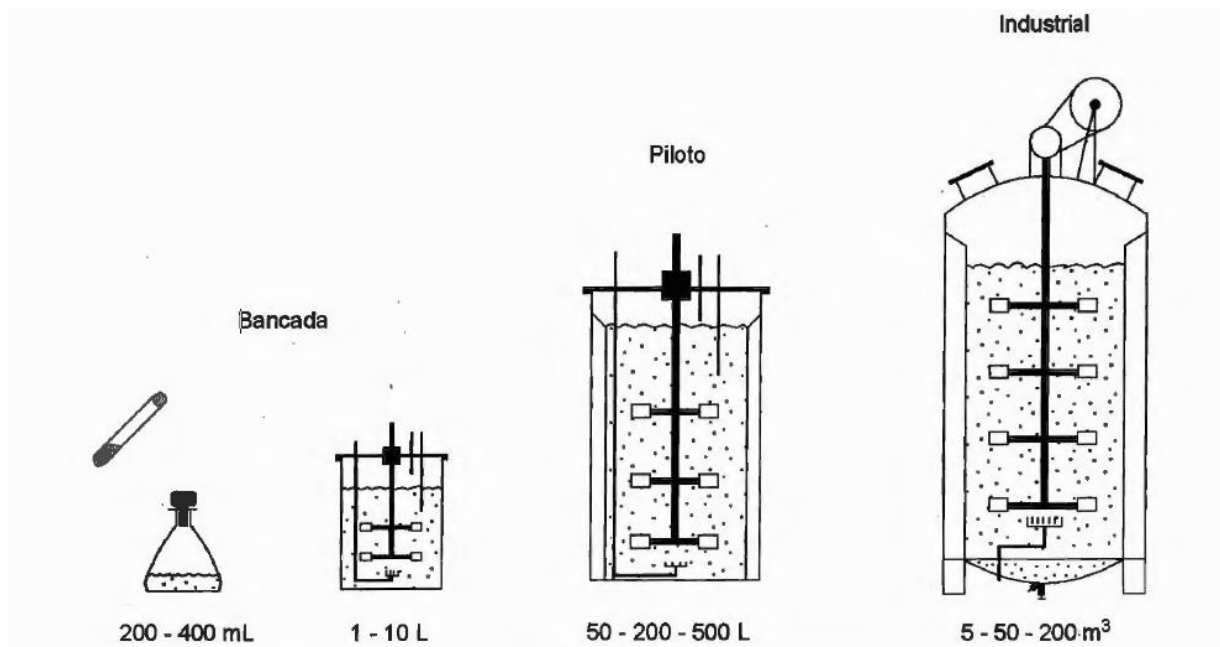


Figura 2 Escalas de trabalho no desenvolvimento de processos fermentativos (Adaptado de BADINO JR; SCHIMIDELL, 2001)

Ponto essencial para um bom desenvolvimento de um bioprocesso referente tanto à produção, quanto aos custos é o meio de cultivo a ser empregado, ponto observado ainda na escala de bancada. A elaboração do meio fermentativo exige que sua composição atenda às necessidades nutricionais do micro-organismo a ser cultivado. Para isso, é necessário a adição de fontes de carbono, nitrogênio, fatores de crescimento, vitaminas, entre outros componentes. Diversos estudos são realizados para a otimização de meios de cultura, o que implica na combinação dos componentes e suas quantidades que reflitam no melhor custo/benefício para o processo, ou seja, maior produção em menor custo. Em estudo de otimização dos parâmetros de produção de biomassa de *Azospirillum amazonense* (BR 11145) (hoje denominada de *Nitrospirillum*) para incorporação em inoculantes agrícolas, Fernandes (2013) simplificou o meio de cultura utilizado para a produção em larga escala dessa estirpe, alcançando uma redução do número de componentes de 7 (do meio DYGS) para apenas 4 componentes nutricionais e monetariamente significativos para a produção de biomassa e compostos indólicos. Nesse estudo foi possível reduzir em 66,4% os custos da matéria prima, além de aumentar, aproximadamente, em 66,7% a capacidade de produção de biomassa celular.

As pesquisas de otimização de produção de inoculantes, no Brasil, ao longo dos anos, foram realizadas de forma mais concentrada para atender às leguminosas. Recentemente, estudos têm sido elaborados visando os inoculantes para as gramíneas, porém ainda são incipientes para se estabelecer produções eficientes de inoculantes em escala industrial. As espécies *Herbaspirillum seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* compõem o inoculante misto para a cana-de-açúcar da EMBRAPA, mas poucas são as informações que possibilitem cultivos nas indústrias das estirpes recomendadas de forma eficiente. Portanto, se faz necessário que estudos estabeleçam condições otimizadas para o cultivo destas bactérias visando produção de inoculantes em escala industrial com menores gastos e maior produtividade.

2.5.1 Aeração e agitação dos processos fermentativos

Entre os processos biotecnológicos de interesse industrial, envolvendo o cultivo de células microbianas, sem dúvida os processos conduzidos em aerobiose encontram uma situação de enorme destaque. Assim, por exemplo, a produção de antibióticos, enzimas, vitaminas, fermentos e inoculantes, proteínas recombinantes (hormônios de crescimento, insulina; etc.), constitui em sua grande maioria processos aeróbios (SCHIMIDEL, 2001).

Na cadeia respiratória, o oxigênio (O_2) é o aceptor final de elétrons e, portanto, está relacionado com geração de energia para a produção de moléculas que dão suporte à sobrevivência das células e também à geração de novas células. Logo, um sistema de cultivo com altas taxas de crescimento microbiano, resultará em rápido consumo dos nutrientes essenciais, assim como do oxigênio dissolvido no meio de cultivo para suprir a alta necessidade de energia para o crescimento e proliferação das células.

Com base nessa dinâmica, é fácil perceber a importância e influência da aeração nos processos fermentativos. Para Prade et al. (2001) nos processos fermentativos o fator limitante decisivo é o fornecimento de oxigênio ao meio, devido à sua baixa solubilidade em água. A concentração de oxigênio dissolvido na saturação é apenas da ordem de $7 \text{ mg } O_2 \text{ L}^{-1}$ (7 ppm), ao se borbulhar ar atmosférico à pressão de 1 atm a 35°C (SCHIMIDEL, 2001). Além disso, esse elemento precisa vencer várias barreiras para sair da bolha de ar, atravessar o meio de cultura e ser assimilado pelo micro-organismo. Toda essa resistência, reflete na taxa de crescimento celular, pois influencia diretamente na velocidade de chegada do O_2 até a célula. Parece óbvio imaginar que, então, basta fornecer a maior quantidade de ar possível na fermentação. Porém, grandes quantidades de ar, dependendo do organismo, podem causar efeitos contrários, perturbando as células e inibindo o crescimento celular.

De acordo com Oldshue (1997), a mistura do fluido é de fundamental importância em bioprocessos, sendo que em cultivos aeróbios essa é uma operação crítica, pois dela depende em grande parte a transferência de oxigênio. Logo, para fornecer condições ideais de crescimento, os parâmetros que influenciam nos micro-organismos, devem ser visto como um conjunto e não avaliados isoladamente. A transferência de oxigênio para as células depende de vários fatores, mas a aeração e agitação merecem destaque.

Os efeitos benéficos do aumento da agitação estão relacionados ao aumento da transferência de nutrientes e oxigênio do meio para o microorganismo (PAPAGIANNI et al., 2001), pois em constante movimento os componentes do meio de cultivo ficam uniformemente distribuídos, sempre em contato com as células. Todavia, esse aumento de agitação deve ser moderado, pois nem todos os organismos conseguem se adaptar às condições extremas. Casas et al. (2000) aplicaram alta velocidade de agitação (800 rpm) em seus experimentos e observaram pouco crescimento celular e baixa produção de xantana, provavelmente causados por danos celulares devido ao estresse hidrodinâmico. Além da não adequação dos micro-organismos, algumas pás de agitação, em altas rotações, podem causar cisalhamento significativo das células, diminuindo também a obtenção de biomassa.

2.6 Co-cultivo de Micro-organismos

No habitat natural, os micro-organismos estão em constante interação, principalmente em áreas amplamente colonizadas. Uma estratégia utilizada para mimetizar o ambiente microbiológico natural é cultivar um micro-organismo em presença de outro (CHAGAS, 2010).

A técnica de co-cultivo, cultura mista ou cultivo simultâneo é empregada, geralmente, para obtenção de metabólitos secundários produzidos por determinado indivíduo em maiores quantidades ou apenas quando associado de forma simbiótica ou competitiva a outro. Um

importante exemplo de associação simbiótica ocorre entre a bactéria *Burkholderia* sp. e o fungo *Rhizopus* sp.. Durante muito tempo esse fungo foi considerado o produtor de rizoxina, o composto causador da podridão do arroz. No entanto, foi verificado que, na verdade, é a bactéria endossimbionte responsável pela biossíntese dessa substância (PARTIDA-MARTINEZ; HERTWECK, 2005; CHAGAS, 2010).

A maioria dos estudos que utilizam cultivo misto de micro-organismos interessam-se em obter metabólitos secundários que, geralmente, só são expressos nessas condições ou apresentam produção acentuada. Porém, uma nova finalidade do uso de co-cultivo de micro-organismos pode ser utilizada: a de produção de inoculantes. Como se sabe, o inoculante formulado para a cultura da cana-de-açúcar pela Embrapa conta com cinco espécies de bactérias diazotróficas, a saber: *Gluconacetobacter diazotrophicus* (estirpe BR11281), *Herbaspirillum seropedicae* (BR11335), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BR11504), *Azospirillum amazonense* (BR11145) e *Burkholderia tropica* (BR11366) (REIS et al., 2009d). Em escala industrial, para o cultivo das cinco estirpes individuais seriam necessários cinco biorreatores, o que pode se tornar um procedimento inviável economicamente. Além disso, não há muitos estudos acerca dos parâmetros necessários para a produção dessas estirpes em larga escala. O sucesso no cultivo misto dessas estirpes resultaria em grande otimização para a produção do inoculante, o qual já apresenta dados de sua eficiência. Devido à grande população de bactérias dos gêneros *Herbaspirillum*, naturalmente presentes na cultura da cana-de-açúcar, considera-se que as estirpes BR11335 e BR11504 possuem afinidade e podem coexistir em um mesmo cultivo.

2.7 PCR em Tempo Real

A reação de polimerase em cadeia (Polymerase Chain Reaction - PCR) é uma técnica que permite a amplificação de ácidos nucleicos específicos, onde utilizam-se dois oligonucleotídeos sintéticos denominados *primers* ou iniciadores, que são complementares a duas regiões específicas do DNA alvo a ser amplificado (GARCÊS e LIMA, 2004). Essa técnica foi desenvolvida nos anos 80 pelo bioquímico Kary B. Mullis, que em 1993, recebeu o prêmio Nobel de Química devido ao grande potencial do trabalho desenvolvido (NOVAIS et al., 2004; CAMARGO, 2015).

Uma PCR convencional é composta por três fases: desnaturação, anelamento e extensão. Na primeira fase ocorre a desnaturação da dupla fita de DNA com a quebra das ligações de hidrogênio devido a elevação de temperatura na faixa de 94 a 96°C. Após, inicia-se a etapa de anelamento dos iniciadores (*primers*) a trechos da fita simples de DNA, que ocorre na faixa de temperatura de 57 a 63°C. Para finalizar o ciclo, acontece a fase de extensão, onde a enzima Taq DNA polimerase sintetiza novas fitas de DNA utilizando os desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTP's). As fases descritas, geralmente, se repetem por 30 a 40 ciclos para cada reação, onde ocorre um crescimento exponencial das moléculas de DNA, conferindo um número de cópias igual a 2^n , onde n representa o número de ciclos da reação (CAMARGO, 2015).

A PCR em tempo real (qPCR) é derivada da PCR convencional e representou um salto tecnológico para a pesquisa, devido a sua grande sensibilidade de detecção e a possibilidade de monitorar em tempo real a geração dos produtos da PCR (ANDERSEN et al., 2006; LIPP et al., 2005; VALASEK; REPA, 2005; PEREIRA, 2014). Em relação à PCR convencional, a qPCR apresenta a vantagem do processo de amplificação, detecção e quantificação do DNA ocorrerem em etapa única, reduzindo tempo de análise e risco de contaminação das amostras. Além disso, a qPCR é um método mais preciso (MACKAY et al.; 2002).

A qPCR possui as mesmas etapas de uma PCR convencional, porém, o que as difere é que na qPCR há a utilização de um reagente fluorescente que se liga ao fragmento alvo de

DNA e ao emitir fluorescência esta é captada pelo termociclador, permitindo monitorar a concentração do fragmento em tempo real (VALASEK; REPA, 2005; ZHANG, T.; FANG, 2006; PEREIRA, 2014). Os reagentes fluorescentes mais utilizados na PCR em Tempo Real são os corantes intercalantes e as sondas de hibridização (LIPP et al., 2005). O corante mais utilizado é o SYBR Green, pois apresenta vantagens como baixo custo, facilidade na utilização, alta sensibilidade (NOVAIS et al., 2004; CAMARGO, 2015).

De acordo com Pereira (2014), as fases de cada reação seja por PCR convencional, seja por qPCR, são: fase lag (nessa fase ainda não houve amplificação suficiente, ocorrendo apenas uma flutuação que corresponde ao sinal do ruído de fundo), fase exponencial (onde a quantidade de produtos de amplificação dobra a cada ciclo, com aumento contínuo do sinal fluorescente) e fase de platô (fase final da reação devido a não haver mais aumento do número de produtos).

A fase exponencial é considerada a melhor para o estudo da reação devido à elevada eficiência registrada. O C_T (*cycle threshold*) equivale ao número de ciclos necessários para que a fluorescência seja detectável (OLIVEIRA, 2010). Seu valor mínimo dependerá da quantidade de moléculas presentes no início do processo de amplificação, logo, um menor número de moléculas iniciais requer maior número de ciclos para gerar um aumento exponencial do sinal da fluorescência que seja significativamente superior à *baseline* (HEID et al., 1996; KUBISTA et al., 2006; MACKAY et al., 2007; PELT-VERKUIL et al., 2008, OLIVEIRA, 2010), limite mínimo de detecção de fluorescência (ruído de fundo).

A eficiência da amplificação pode ser calculada pela equação: $E = 10^{(-1/\text{declive})-1}$, onde o declive corresponde ao coeficiente angular da equação da curva padrão. A curva padrão é elaborada para análise quantitativa absoluta dos resultados. A qPCR oferece dois métodos de análise quantitativa: uma análise relativa (método do $\Delta\Delta C_t$) ou uma análise absoluta (com uso da curva padrão) (BUSTIN, 2000; CARVALHO et al., 2010; SILVA, 2014). Para estudo de micro-organismos sob sistema de co-cultivo, considera-se mais adequada a quantificação absoluta, para isso, é necessária, então, a construção de uma curva padrão correspondente a cada par de iniciadores utilizados na qPCR. Para tal, é feita uma diluição seriada do material a ser trabalhado. Essas amostras são submetidas à qPCR utilizando os iniciadores de interesse e, por fim, relaciona-se o C_T dessas amostras com o Log_{10} do número de cópias de DNA. É gerada uma reta, e por meio da equação da reta é possível calcular a eficiência de amplificação, citada anteriormente, e quantificar o DNA das amostras desconhecidas. Vale ressaltar, que esta técnica não é utilizada apenas para quantificação de DNA, mas também para quantificação de RNA, estudos de expressão gênica, entre outros.

O desenho de *primers* para PCR é o passo chave para uma reação bem sucedida. Para tal, é necessário respeitar algumas regras (tamanho, composição, T_m) ou utilizar programas específicos para o desenho (SAMBROOK et al., 2001; GARCÊS; LIMA, 2004).

Considerando a sensibilidade de detecção da PCR em tempo real, esta técnica se torna viável na utilização para identificação e quantificação de micro-organismos sob de sistema de co-cultivo, viabilizando, assim, o desenvolvimento do presente trabalho.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Localização

Os experimentos do presente trabalho foram realizados no Laboratório de Bioprocessos (LBP) e Laboratório de Genoma, ambos no Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia (CNPAB) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), localizada no município de Seropédica – RJ.

3.2 Material Biológico

Foram utilizadas duas espécies do gênero *Herbaspirillum*: *H. seropedicae* - BR11335 (= HRC54) e *H. rubrisubalbicans* – BR 11504 (= HCC103), que se encontram depositadas na Coleção de Culturas de Bactérias Diazotróficas e Outros Micro-organismos Multifuncionais da Embrapa Agrobiologia (CCBD).

3.3 Meio de Cultura

Para o cultivo de ambas as estirpes, utilizou-se como base o meio Dextrose Yeast Glucose Sucrose – DYGS (BALDANI et. al., 2014) tanto líquido quanto sólido, porém com substituição das fontes de carbono por glicerol e de peptona bacteriológica por extrato de levedura, aqui nomeado para facilitar o entendimento de DYGS-G (anexo). O meio DYGS é considerado um meio de cultivo rico e proporciona rápido crescimento bacteriano. Para a produção de solução estoque de bactérias, utilizou-se meio JNFb (anexo) (BALDANI et. al., 2014).

3.4 Estoque de Bactérias

Como citado anteriormente, as estirpes BR11335 e BR11504 encontram-se depositadas na CCBD. Porém, para otimizar o processo de obtenção das mesmas, foi preparado estoque destas no próprio Laboratório de Bioprocessos. Inicialmente, transferiu-se uma colônia bacteriana isolada da placa de Petri fornecida pela CCBD para um tubo de ensaio contendo 5 mL de meio JNFb o qual foi incubado em *shaker* a 35 °C e 150 rpm por 24 h para a reativação das células do estoque. Decorrido este tempo, verteu-se o conteúdo do tubo para um frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 95 mL do meio DYGS líquido, o qual foi incubado nas mesmas condições do tubo. Após a fermentação, adicionou-se glicerol ao Erlenmeyer na proporção de 20% (v/v). Após mistura, o cultivo foi distribuído em microtubos Eppendorf de 2,0 mL, levados por 30 min à geladeira (~8°C) e, posteriormente, armazenados em freezer a -80°C.

3.5 Ensaio Fermentativos em Shaker

Os ensaios em shaker foram realizados com a finalidade de se obter a melhor temperatura para posterior aplicação em biorreator de bancada. Foram realizados ensaios sob as temperaturas de 30 e 35 °C, agitação controlada de 150 rpm em ambas temperaturas e utilização em todas as etapas do meio de cultura DYGS modificado com glicerol como única fonte de carbono (DYGS-G).

3.5.1 Ensaios fermentativos individuais

Para a realização dos ensaios individuais em *shaker*, preparou-se inicialmente um pré-inóculo adicionando 0,5 mL de solução estoque de bactéria a um tubo de ensaio contendo 5 mL de meio de cultivo, o qual foi incubando em *shaker* à temperatura de interesse (30 ou 35°C) e agitação de 150 rpm por 24 h. Após incubação, o conteúdo do tubo de ensaio foi transferido para erlenmeyer de 500 mL contendo 50 mL de meio de cultivo, o qual foi levado ao *shaker* nas temperaturas citadas anteriormente e 150 rpm por 12 h. Posteriormente, o conteúdo do erlenmeyer foi dividido em partes iguais e transferido para dois outros erlenmeyers de 1000 mL contendo 250 mL de meio de cultivo. Os frascos foram incubados em *shaker* sob temperatura de estudo e agitação de 150 rpm. Nesta etapa, foram realizadas leituras da densidade ótica (DO) em espectrofotômetro de UV visível da *PG Instruments* modelo *T-60* no comprimento de onda de 600 nm. A fermentação foi monitorada até que não se observasse mais desenvolvimento celular. As leituras foram realizadas em intervalos regulares de 2 h e utilizadas para a elaboração da curva de crescimento celular da estirpe em questão, relacionando tempo de crescimento e DO. Além das leituras de DO, nestes intervalos foram retiradas alíquotas de 1 mL de cada ponto de leitura para posterior quantificação de glicerol. As alíquotas foram centrifugadas por 5 min a 1500 rpm e armazenadas em freezer a -20°C.

3.5.2 Ensaios fermentativos em co-cultivo

Para este ensaio, preparou-se um pré-inóculo adicionando a tubos individuais com 5 mL de meio de cultivo, 0,5 mL de solução estoque de bactéria de cada estirpe. Os tubos foram incubados em *shaker* sob temperatura de estudo (30 ou 35°C) e agitação de 150 rpm por 24 h. Posteriormente, o conteúdo dos dois tubos foram transferidos para um mesmo Erlenmeyer com volume de 500 mL contendo 50 mL de meio de cultivo. O erlenmeyer foi levado ao *shaker* sob temperatura de estudo e agitação de 150 rpm por 12 h. Após fermentação, o conteúdo do erlenmeyer foi dividido em duas partes iguais, as quais foram transferidas para um erlenmeyer cada. Este erlenmeyer com volume de 100 mL continha 250 mL de meio de cultivo e foi levado ao *shaker* sob temperatura de interesse e 150 rpm. Nesta fase, assim como em cultivo individual, foram realizadas leituras da DO no espectrofotômetro a 600 nm em intervalos regulares de 2 h. Além das leituras de DO, foram retiradas alíquotas de 1 mL cada para posterior quantificação de glicerol e extração de DNA, onde esta última será necessária para as avaliações de PCR em tempo real (Reação em Cadeira da Polimerase Quantitativa - qPCR). As alíquotas foram centrifugadas por 5 min a 1500 rpm e armazenadas em freezer a -20°C.

3.6 Ensaios Fermentativos em Biorreator

Foi utilizado o biorreator de bancada Biostat® B-Blus da Sartorius Stedim, com capacidade de 2,0 L para os ensaios em batelada, com controle da frequência de agitação (rpm), vazão de ar ($L\ min^{-1}$), temperatura (°C) e oxigênio dissolvido (% pO₂). Todos os ensaios em biorreator de bancada foram realizados com o meio de cultura DYGS-G.

3.6.1 Ensaios fermentativos individuais

Preparou-se um pré-inóculo com a adição de 0,5 mL de solução estoque da bactéria em estudo a um tubo de ensaio contendo 5 mL de meio de cultivo. Este tubo foi incubado em *shaker* a 35°C e agitação de 150 rpm por 24 h. Posteriormente, o conteúdo do tubo foi adicionado a um erlenmeyer com volume de 500 mL contendo 50 mL de meio de cultivo, o

qual foi incubado em *shaker* também a 35°C e 150 rpm por 12 h. Após, todo seu conteúdo foi vertido no biorreator contendo 2,0 L de meio previamente esterilizado em autoclave por 40 min. Em intervalos regulares de 2 h, amostras foram retiradas para leitura da DO₆₀₀. Além destas, alíquotas de 1,0 mL foram centrifugadas por 5 min a 15.000 rpm e armazenadas em freezer a -20°C para posterior quantificação de glicerol.

3.6.2 Ensaios fermentativos em co-cultivo

Nestes ensaios também preparou-se um pré-inóculo, que consistiu em tubos individuais de cada estirpe. Estes tubos continham 5,0 mL de meio de cultivo, inoculados com 0,5 mL da solução estoque de bactéria das estirpes e foram incubados em *shaker* a 35°C e 150 rpm por 24 h. Em seguida, o conteúdo dos dois tubos foram vertidos para um mesmo Erlenmeyer com volume de 500 mL contendo 50 mL de meio de cultivo, o qual também foi levado ao *shaker* a 35°C e 150 rpm por 12 h. Após fermentação, todo seu conteúdo foi inoculado no biorreator contendo 2,0 L de meio previamente esterilizado em autoclave por 40 min. Em intervalos regulares de 2 h, amostras foram retiradas para leitura da DO₆₀₀. Foram armazenadas alíquotas de 1,0 mL para posterior quantificação de glicerol e extração de DNA. As alíquotas foram centrifugadas por 5 min a 15.000 rpm e armazenadas em freezer a -20°C.

3.7 Concentração Celular Mássica

A concentração celular mássica foi determinada por meio da técnica do peso seco, relacionando a densidade ótica a 600 nm com a concentração celular em g L⁻¹.

Inicialmente foi coletada uma solução mãe, que trata-se de uma alíquota do cultivo de cada estirpe. Essa solução mãe foi dividida e diluída em água MilliQ nas proporções de 5/6, 2/3 e 1/2. A solução mãe e as diluições foram homogeneizadas e suas densidades foram mensuradas. Posteriormente, em triplicada, adicionou-se 30 mL de solução mãe e das diluições a tubos Falcon previamente lavados, secos e com seus pesos determinados. Os tubos foram a centrífuga sob temperatura de 4°C e 4000 rpm por 10 min. Após, o sobrenadante dos tubos foram descartados, os pellets lavados com 5 mL de água MilliQ gelada e novamente centrifugados sob as mesma condições iniciais. Mais uma vez, descartou-se o sobrenadante e repetiu-se o processo de lavagem das células, centrifugação e descarte do sobrenadante, obtendo, ao final do processo, apenas os pellets de células. Os tubos foram levados à estufa a 65 °C por 12 h. Após esse período, o peso foi acompanhado até que se tornasse constante.

Para efetuar os cálculos para obtenção de um modelo que representasse a relação entre DO_{600nm} e peso celular, utilizou-se o *software Microsoft Office Excel* (2013) no qual foi realizada uma regressão linear para obtenção da equação da reta e o R². Por meio do coeficiente angular α , foi obtida a relação para o cálculo da concentração celular (X):

$$X = DO_{600nm} * \alpha$$

3.8 Análises Moleculares

Para a quantificação de células de cada estirpe em co-cultivo, foram aplicadas as técnicas de extração de DNA, desenho e validação de *primers* espécie-específicos e quantificação por PCR em tempo real.

3.8.1 Extração de DNA

O DNA das amostras foram extraídos com o uso do kit Wizard genomic DNA purification, de acordo com os procedimentos recomendados pelo fabricante (Promega, USA). Em seguida, realizou-se eletroforese em gel de agarose na concentração de 1% em tampão TAE novo, a 90 volt, por 90 min, o qual foi corado em brometo de etídio (EtBr) e observado em transluminador com luz ultravioleta. A concentração das amostras de DNA foram quantificadas no Thermo Scientific NanoDrop™ (Wilmington, DE, USA) e armazenadas em freezer a -20°C.

3.8.2 Desenho e validação de *primer*

Foram desenhados iniciadores (*primers*) para a quantificação total do DNA genômico das estirpes no sistema de co-cultivo. O genoma de cada uma foi fragmentado em sequências de 500pb, denominadas contigs, os quais foram comparados com genomas de organismos depositados no banco NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e, a partir desta comparação, foram selecionados aqueles contigs exclusivos do genoma das estirpes em estudo, que também foram contrastados entre si. Com auxílio dos softwares *Primer3plus* e *Oligo Explorer* foram desenhados pares de *primers* (forward e reverse) com bases nos contigs selecionados para as estirpes BR11335 e BR11504.

Para a validação dos *primers* desenhados, foi realizada PCR convencional com DNA genômico das cinco estirpes que compõem o inoculante para a cana-de-açúcar. A PCR convencional foi preparada para volume final de 25 µL. Nas condições de reação testou-se diferentes temperaturas de anelamento na faixa de 54 a 60°C, diferentes concentrações de MgCl₂ (50 nM) e os efeitos da aplicação de Tween 20 a 2%.

3.8.3 qPCR em tempo real

A PCR em tempo real (qPCR) foi realizada com a utilização do equipamento 7500 *Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). As reações foram preparadas em microplaca de 96 poços em duplicata biológica e triplicata técnica com volume total de 15 µL utilizando o kit GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, USA). Para BR11335 cada reação foi composta por: 7,5 µL do kit, 1,2 µL de Tween 20 a 2%, 0,3 µL de cada *primer* HRC54*phageEndo*, 0,7 µL de H₂O para PCR e 5 µL de cada amostra a ser quantificada. Para BR11504 cada reação foi composta por: 7,5 µL do kit, 0,3 µL de cada *primer* HCC103c1870, 1,9 µL de H₂O para PCR e 5 µL de cada amostra a ser quantificada. No funcionamento do equipamento utilizou-se as seguintes condições: 95°C por 3 min seguido por 40 ciclos envolvendo desnaturação a 95°C por 3 min, anelamento e aquisição de fluorescência a 60°C por 45 s.

Para análise dos resultados, elaborou-se uma curva padrão para cada estirpe por meio de diluição seriada de seu DNA, nas concentrações de 10³ a 10⁻¹ ng µL⁻¹. Essas amostras foram submetidas, em triplicata técnica, à qPCR e, ao final da reação, relacionou-se o log do número de cópias (equação 1) de cada amostra com seu respectivo valor de Ct médio apresentado, gerando, assim, uma equação da reta dando suporte para a quantificação absoluta da concentração de DNA das qPCR's com amostras em co-cultivo.

$$\text{Número de cópias (moléculas)} = \frac{X(\text{ng}) * 6,0221 * 10^{23} (\text{moléculas/mol})}{N(\text{pb}) * 660 \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right) * 1,0 * 10^9 (\text{ng/g})} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

X = massa de DNA utilizado na reação em nanograma (ng);

$6,0221 \cdot 10^{23}$ = constante de Avogadro;

N = tamanho do amplicon dsDNA em pares de base (pb);

660 = massa média de 1 pb dsDNA;

$1,0 \cdot 10^9$ = constante para conversão da massa do amplicon dsDNA de grama para nanograma.

Ao final da elaboração das curvas padrão, calculou-se a eficiência (E) de amplificação dos *primer* utilizados, por meio da seguinte equação:

$$E = 10^{-\left(\frac{1}{\text{slope}}\right)} - 1 \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

slope: valor de inclinação da reta da curva padrão.

3.9 Análise Estatística

Os resultados da PCR em tempo real foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste *t* de Student ($\alpha = 0,05$) no software Sisvar 5.6 (FERREIRA, 2008). O delineamento foi o inteiramente casualizado, em duplicata biológica e triplicata técnica, em esquema de parcela subdividida no tempo. Nas parcelas foram avaliados 2 níveis de aeração ($5,0$ e $6,0 \text{ L min}^{-1}$) e nas subparcelas, 8 tempos de coleta ao longo da fermentação (0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 e 28 horas). As variáveis avaliadas foram o Log_{10} (cópias de DNA) das estirpes BR11335 de *Herbaspirillum seropedicae* e BR11504 de *H. rubrisubalbicans*. A normalidade e homogeneidade dos dados foram testados com auxílio do software R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2008).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Buscando a obtenção dos melhores parâmetros a serem aplicados no cultivo simultâneo das estirpes BR11335 (*Herbaspirillum seropedicae*) e BR11504 (*H. rubrisubalbicans*), foram realizados ensaios fermentativos individuais em *shaker* e em biorreator de bancada a fim de avaliar diferentes condições de temperatura e aeração no cultivo e como esses parâmetros refletem no tempo de crescimento celular.

4.1 Ensaios Fermentativos Individuais em Shaker

Com a utilização do *shaker* (agitador orbital), foram realizados dois ensaios individuais em triplicata em meio DYGS-G observando a concentração de biomassa (g L^{-1}) de acordo com as condições de temperatura de 30°C e 35°C e agitação de 150 rpm, até que houvesse declínio no crescimento microbiano.

A obtenção de biomassa a 35°C foi estatisticamente superior para ambas as estirpes, com base no teste Tukey a 5% de significância (Figura 3). Olivares (1997) em estudo comparativo entre *Herbaspirillum seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* para fins taxonômicos, identificou que a temperatura ótima para o crescimento de *H. seropedicae* foi de 34°C e para *H. rubrisubalbicans*, de 30°C. Segundo o autor, seus resultados foram similares aos obtidos por Baldani et al., (1986) e Hale & Wilkie (1972 a,b). Porém, os resultados encontrados no presente estudo, apresentaram-se diferentes, principalmente para *H. rubrisubalbicans* pois foi obtida biomassa superior na temperatura de 35°C. Essa diferença pode ser devido ao meio de cultura utilizado, que difere dos trabalhos citados que utilizaram meios semi-seletivos para cada espécie, de composição complexa, adequados apenas para o cultivo em pequena escala no laboratório.

A biomassa obtida em agitador orbital para a BR11504 foi superior à obtida para BR11335, indicando um crescimento mais acelerado para BR11504 ou uma melhor adequação ao meio utilizado. Apesar dessa diferença, nota-se que o pico de obtenção máxima acontece às 24h após a inoculação para as duas.

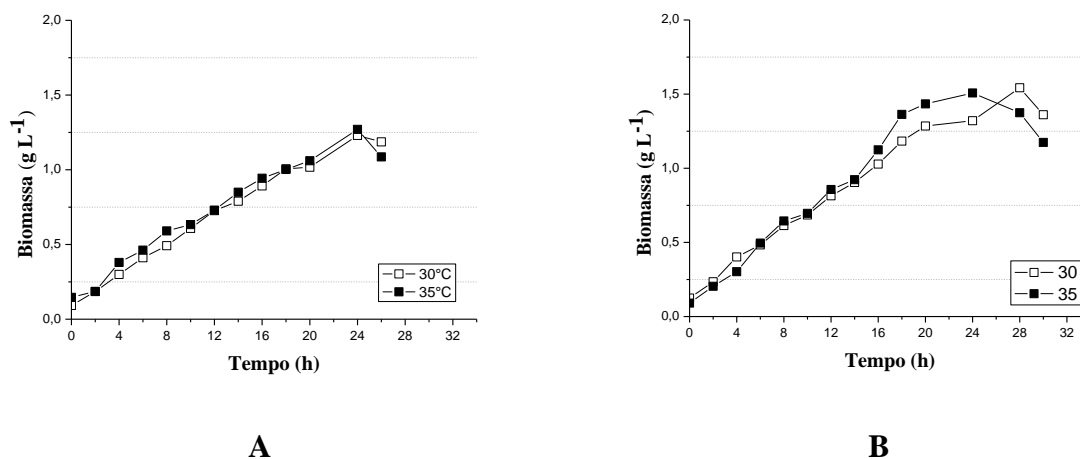


Figura 3 Crescimento celular em agitador orbital sob temperaturas de 30 e 35°C e agitação de 150 rpm (A) *Herbaspirillum seropedicae* – BR11335 e (B) *H. rubrisubalbicans* – BR11504

Os microrganismos veiculados em inoculantes para uso agrícola, quando aplicados sobre a planta ou no solo, estão submetidos a condições ambientais frequentemente pouco favoráveis em termos de temperatura e umidade, e de intensa competição por recursos e

nutrientes. Temperaturas mais altas do que as utilizadas no cultivo e armazenamento são a realidade no manuseio e aplicação dos inoculantes nas condições de campo brasileiras. Face aos resultados apresentados, optou-se pela adoção da temperatura de 35°C para os ensaios subsequentes de cultivo individual e simultâneo das estirpes em biorreator de bancada. Olivares (1997) observou ausência do crescimento de *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* nas temperaturas de 38°C e 41°C quando sob fixação de nitrogênio. Em meio suplementado com N, observou crescimento mesmo a 41°C, o que indica a sensibilidade da nitrogenase a temperaturas superiores a 38°C.

4.2 Ensaios Fermentativos Individuais em Biorreator

Os ensaios em biorreator de bancada avaliaram o crescimento celular individual das estirpes nas condições de aeração dos cultivos variando de 1,0 a 6,0 L de ar por minuto ($L\ min^{-1}$), temperatura constante de 35°C, definida nos ensaios em agitador orbital, a 150 rpm. Além destes parâmetros, foram observadas as evoluções do pH do meio e do oxigênio dissolvido (pO_2).

a) *Herbaspirillum seropedicae* – estirpe BR11335

A Figura 4 apresenta o conjunto de curvas de crescimento de todos os ensaios realizados para BR11335. Observando a biomassa média atingida, é possível perceber que não houveram grandes variações nos diferentes ensaios, mas destacaram-se as fermentações sob aeração de 3,0, 5,0 e 6,0 $L\ min^{-1}$, onde obteve-se, respectivamente 1,899 $g\ L^{-1}$, 1,897 $g\ L^{-1}$ e 2,038 $g\ L^{-1}$ de biomassa, ao passo que para as aerações de 1,0, 2,0 e 4,0 $L\ min^{-1}$ obteve-se, respectivamente, 1,520 $g\ L^{-1}$, 1,506 $g\ L^{-1}$ e 1,688 $g\ L^{-1}$ de biomassa. Apesar da biomassa média máxima nas aerações de 3,0 e 5,0 $L\ min^{-1}$ serem praticamente iguais, com 5,0 $L\ min^{-1}$ essa massa foi atingida com 22 h de fermentação, enquanto com 3,0 $L\ min^{-1}$ foi atingida com 4 horas a mais, às 26 h de fermentação, o que significa quatro horas a mais em gastos de energia. Embora tenha sido possível cultivar essa estirpe em todas as condições de aeração propostas, por meio dos gráficos é possível perceber que as aerações avaliadas foram limitantes ao crescimento das bactérias, visto que o pO_2 , a partir de 4 h de fermentação para 1, 2, 3 e 5,0 $L\ min^{-1}$ e partir de 6 h para as aerações de 4 e 6,0 $L\ min^{-1}$ manteve-se em torno de 0% até o final dos ensaios, indicando, portanto, que as bactérias consumiam todo o oxigênio dissolvido disponível, mesmo ao atingir a fase estacionária e de declínio.

Em ensaio sob as condições de 35°C de temperatura, agitação de 150 rpm e aeração de 4,0 $L\ min^{-1}$ para a BR11417 de *H. seropedicae*, Scheidt (2015) observou um valor médio máximo para biomassa de 3,145 $g\ L^{-1}$ e para compostos indólicos de 11,621 $mg\ L^{-1}$, porém a um nível mínimo de pO_2 de 30%, ou seja, excesso de O_2 , diferente do observado para a BR11335. Isso pode estar relacionado com diferença do metabolismo das estirpes e a eficiência do uso de energia celular, pois no trabalho de Scheidt (2015), havia praticamente o dobro de biomassa e ainda assim um excesso de oxigênio dissolvido, logo, a estirpe BR11335 representa ser mais exigente no requerimento de O_2 , mas não se pode descartar a hipótese de que outros parâmetros possam ter influência nessa resposta de crescimento. Além disso, o autor observou que a produção máxima de compostos indólicos em todos os ensaios realizados, sob diferentes condições de aeração, coincidiu com os menores níveis de pO_2 na fermentação e, quando o nível de oxigênio aumentou, os indólicos foram degradados.

Outros estudos já verificaram também que *H. seropedicae* apresenta a capacidade de estimular o crescimento diferencial de plantas através da produção de metabólitos como auxina, giberelinas e etileno (BABALOLA, 2010; BRUSAMARELLO-SANTOS et al., 2012;

MONTEIRO, et al., 2012). Se esse comportamento for reproduzido para os ensaios com a estirpe BR11335, os compostos indólicos produzidos podem estar presentes no meio por mais tempo nas fermentações avaliadas, visto que os níveis de O₂ são baixos praticamente em toda a fermentação. Outro fator que dá indício para esta afirmação é a evolução do pH dos ensaios, que se inicia em média de 6,3 e, em todos os ensaios, ao cair os níveis de oxigênio dissolvido, se eleva para, em média, 7,5. Esse comportamento supõe a produção de algum metabólito que acidifica o meio e que, provavelmente, só é degradado quando o crescimento celular atinge a fase estacionária, pois o pH se reestabelece para a faixa de 6,5, em média.

O ensaio com maior obtenção de biomassa, entre os avaliados, foi o com aeração de 6,0 L min⁻¹ e também apresentou a maior oscilação de pH. Nos ensaios com aeração de 1, 3, 4 e 6,0 L min⁻¹ percebe-se a ocorrência de uma segunda fase de crescimento exponencial. Essa segunda fase foi caracterizada por meio da observação de, após a primeira fase de crescimento exponencial, uma rápida fase estacionária seguida por incremento na biomassa.

O início dessa segunda fase coincide, na maioria das curvas, com a acidificação do meio após uma rápida elevação inicial do pH da fermentação. Fernandes (2013) também observou esse fenômeno no cultivo de *Azospirillum amazonense*, estirpe BR11145, em biorreator de bancada e o relacionou com alterações na curva de consumo da fonte de carbono glicose. As alterações, nesse caso, foram caracterizadas pela formação de metabólitos redutores detectados juntamente com a glicose pelo método DS, os quais, provavelmente, foram responsáveis pelo incremento da biomassa a partir da nova etapa de crescimento.

Para este estudo, foram elaboradas curvas de consumo do glicerol nos ensaios pelo método de HPLC (dados não informados), as quais demonstraram que não houve consumo total da fonte de carbono, e, portanto, descarta-se a hipótese de limitação pelo glicerol. Fernandes (2013) ainda afirmou que, de acordo com Gobel & Krieg (1984), a *A. amazonense* tem como produtos finais de cultivo, além de CO₂ e H₂O, compostos como ácidos orgânicos, principalmente, acético, láctico, glioxálico, málico, 2-oxoglutárico e β-hidroxibutírico, que podem ser utilizados como fonte de carbono secundárias ou até mesmo como precursores de reservas energéticas acumuladas para as células.

Ainda sobre os ácidos, estes são formados em quantidades reduzidas, que conseqüentemente decrescem o pH e não apresentam efeito inibidor no metabolismo bacteriano. Como explicado anteriormente, o pH no início da segunda fase exponencial torna-se mais ácido, indicando que pode haver a produção de metabólitos secundários, mas não necessariamente que estes são consumidos como fonte de carbono, já que há glicerol disponível.

Com base nas análises realizadas para o crescimento de *H. seropedicae*, estirpe BR11335, percebe-se a necessidade de novos ensaios com maior fornecimento de oxigênio e avaliação da produção de metabólitos secundários.

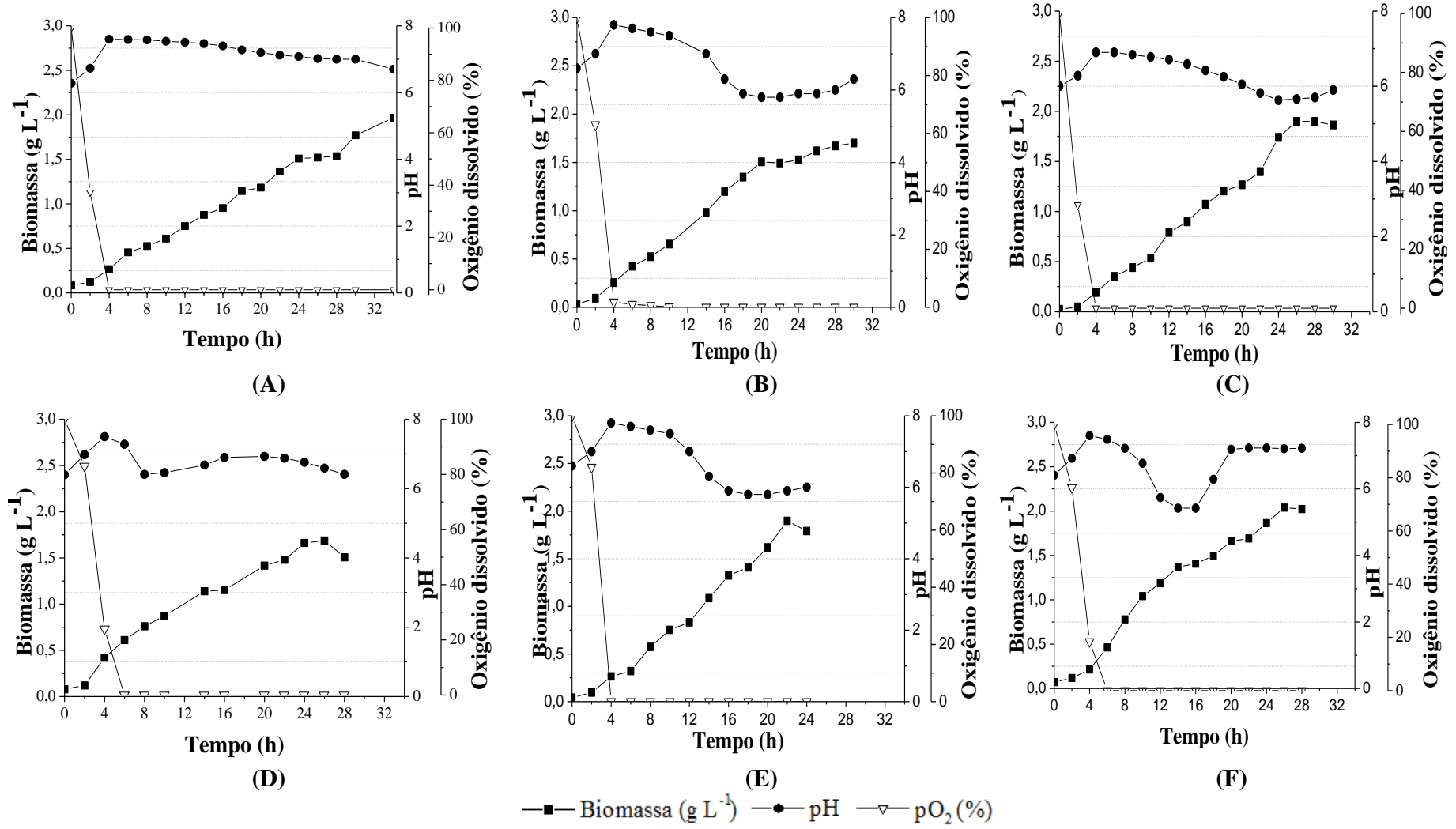


Figura 4 Curvas de crescimento de *Herbaspirillum seropedicae* – BR11335 em biorreator de bancada sob temperatura de 35°C, agitação de 150 rpm e aeração de (A) 1,0 L min⁻¹, (B) 2,0 L min⁻¹, (C) 3,0 L min⁻¹, (D) 4,0 L min⁻¹, (E) 5,0 L min⁻¹ e (F) 6,0 L min⁻¹.

b) *Herbaspirillum rubrisubalbicans* - estirpe BR11504

A Figura 5 apresenta todos os ensaios realizados para *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, estirpe BR11504. Para essa estirpe, foi observado pH mais ácido ao final dos ensaios, mas de forma similar ao da BR11335, após 6 h da inoculação, o pH rapidamente aumentava, resultando uma média de 7,5. Após esse aumento, o pH decaía a um ponto mínimo de média de 6,0 coincidindo com o início da fase estacionária de crescimento, ou seja, esse comportamento pode representar a produção de metabólitos secundários, como ácidos orgânicos ou compostos indólicos, explicando a oscilação do pH. A produção de compostos indólicos já foi constatada para estirpes de *Herbaspirillum*, o que incluía a *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (RADWAN et al., 2002; RADWAN et al., 2004).

Também de forma similar ao comportamento dos resultados para BR11335, às 4 h de fermentação os níveis de oxigênio se aproximavam de 0% ou tornavam-se 0% e assim permaneciam até o final das fermentações. Coincidentemente, esse momento era próximo ao aumento do pH, indicando que pode haver a produção de metabólitos secundários devido à rápida multiplicação das células.

Como pode ser observado nas curvas de crescimento referentes às aerações de 1 a 4,0 L min⁻¹, para BR11504 também ocorreram uma segunda fase de crescimento exponencial, indicando que talvez, o meio otimizado por Scheidt (2015) para *Herbaspirillum seropedicae*, estirpe BR11417, não seja tão adequado para outra estirpe e outra espécie do mesmo gênero.

Apesar de objetivar produção de compostos indólicos além da biomassa, Scheidt (2015), de forma diferente aos resultados desse trabalho, concluiu que as condições otimizadas que refletiam em maior produção de biomassa e indólicos em uma mesma reação eram a temperatura de 35°C, aeração de 3 L min⁻¹ e agitação de 180 rpm. Esses resultados confirmam que a temperatura de 35°C é indicada para o crescimento das espécies de *Herbaspirillum* e, apesar do autor ter concluído sobre a agitação, este ressalta que esse parâmetro exerce baixo efeito sobre a produção de biomassa e compostos indólicos.

Todas as semelhanças descritas entre os ensaios para as duas espécies trabalhadas, tornam-se positivas para o cultivo simultâneo das mesmas, pois estas terão as necessidades de crescimento muito próximas, facilitando a aplicação do sistema de crescimento.

Portanto, é possível inferir que faz-se necessária a avaliação do crescimento das estirpes sob sistema que forneça maiores aerações, visto que o oxigênio foi totalmente consumido nas fermentações realizadas, mesmo na fase estacionária e de morte celular. Todavia, para a avaliação do comportamento de crescimento dessas estirpes em sistema de co-cultivo e com base apenas nos resultados aqui apresentados, visto a ausência de trabalhos similares para estas estirpes, serão aplicadas as aerações de 5,0 e 6,0 L min⁻¹ no co-cultivo destas.

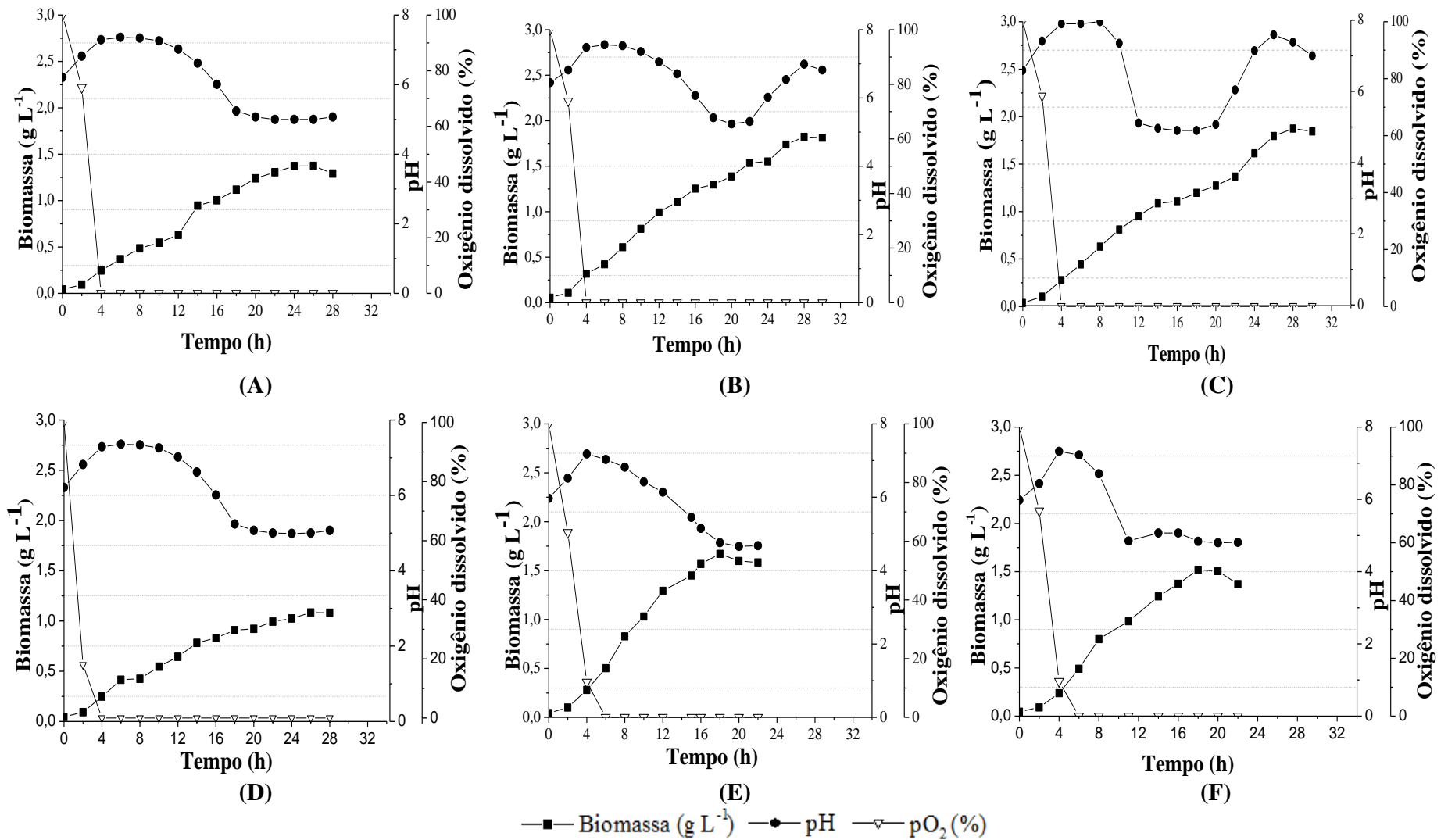


Figura 5 Curvas de crescimento de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* – BR11504 em biorreator de bancada sob temperatura de 35°C, agitação de 150 rpm e aeração de (A) 1,0 L min⁻¹, (B) 2,0 L min⁻¹, (C) 3,0 L min⁻¹, (D) 4,0 L min⁻¹, (E) 5,0 L min⁻¹ e (F) 6,0 L min⁻¹.

4.3 Ensaios Fermentativos sob Co-cultivo

a) Ensaios sob co-cultivo em *shaker*

A fim de avaliar se as temperaturas impostas nos cultivos individuais das estirpes resultam em comportamento similar no cultivo simultâneo, do qual não existem nenhuma informação, foram elaboradas curvas de crescimento em *shaker* sob as temperaturas de 30° e 35°C e agitação constante de 150 rpm, como mostra a Figura 6.

É possível observar uma maior obtenção de biomassa a 35°C, com média máxima de 2,068 g L⁻¹, enquanto que para 30°C, a média máxima foi de 1,568 g L⁻¹, ambas as 24 h de cultivo. Logo, as estirpes continuam demonstrando melhor adaptabilidade à temperatura mais elevada de 35°C, que foi aplicada também nos ensaios em biorreator de bancada.

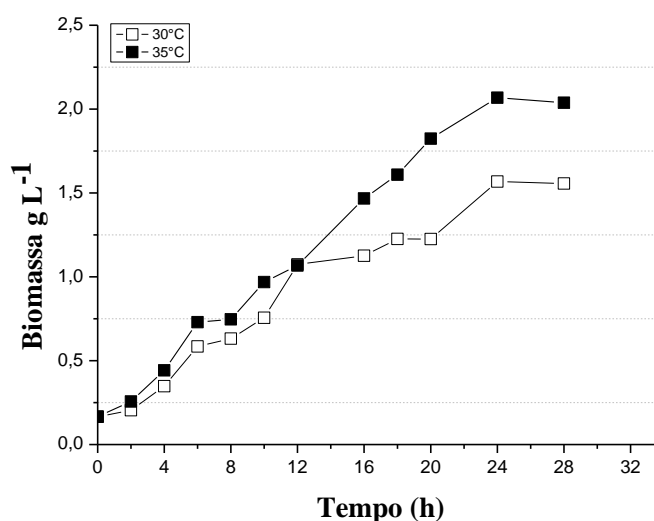


Figura 6 Crescimento celular em co-cultivo das estirpes BR11335 e BR11504 sob temperaturas de 30 e 35°C e agitação de 150 rpm em *shaker* utilizando meio DYGS-G

b) Ensaios sob co-cultivo em biorreator de bancada

A Figura 7 apresenta os ensaios em co-cultivo das estirpes BR11335 e BR11504 realizados sob as condições de aeração 5,0 e 6,0 L min⁻¹, estabelecidas anteriormente.

Ao contrário do encontrado nos ensaios individuais, na fermentação com aeração de 5,0 L min⁻¹ houve excesso de oxigênio dissolvido, o qual permaneceu após as 6 h de cultivo em torno de 7%. Já para a aeração de 6,0 L min⁻¹ o nível de pO₂ permaneceu em zero a partir de 6 h de fermentação até o final da mesma. Esses resultados mostram haver uma mudança de exigência de aeração pelas bactérias quando cultivadas simultaneamente, o que pode ser explicado exatamente pela interação destas. É possível supor também que, tendo em vista a mudança do comportamento frente ao oxigênio dissolvido, outros parâmetros de crescimento podem ser exigidos de forma diferente aos exigidos individualmente. Vale ressaltar que, ao cultivar dois ou mais micro-organismos simultaneamente, passa-se a mimetizar em certo grau o ambiente natural em que eles interagem, no caso dessas bactérias, o interior da planta ou o solo, dessa forma, essas bactérias necessitam otimizar suas necessidades para tornarem-se mais competitivas pelos espaços vegetais e, assim, garantir sua sobrevivência.

Outra observação importante é a biomassa obtida, sendo de 2,71 g L⁻¹ e 2,34 g L⁻¹ para as aerações de 5 e 6,0 L min⁻¹, respectivamente. Essas biomassas foram superiores as obtidas

no co-cultivo em *shaker* e também nos cultivos individuais, certamente devido ao cultivo conter duas diferentes bactérias. Na verdade, essa afirmação só pode ser feita após a análise de qPCR, pois os ensaios realizados até aqui, não permite distingui-las.

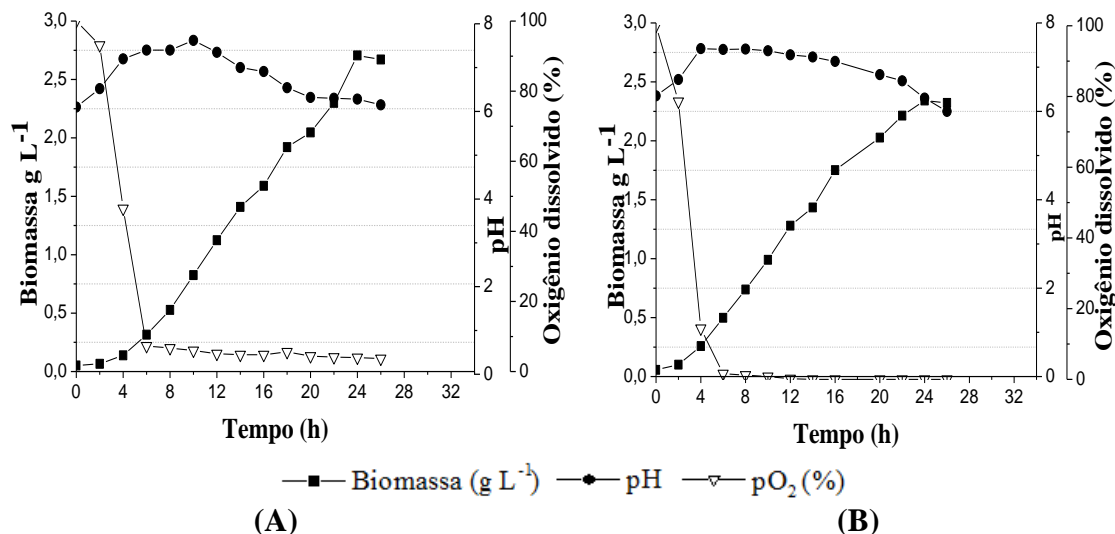


Figura 7 Curva de crescimento do cultivo simultâneo de *Herbaspirillum seropedicae* (BR11335) e *H. rubrisubalbicans* (BR11504) em biorreator de bancada sob 35°C, agitação de 150 rpm e aeração de (A) 5,0 L min⁻¹ e (B) 6,0 L min⁻¹.

4.4 PCR em Tempo Real

A técnica de PCR em tempo real é uma importante ferramenta para a detecção e quantificação das estirpes de *Herbaspirillum* cultivadas sob os sistemas de co-cultivo apresentados anteriormente, pois é uma técnica bastante específica (desde que se utilize *primers* específicos para os micro-organismos de interesse) e com boa reprodutibilidade dos resultados. A quantificação individual de cada estirpe envolvida nesses cultivos simultâneos não é possível por meio de leituras de absorbância ou contagem de células viáveis em placa, devido à semelhança morfológica entre elas. Olivares (1997) observou que as espécies *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* não diferem quanto as características de colônia em 5 meios de culturas testados (JNFb, NFb, 79, B de King e batata) e também confirmou a proximidade genética entre essas duas espécies por meio de diferentes ensaios fenotípicos.

a) Desenho e validação de *primers* espécie-específicos

Para a identificação e quantificação das estirpes em estudo no sistema de co-cultivo, foram desenhados *primers* espécie-específicos com a utilização do DNA genômico das mesmas. O desenho de *primers* para PCR é o passo chave para uma reação bem sucedida (SAMBROOK et al., 2001; GARCÊS; LIMA, 2004), porém, mesmo o genoma sendo completamente conhecido, a etapa de desenho de *primers* pode se tornar trabalhosa no que tange à validação das sequências selecionadas, ou seja, a validação da especificidade do *primer* para o micro-organismo desejado. Camargo (2015) não conseguiu identificar e quantificar três bactérias ácido lácticas (BAL) em cultivo misto devido a inespecificidade de *primers*. Na literatura, existem diversos trabalhos validando *primers*, porém, dependendo do conjunto de micro-organismos envolvidos em um cultivo, ou até mesmo no solo, esses

primers tornam-se inespecíficos, visto que para a validação de um *primer* é impossível testá-lo para todos os micro-organismos existentes. O que se recomenda é que esse *primer* seja testado para os micro-organismos mais próximos ou mais comumente relacionados, como foi a validação dos *primers* deste estudo, os quais foram testados para as cinco estirpes recomendadas para o inoculante da cana-de-açúcar.

Apesar de grande parte do genoma da BR11335 já estar sequenciada, cerca de 95%, de acordo Baldani et al. (2011), encontrou-se dificuldade na obtenção de *primer* específico para esta estirpe, muito provavelmente pelo desconhecimento de alguns trechos de seu genoma e pela proximidade entre as espécies trabalhadas, já comprovada por Olivares (1997).

Baldani et al. (2001), por meio do programa MAQ (*Mapping and Assembly with Qualities*), estimaram o tamanho do genoma de quatro estirpes recomendadas para o inoculante da cana-de-açúcar e encontraram tamanho similar para as estirpes do gênero *Herbaspirillum*, sendo de 5.530.106 pb o da BR11335 e de 5.628.704 pb o da BR11504. Por não existir dados mais recentes na literatura, os tamanhos apresentados foram utilizados como referência neste trabalho.

Na primeira tentativa de desenho de *primers* específicos foram desenhados cinco pares de *primers* para BR11335 e seis para BR11504. Os *primers* sintetizados para a estirpe BR11335 de *Herbaspirillum seropedicae* não apresentaram especificidade, promovendo amplificação cruzada com a estirpe BR11504 de *H. rubrisubalbicans*. Outras tentativas foram feitas com o desenho dos *primers in silico* e posterior tentativa de amplificação, que também não se mostraram eficientes. A especificidade só foi alcançada com o desenho de *primers* com base em genes específicos da estirpe BR11335.

No total, foram sintetizados 13 pares de *primers* para a estirpe BR11335 e 10 pares para a BR11504. Todos os *primers* foram testados e selecionou-se apenas um *primer* espécie-específico para a BR11335 (HRC54*phageEndo*) e três para BR11504, mas nesse trabalho foi utilizado apenas um, o HCC103C1870 (Tabela 2).

Tabela 1 *Primers* desenhados e validados para as estirpes BR11335 e BR11504 com amplificação espécie-específica positiva

Estirpe	<i>Primers</i>	Sequências (5' – 3')	Amplicon (pb)
BR11335	HRC54 <i>phageEndo</i> F	ATTCACGCTCCCTCGACGAC	186
	HRC54 <i>phageEndo</i> R	CGGGCTTGGCGTTGGTGACG	
BR11504	HCC103C1870F	CATCACGACCTTCGTTGGCG	112
	HCC103C1870R	GCCGAGTCCGTTGATCTGGT	

Os *primers* desenhados mostraram-se específicos para as espécies que foram desenhados, como pode ser observado na visualização do produto de PCR em gel de agarose (Figura 8). É possível a identificação de banda apenas para o DNA da estirpe proposta, sem ampliações inespecíficas. No estudo comparativo das espécies *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans*, de Olivares (1997), sondas de oligonucleotídeos espécie-específicas obtidas a partir da subunidade 23S do RNA ribossômico e testadas em ensaio de hibridização em membrana de nylon, foram utilizadas com sucesso na discriminação de um grande número de isolados de *Herbaspirillum* ao nível de espécie.

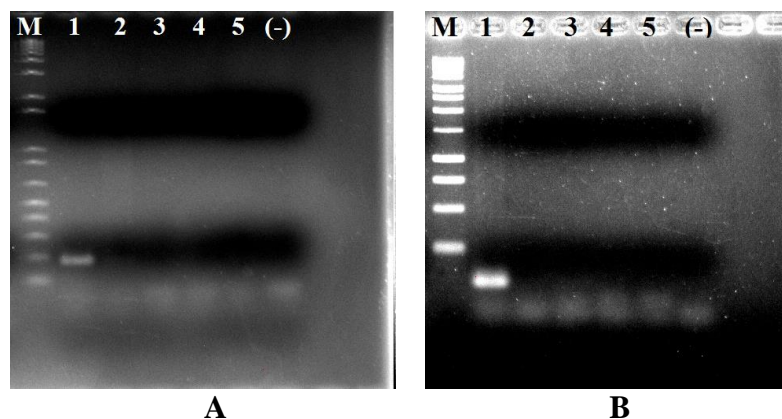


Figura 8 Gel de agarose com visualização do produto de PCR do DNA genômico das estirpes que compõem o inoculante para cana-de-açúcar: (A) par de *primer* HRC54*phageEndo*F e HRC54*phageEndo*R com produto no tamanho de 186pb, onde M – marcador molecular, 1 – estirpe BR11335 (+), 2 – BR11504, 3 – 11366^T, 4 – BR11281^T, 5 – BR11145 e (-) – controle negativo; (B) par de *primer* HCC103C1870F e HCC103C1870R com produto no tamanho de 112pb, onde M – marcador molecular, 1 – estirpe BR11504 (+), 2 – BR11335, 3 – 11366^T, 4 – BR11281^T, 5 – BR11145 e (-) – controle negativo.

As concentrações dos reagentes para PCR convencional que resultaram na especificidade dos *primers* para as estirpes propostas estão descritas na Tabela 3. A temperatura de anelamento para ambos os pares de *primers* foi de 60°C. Vale ressaltar que só foi possível observar banda de amplificação específica do DNA genômico da estirpe BR11335 na PCR convencional com utilização dos iniciadores HRC54*phageEndo* quando à reação adicionava-se Tween 20 a 2%. Portanto, a utilização do detergente foi mantida para a qPCR.

Tabela 2 Concentrações de reagentes utilizados na PCR convencional na validação dos *primers* espécie-específicos para as estirpes BR11335 e BR11504, sob temperatura de anelamento de 60°C

Estirpe	Primer	Volume (µL)		
		Primer (10µM)	MgCl ₂ (50mM)	Tween 20 (2%)
BR11335	HRC54 <i>phageEndo</i> F	0,5	1,25	2,0
	HRC54 <i>phageEndo</i> R	0,5		
BR11504	HCC103C1870F	1,0	1,25	-
	HCC103C1870R	1,0		

- não houve aplicação do reagente.

b) Elaboração de curvas padrão

Inicialmente, elaborou-se uma curva padrão para cada estirpe utilizando os iniciadores HRC54*phageEndo* (F e R) para BR11335 e HCC103C1870 (F e R) para BR11504. O DNA genômico das estirpes foi diluído em série nas concentrações de 10³ a 10⁻¹ ng/µL em triplicata técnica. As amostras foram submetidas à qPCR e seus respectivos valores de Ct foram

relacionados com o log da equação 1 (item 3.8.3). Também foi calculada a eficiência (E) conforme a equação 2 (item 3.8.3) como mostra a Figura 22.

Portanto, com base na Figura 9, é possível verificar boa eficiência dos *primers* utilizados e também a eficiência das curvas padrão. A literatura descreve que para avaliar se houve eficiência na reação, o coeficiente de determinação (R^2) deve ser $R^2 \geq 0,99$ e o valor do slope (inclinação da reta) ideal é 3,33, o que significa que houve a duplicação total dos fragmentos alvo e eficiência de 100% da reação (BUSTIN, 2000; SILVA, 2014). Ambas as curvas padrão construídas apresentaram $R^2 \geq 0,99$ e slope próximos a 3,33. Somado a essas condições, a eficiência dos *primers* foi bastante satisfatória, sendo de 106% para os iniciadores HRC54*phageEndo* e de 103% para HCC103C1870.

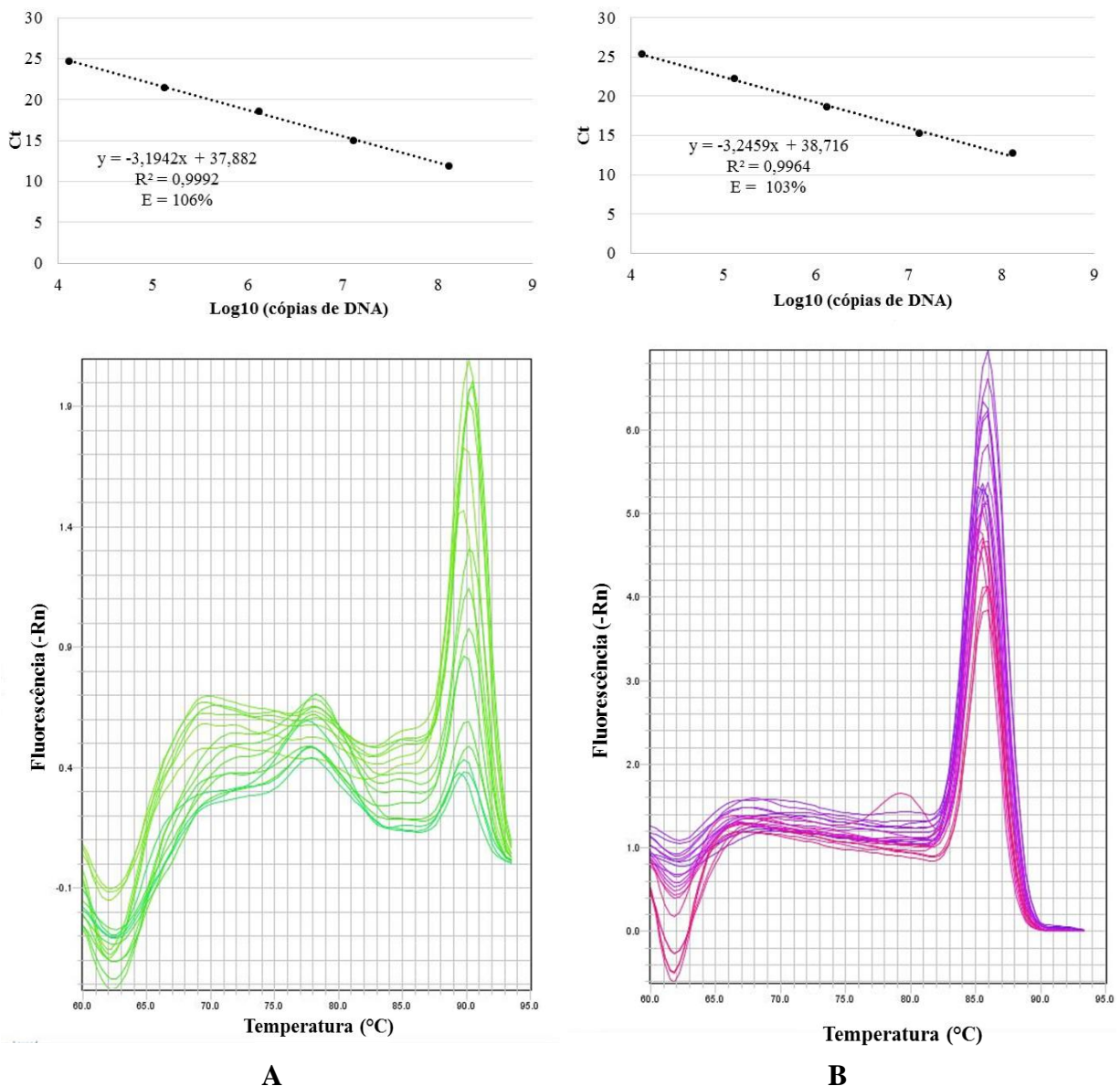


Figura 9 Curvas padrão e curva de *melting* para (A) BR11335 iniciadores HRC54*phageEndo* e (B) BR11504 iniciadores HCC103C1870, por meio de amplificação do DNA genômico por PCR em tempo real

As curvas padrões foram elaboradas com o mesmo número de pontos para ambos os *primers*, porém, o limite de detecção do *primer* HCC103C1870 foi de 10^{-3} , ao passo que o do *primer* HRC54*phageEndo* foi de até 10^{-1} . Logo, o primeiro é um *primer* mais sensível.

c) Quantificação das estirpes BR11335 e BR11504 sob sistema de co-cultivo

Após a elaboração das curvas padrão das estirpes com seus respectivos *primers* espécie-específicos, realizou-se a quantificação de cópias de DNA destas nas amostras obtidas dos co-cultivos. As condições da qPCR estão descritas no item 3.8.2.

O valor de Ct foi convertido para número de cópias de DNA por meio da equação 1 do item 3.8.3. Como cada bactéria possui apenas uma molécula de DNA, o número de cópias de DNA também pode ser entendido como número de células ou unidades formadoras de colônia (UFC).

As Figura 10 e 11 representam as concentrações de cada estirpe no cultivo simultâneo sob aeração de $5,0 \text{ L min}^{-1}$.

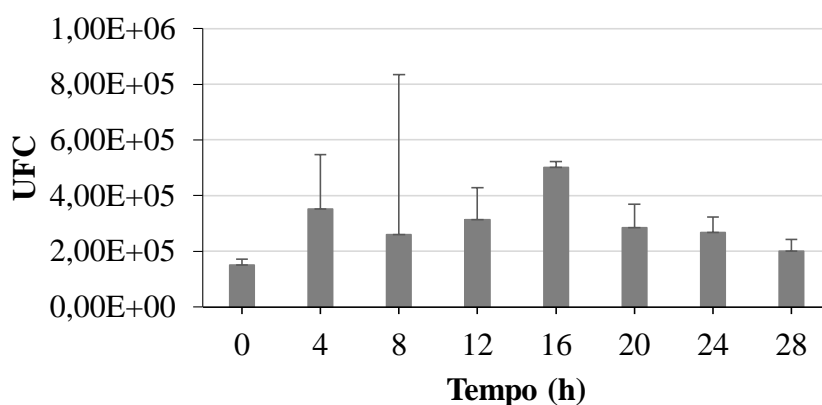


Figura 10 UFC de *Herbaspirillum seropedicae* estirpe BR11335 sob sistema de co-cultivo com *H. rubrisubalbicans* estirpe BR11504 em biorreator de bancada com aeração de $5,0 \text{ L min}^{-1}$, temperatura de 35°C e agitação de 150 rpm. Os resultados representam a média de duas repetições biológicas e triplicatas técnicas.

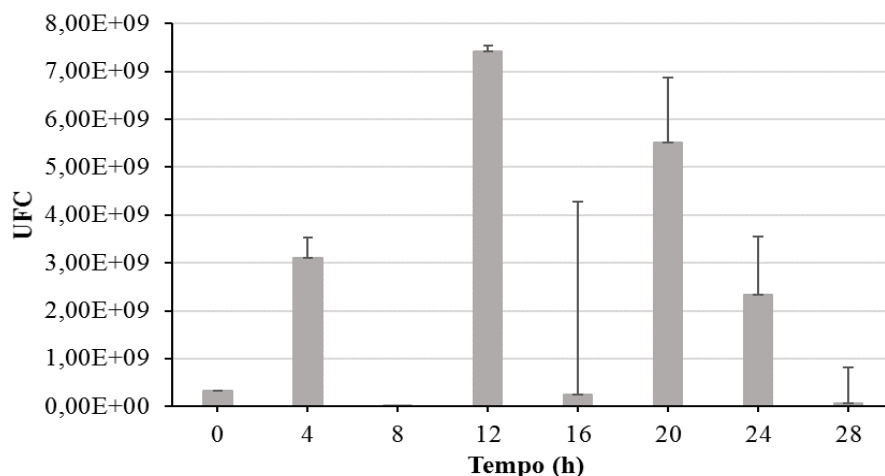


Figura 11 UFC de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* estirpe BR11504 sob sistema de co-cultivo com *H. seropedicae* estirpe BR11335 em biorreator de bancada com aeração de 5,0 L min⁻¹, temperatura de 35°C e agitação de 150 rpm. Os resultados representam a média de duas repetições biológicas e triplicatas técnicas.

Com base nas escalas das figuras, nota-se a diferença da concentração das duas estirpes no cultivo simultâneo. *Herbaspirillum rubrisubalbicans* foi a estirpe que mais se sobressaiu, podendo ter sua concentração, em média, 8.000 vezes superior a de *Herbaspirillum seropedicae*. Em médias gerais dos dados normalizados, a estirpe BR11504 é estatisticamente superior à estirpe BR11335 nas duas condições de aeração avaliadas (Tabela 3).

Tabela 3 Análise de variância para as médias do Log₁₀(cópias de DNA) das estirpes BR11335 e BR11504 ($\alpha = 0,05$)

Tratamento	Médias
BR11335	4,510312 B
BR11504	8,104375 A
Média geral	6,3073438
CV (%)	4,06

Na utilização de qPCR para o monitoramento da colonização e do estabelecimento de bactérias diazotróficas endofíticas em plantas de cana, Boa Sorte (2013) quantificou o Log₁₀ (cópias de DNA) das estirpes BR11335 e BR11504 obtidas por grama de tecido fresco e observou que a população de *H. rubrisubalbicans* era superior a de *H. seropedicae* nos tratamentos inoculados e nitrogenados aos 8 meses de plantio. Ao 12 meses, observou-se a mesma relação, porém apenas no controle, pois nos tratamentos inoculados e nitrogenados a concentração de *H. seropedicae* foi tão baixa que não foi possível detectá-la. Esse experimento foi realizado em São Paulo e Rio Grande do Sul para as variedades RB867515 e SP813250 e os resultados apresentaram repetibilidade. Cultivos mistos mimetizam o ambiente natural em que os micro-organismos se encontram, no caso das estirpes estudadas, no interior de plantas de cana-de-açúcar. Com base nos resultados encontrados por Boa Sorte (2013) percebe-se a predominância natural de *H. rubrisubalbicans* em relação à *H. seropedicae*.

Apesar das diferentes proporções entre as estirpes em co-cultivo, os resultados encontrados não representam uma curva de crescimento devido a ausência das fases de crescimento como normalmente é observado. Os valores de UFC encontrados apresentam grande variação, tanto entre os pontos amostrados, quanto entre uma mesma repetição para a maioria das observações, não sendo, portanto, perceptível o verdadeiro comportamento das estirpes no cultivo simultâneo. Verdadeiro porque como a curva de crescimento, da qual foram retiradas as alíquotas, apresenta comportamento normal de uma curva (fase lag, exponencial, estacionária e de declínio celular), os resultados da qPCR deveriam também representar essas fases. Por exemplo, não é provável que o número de UFC da BR11504 às 8 h de cultivo seja igual a média de 2,32x10⁶ UFC e às 12 h tenha evoluído para a média de 7,42x10⁹ UFC. Esse comportamento variável de UFC das estirpes nos diferentes horários observados também foi similar para o cultivo simultâneo de 6,0 L min⁻¹ (Figuras 12 e 13).

Como descrito anteriormente, esses resultados certamente também não descrevem o comportamento das estirpes no sistema de co-cultivo, pois como pode ser observado na curva de crescimento referente a esses cultivos (item 4.3), a biomassa aumenta ao longo do tempo e apenas no último ponto de observação apresenta uma leve queda.

Visto que nos testes dos *primers* desenhados suas especificidades foram validadas, esse comportamento dos resultados também não pode ser atribuído ao iniciadores, restando, então, a investigação da eficácia do método de extração de DNA utilizado.

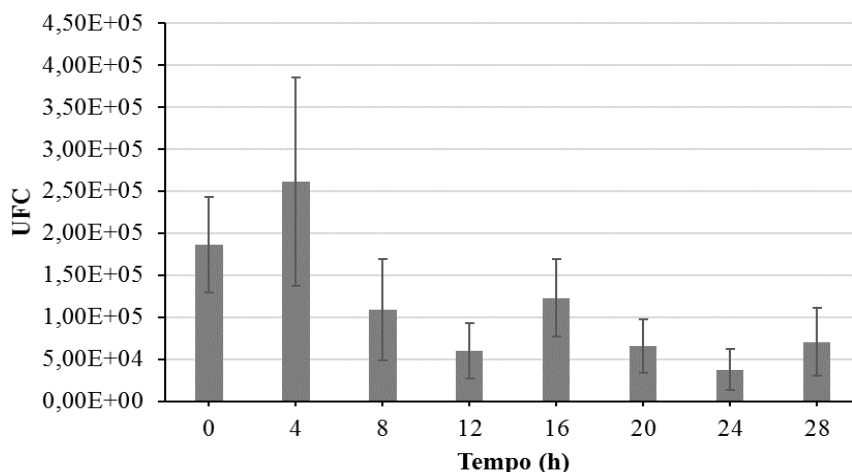


Figura 12 UFC de *Herbaspirillum seropedicae* estirpe BR11335 sob sistema de co-cultivo com *H. rubrisubalbicans* estirpe BR11504 em biorreator de bancada com aeração de $6,0 \text{ L min}^{-1}$, temperatura de 35°C e agitação de 150 rpm. Os resultados representam a média de duas repetições biológicas e triplicatas técnicas.

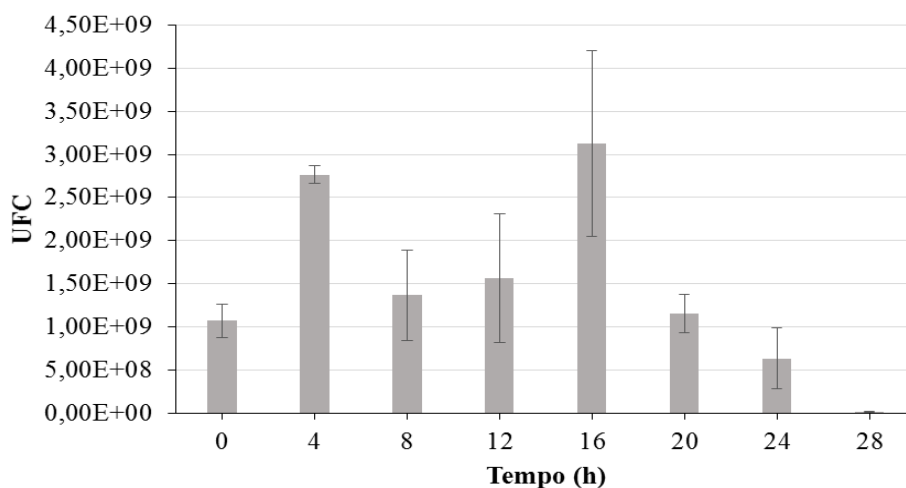


Figura 13 UFC de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* estirpe BR11504 sob sistema de co-cultivo com *H. seropedicae* estirpe BR11335 em biorreator de bancada com aeração de $6,0 \text{ L min}^{-1}$, temperatura de 35°C e agitação de 150 rpm. Os resultados representam a média de duas repetições biológicas e triplicatas técnicas.

Durante a extração de DNA dos pontos amostrados, foi observada a formação de goma bastante viscosa e espessa, que pode representar intensa produção de polissacarídeos, principalmente intracelulares, pelas estirpes em sistema de cultivo simultâneo, os quais são extravasados na etapa da extração de lise celular e aparecem de forma mais concentrada na etapa de precipitação de proteínas. Essa goma, dificilmente é decantada e, portanto, pode ter subestimado a concentração de DNA de algumas ou todas as amostras, ocasionando, então resultados como os vistos anteriormente. A produção de exopolissacarídeos por diversos microrganismos, incluindo a classe das Beta-Proteobacteria, na qual os micro-organismos

estudados se inserem, é bastante comum, sendo que esses possuem composição e peso molecular, diversidade estrutural e funcional variados para os microrganismos que o produzem. É uma proteção natural contra o meio externo, a dessecação e outros efeitos ambientais, podendo conferir patogenicidade a muitas estirpes. A produção destes polímeros pode ser direcionada e, inclusive, ter aplicação na biotecnologia industrial, farmacêutica, nutracêutica, em alimentos, em agroquímicos e para outras finalidades (NWODO et al., 2012). Serrato (2008) identificou e caracterizou exopolissacarídeos produzidos por diferentes estirpes de *Herbaspirillum seropedicae* e *H. rubrisubalbicans*, além de *Burkholderia*, inclusive a estirpe recomendada para o inoculante da cana.

Não foram encontrados na literatura trabalhos referentes à extração de DNA de culturas mistas, apenas de cultivos individuais de bactérias.

Bruxel (2012) comparou a eficiência de quatro métodos de extração de DNA para cultivos puros de *Azospirillum amazonense*, *Bradyrhizobium elkanii* e *Bradyrhizobium japonicum* e inoculantes recomendados para soja, milho e trigo. Foram avaliados os métodos com acetato de sódio, com fenol/clorofórmio, o kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega, USA) e kit Power Soil (Mo Bio, CA), onde, em geral, para os cultivos puros, a extração com o kit da Promega mostrou-se eficiente para extrair maior quantidade de DNA e obter bandas bem formadas e pouco arraste em gel de agarose. Para a extração do DNA dos co-cultivos também utilizou-se o kit Wizard Genimoc DNA Purification, porém deve considerar-se que as culturas não são puras como as do trabalho de Bruxel (2012).

Segundo Sambrook & Russel (2001), a qualidade do DNA interfere na amplificação por PCR, logo, também ocorre na qPCR. Essa interferência pode resultar até mesmo na falta de amplificação do DNA, provavelmente pela presença de contaminantes químicos, sendo os mais comuns em amostras ambientais, por exemplo, polissacarídeos, polifenóis ou ácidos húmicos e fúlvicos, podendo estes reduzir ou até mesmo inibir a atividade da DNA polimerase, assim como amostras com altos níveis de polissacarídeos podem produzir interferências nas análises moleculares (FANG et al., 1992; HAN et al., 2010; NUNES et al., 2011; BRUXEL, 2012).

De acordo com Lodhi et al. (1994), os polissacarídeos são facilmente identificáveis na preparação do DNA à medida que conferem uma consistência pegajosa e viscosa, como o ocorrido na extração do DNA dos cultivos simultâneos, principalmente a partir de 8 h de fermentação, o que não foi identificado na extração do DNA individual das estirpes, utilizado para a construção das curvas padrão dos *primers*. Os polissacarídeos interferem em várias enzimas biológicas tais como polimerases, ligases e endonucleases de restrição (SHIODA, et al., 1987; RICHARDS, 1988; LODHI et al., 1994). Lodhi et al., (1994) observaram que quando os polissacarídeos não eram retirados do DNA extraído, este não era amplificado. No DNA dos co-cultivos, toda a goma visível formada foi retirada, porém podem ter restado resquícios, interferindo, assim, nos resultados das qPCRs realizadas.

Existem trabalhos realizados a fim de eliminar os polissacarídeos do produto de extração de DNA de tecidos vegetais, como o de Fang et al. (1992), que observaram que a adição de NaCl 1M facilitou a remoção de polissacarídeos na extração de DNA de melão e pepino, aumentando sua solubilidade em etanol. Já para Baudracco-Arnas (1995) foram necessárias três etapas utilizando CTAB para a remoção do polissacarídeo e a adição de NaCl 1M facilitou a solubilidade do DNA no tampão TE.

Portanto, faz-se necessária a comparação de diferentes protocolos de extração de DNA genômico aplicados às amostras de cultivo simultâneo das estirpes BR11335 e BR11504 para verificar o mais eficiência para esse sistema de crescimento e avaliar o verdadeiro comportamento das estirpes nos co-cultivos realizados. Além disso, torna-se importante, investigar a natureza do composto produzido (goma), se realmente são polissacarídeos e como minimizá-lo durante a extração do DNA. Dessa forma, será possível validar os melhores

parâmetros para o co-cultivo das estirpes e legitimar o sistema para utilização na produção otimizada de inoculante para a cana-de-açúcar.

Ainda são poucos os trabalhos de otimização de cultivo das bactérias envolvidas no inoculante da cana-de-açúcar e, até o momento de publicação deste trabalho, não existiam estudos referentes ao cultivo simultâneo de bactérias diazotróficas para a produção de inoculantes mistos. O uso de co-cultivo para produção de inoculantes agrícolas é inovador e, portanto, este estudo é apenas um dos primeiros passos necessários para elucidar todas as variáveis que precisam ser consideradas para o sucesso de um sistema biológico complexo, muitas vezes difícil de prever e monitorar. Os resultados obtidos até aqui já representam um grande avanço para as pesquisas na área de inoculantes e foram considerados positivos, principalmente por demonstrar que é possível o co-cultivo das espécies de *Herbaspirillum*, mesmo que ajustes ainda sejam necessários.

5. CONCLUSÕES

As bactérias *Herbaspirillum seropedicae* (BR11335) e *H. rubrisubalbicans* (BR11504) possuem crescimento favorecido sob temperatura de 35°C em meio DYGS-G.

As duas estirpes possuem crescimento bastante similar para todas as condições de aeração avaliadas.

Nos cultivos individuais em todas as condições de aeração (1,0 a 6,0 L min⁻¹) para ambas as estirpes, o oxigênio dissolvido foi totalmente consumido, mostrando-se limitante ao crescimento.

É possível co-cultivar as estirpes BR11335 e BR11504 sem que haja inibição de crescimento entre estas.

Os primers HRC54phageEndo e HCC103c1870 são espécie-específicos para *Herbaspirillum seropedicae* estirpe BR11335 e *H. rubrisubalbicans* estirpe BR11504, respectivamente.

A estirpe BR11504 apresentou crescimento superior a BR11335 nas duas condições de aeração, porém a técnica de extração de DNA utilizada para os co-cultivos não foi eficiente para observar a evolução das estirpes ao longo das fermentações.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como sugestões para trabalhos futuros são apontadas, a seguir, algumas recomendações.

Para o melhor entendimento do sistema de co-cultivo de *Herbaspirillum seropedicae* estirpe BR11335 e *H. rubrisubalbicans* estirpe BR11504 sugere-se que os cultivos individuais dessas estirpes também sejam quantificados por PCR em tempo real e contrastados com os resultados de co-cultivo aqui encontrados ou outros.

Elaborar meio de cultura mais rico nutricionalmente e avaliar como no sistema de co-cultivo o substrato é consumido.

Realizar cultivos simultâneos com concentrações iniciais diferentes entre as estirpes para que se possa obter populações iguais destas no co-cultivo.

Investigar a produção de polissacarídeos e outros metabólitos pelas bactérias em cultivos individuais e em co-cultivo.

Comparar diferentes protocolos de extração de DNA dos co-cultivos, buscar procedimentos que minimizem a produção de goma durante a extração e, então, realizar novas qPCRs para avaliar o comportamento das estirpes ao longo dos co-cultivos.

Avaliar a resposta de plantas de cana-de-açúcar inoculadas com as estirpes de *Herbaspirillum* cultivadas simultaneamente e contrastar os resultados com plantas inoculadas com as estirpes cultivadas individualmente. Dessa maneira, será possível verificar os efeitos do co-cultivo nas plantas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ, G.S.; PIECKENSTAIN, F.L.; DESIMONE, M.F.; ESTRELLA, M.J.; RUIZ, O.A., DIAZ, L.E. Evaluation of sol-gel silica matrices as inoculant carriers for *Mesorhizobium* spp. cells. **Formatex**, v.1, p. 160-167, 2010.

ANDERSEN, C.B.; HOLST-JENSEN, A. BERDAL, K.G.; THORSTEN, T., TENGS, T. Equal performance of TaqMan, MGB, molecular beacon, and SYBR green-based detection assays in detection and quantification of roundup ready soybean. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 26, p. 9658-9663, 2006.

ANPII – ASSOCIAÇÃO NACIONAL DE PRODUTORES E IMPORTADORES DE INCOLUTANTE. **Estatísticas – vendas de inoculantes das empresas afiliadas à ANPII**. Disponível em: < <http://www.anpii.org.br/site/conteudo/pagina/1,7+Estatisticas.html>>. Acesso em: 08 set.2015.

AZEREDO, D. F.; BOLSANELLO, J.; WEBER, H.; VIEIRA, J. R. Nitrogênio na cana planta: doses e fracionamento. **Revista STAB**, v.4, p.32-36, 1986.

BABALOLA, O. O. Beneficial bacteria of agricultural importance. **Biotechnol Lett**, v. 32, n. 11, p. 1559-70, 2010.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, p. 549-579, 2005.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; DÖBEREINER, J. Genus *Herbaspirillum*. In: GARRITY, G.M. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. USA: Springer, 2003.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; DÖBEREINER, J. Genus III. *Herbaspirillum*. In: GARRITY, G.M. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. USA: Springer, 2005.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L.D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.36, p.86-93, 1986.

BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DOBEREINER J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v.29, p.911-922, 1997.

BALDANI, J.I.; GUEDES, H.V., VIDAL, M.S., SCHWAB, S.; TEIXEIRA, K.R.S.; CRUZ, L.M.; ARAUJO, J.L.S. **Base de dados genômica de estirpes que compõem o inoculante de cana-de-açúcar e milho**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2011. 32p. (Embrapa Agrobiologia, Documentos 282).

BALDANI, J.I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSÉN, E.; BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M.; DÖBEREINER J. Emended description of *Herbaspirillum*, inclusion of “*Pseudomonas*” *rubrisubalbicans*, a

light 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.

BALDANI, J.I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L.; HORSTE, B.; KERSTERE, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M.; DÖBEREINER, J. Inclusion of “*Pseudomonas*” *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen within the genus *Herbaspirillum*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.46, p.802-810, 1996.

BALDANI J.I., REIS V.M., VIDEIRA S.S., BODDEY L.H, BALDANI V.L.D. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. **Plant Soil**, v.384, n.1, p.413-431, 2014.

BALDANI, J. I.; TEIXEIRA, K. R. S.; SHWAB, S.; OLIVARES, F. L.; HEMERLY, A. S.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; NOGUEIRA, E. M.; ARAÚJO, J.L.S.; BALDOTTO, L.E.B; SOARES, L.H.B.; VINAGRE, F.; BALDANI, V.L.D.; CARVALHO, T.L.G.; ALVES, B.J.R.; JAMES, E.K.; JANTALIA, C.P.; FERREIRA, P.C.G.; VIDAL, M.S.; BODDEY, R.M. Fixação biológica de nitrogênio em plantas da família da Poaceae (antiga Gramineae). In: RIBEIRO, M.R.; NASCIMENTO, C.W.; RIBEIRO FILHO, M.R.; CANTALICE, J.R.B., eds. **Tópicos em Ciência do Solo**. Viçosa, MG. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v.6, p.203-271, 2009.

BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; OLIVARES, F.L.; DÖBEREINER, J. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. **Symbiosis**, v.13, p. 65-73, 1992

BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; DÖBEREINER; J. Selection of *Herbaspirillum* spp. strains associated with rice seedlings amended with ¹⁵N- labelled fertilizer. In: International Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics – the role of biological nitrogen fixation. **Resumos**. Angra dos Reis: EMBRAPA, p. 202-203, 1995.

BALDINO JR, A. C.; SCHMIDELL, W. Variação de escala. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo, Edgard Blücher Ltda, v.2, cap.15, p.333-354, 2001.

BALSANELI, E. **Análise genômica comparativa do sistema de secreção do tipo iii de endofíticos do gênero *Herbaspirillum***. 2007. 95f. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L.E. *Azospirillum* plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997–2003). **Canadian Journal of Microbiology**, v.50, p.521-577, 2004.

BAUDRACCO-ARNAS, S. A simple and inexpensive method for DNA extraction from *Cucumis melo* L.. **Report Curcubit Genetics Cooperative**, v. 18, p. 50-51, 1995.

BOA SORTE, P.M.F. **Uso da técnica de DGGE para monitorar o estabelecimento de bactérias diazotróficas endofíticas inoculadas em duas variedades de cana-de-açúcar**. Dissertação 2009. 58f (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

BOA SORTE, P.M.F. **Utilização de diferentes técnicas para monitorar a colonização e estabelecimento de bactérias diazotróficas endofíticas em plantas de cana-de-açúcar.** Tese. 2013. 86f (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

BODDEY, R.M.; POLIDORO, J.C.; RESENDE, A.S.; ALVES, B.J.R. Use of ^{15}N natural abundance technique for the quantification of contribution of N_2 fixation to sugar cane and other grasses. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 28, p. 889-895, 2001.

BREDA, F.A.F.; ALVES, G.C.; REIS, V.M. Produtividade de milho na presença de doses de N e de inoculação de *Herbaspirillum seropedicae*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, Brasília, v.51, n.1, p.45-52, 2016.

BRUSAMARELLO-SANTOS, L.C.C.; ALJANABI, S.M.M.; MONTEIRO, R.A.; CRUZ, L.M.; BAURA, N.A.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M.; LUASSEN, R. Differential gene expression of rice roots inoculated with the diazotroph *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant and Soil**, v.356, n.1-2, p.113-125, 2012.

BRUXEL, M. **Comparação e desenvolvimento de metodologias para identificação molecular das estirpes recomendadas para produção de inoculantes para soja, milho e trigo.** 2012. 88f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

BUSTIN, S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay. **Journal of Molecular Endocrinology**, v.25, p.169-193, 2000.

CAMARGO, A.P.R.S. **Modelagem de crescimento de bactérias ácido lácticas em cultura pura e mista sob condições isotérmicas e não isotérmicas de cultivo.** 2015. 194f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M. C. P. **Microbiologia do solo.** Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p.141-155, 1992.

CARNAÚBA, B.A.A. O nitrogênio e a cana-de-açúcar. **STAB: açúcar, álcool e subprodutos**, v.8, n.3-4, p.24-39, 1990.

CARVALHO C.V.; RICCI G.; AFFONSO R. **Guia de Práticas em Biologia Molecular.** São Caetano do Sul: Ed. Yendis; p.61-98, 2010.

CHAGAS, F.O. **Utilização de culturas mistas como estratégia para estimular a biossíntese de produtos naturais por fungos endofíticos.** 2010. 140p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, SP.

CHAVES, V.A. **Desenvolvimento inicial e acúmulo de nutrientes em três variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas.** 2014. 76p. Dissertação (Mestrado

em Agronomia – Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

CHAVES, V.A.; SANTOS, S.G.; SCHULTZ, N.; PEREIRA, W.; SOUSA, J.S.; MONTEIRO, R.C.; REIS, V.M. Desenvolvimento inicial de duas variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.39, p. 1595-1602, 2015.

CHICORA, V. K. **Associação benéfica e fitopatogênica entre espécies de *Herbaspirillum* spp. e plantas hospedeiras**. 2015. 87p. Dissertação (Mestrado em Ciências – Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

CHRISTOPHER, W. N.; EDGERTON, C. W. Bacterial stripe diseases of sugarcane in Louisiana. **Journal Agriculture Research**, Queensland, v.41, p.259, 1992.

CHUEIRE, L. M. O.; RANGEL, E. V.; MOSTASSO, F. L.; CAMPO, R. J.; PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M. Classificação taxonômica das estirpes de rizobio recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro baseada no sequenciamento do gene 16s rRNA. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v.27, n. 5, p. 833-840, set/out. 2003.

COLETI, J. T.; CASAGRANDE, J. C.; STUPPIELO, J. J. L.; RIBEIRO, L. D.; OLIVEIRA, G. R. Remoção de macronutrientes pela cana-de-açúcar e cana-soca em argissolos, variedades RB835486 e SP81-3250. In: **Congresso Nacional da STAB**, 8, Recife, 2002.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**. Disponível em: < <http://www.conab.gov.br/>> . Acesso em agosto de 2016.

DAMASCENO, R. G. **Comparação e desenvolvimento de metodologias para o controle de qualidade de inoculantes**. 2011. 65p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

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

DÖBEREINER, J.; RUSCHEL A. P. Uma nova espécie de *Beijerinckia*. **Revista de Biologia**. São Paulo-SP, v.1, p.261-272, 1958.

DÖBEREINER, J.; SALOMONE, I. G. de; Biological nitrogen fixation in maize. In: Simpósio Internacional sobre Estresse Ambiental: o Milho em Perspectiva, 1992. Belo Horizonte. **Anais**. Sete Lagoas: Embrapa/CNPMS, p. 286-294, 1995.

DOTTO, A. P.; LANA, M. DO C.; STEINER, F.; FRANDOLOSO, J. F. Produtividade do milho em resposta à inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* sob diferentes níveis de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.5, p.376-382, 2010.

FANG, G.; HAMMAR, S.; GRUMET, R. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. **Biotechniques**, v. 13, p. 53-54, 1992.

FERNANDER JUNIOR, P. I. **Composições poliméricas a base de carboximetilcelulose (CMC) e amido como veículos de inoculação de rizóbio em leguminosas.** 2006. 43p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

FERNANDES, V. H. **Otimização dos parâmetros de produção de biomassa de *Azospirillum amazonense* (BR11145) para incorporação em inoculantes agrícolas.** 2013. 93p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium** (Lavras), v. 6, p. 36-41, 2008.

FERREIRA, J. S.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. Seleção de inoculantes à base de turfa contendo bactérias diazotróficas em duas variedades de arroz. **Acta Scientiarum. Agronomy.** Maringá, v.32, n.1, p.179-185, 2010.

FIGUEREDO, G. G. O. **Protocolo para inoculação de bactérias diazotróficas em semente de cana-de-açúcar.** 2012. 77 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

FREIRE, J. R. J.; RHOR, T. G.; OLIVEIRA, P. J.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G. Trabalhos em rizobiologia no Rio Grande do Sul. In: Reunião Latino Americana sobre Inoculantes para Leguminosas. Porto Alegre. **Anais Porto Alegre:** Secretaria de Agricultura, v.4, p.19- 24, 1968.

GARCÊS, S. P. S.; LIMA, A. O. S. **Desenho e validação *in silico* de primers intragenéricos.** II workshop de Tecnologia da Informação Aplicada ao Meio Ambiente, 2004.

GOEBEL, E. M.; KRIEG, N. R. Fructose catabolism in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. **Journal Bacteriol.**, v.159, n.1, p.86-92, 1984

GOOMES, A. A. **Distribuição de carboidratos e nitrogênio em cana-de-açúcar (*Saccharum spp*) em associação com bactérias diazotróficas endofíticas.** Tese. 2002. 120f. (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

GOMES, A. A.; REIS, V. M.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R. Relação entre distribuição de nitrogênio e colonização por bactérias diazotróficas em cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, v.40, n.11, p.1105¹113, nov., 2005.

HALE, C.N.; WILKIE, J.P. A comparative study of *Pseudomonas* species pathogenic to sorghum. **New Zeland Journal of Agriculture Research**, v.15, p. 448456, 1972a.

HALE, C. N.; WILKIE, J. P. Bacterial leaf stripe of sorghum in New Zeland. **New Zeland Journal of Agriculture Research**, v. 15, p. 457-460, 1972b.

HANG, G. M.; SONG, F. Q.; ZHAN, G. J.; NI, S.; TIAN, X. J. An economic and efficient method for further purification of crude DNA extracted from forest soils. **Journal of Forestry Research**, v. 21, p. 246-250, 2010.

HEID, C.A.; STEVENS, J.; LIVAK, K.J.; WILLIAMS, P.M. Real time quantitative PCR. **Genome Research**, n.6, p.986-994, 1996.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro.** Londrina: Embrapa Soja, 2007. 80p. (Embrapa Soja. Documentos, 283). (ISSN 1516-781X; N 283)

ISHIKAWA, S.; ANDO, S.; SAKAIGAICHI, T.; TERAJIMA, Y.; MATSUOKA, M. Effects of high nitrogen application on the dry matter yield, nitrogen content and nitrate-N concentration of sugarcane. **Soil Science and Plant Nutrition** , v.55, p. 485–495, 2009.

JAMES, E. K.; OLIVARES, F. L. Infection and colonization of sugarcane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. **Crit. Rev. Plant Sci**, v. 17, p. 77¹19, 1998.

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

KIRCHHOF, G.; ECKERT, B.; STOFFELS, M.; BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; HARTMANN, A. *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C4-fibre plants. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, v.51, p.157¹68, 2001.

KUBISTA, M., ANDRADE, J.M., BENGTSSON, M., FOROOTAN, A., JONÁK, J., LIND, K., SINDELKA, R., SJÖBACK, R., SJÖGREEN, B., STRÖMBOM, L., STÅHLBERG, A., ZORIC, N. The real time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p.95-125, 2006.

MACKAY, I. M., MACKAY, J.F., NISSEN, M. D., SLOOTS, T. P. **Real-time PCR: History and Fluorogenic Chemistries in Mackay**, p.1-40, I.M. (Ed.), *Real-Time PCR in Microbiology, From Diagnosis to Characterization* . Caister Academic Press Norfolk, UK, 2007.

LANDELL, M. G. A.; CAMPANA, M. P.; FIGUEIREDO, P.; XAVIER, M. A.; ANJOS, I. A.; DINARDO-MIRANDA, L. L.; SCARPARI, M.S.; GARCIA, J. C.; BIDÓIA, M. A. P.; SILVA, D. N.; MENDONÇA, J. R.; KANTHACK, R. A. D.; CAMPOS, M. F.; BRANCALIÃO, S. R.; PETRI, R. H.; MIGUEL, P. E. M. Sistema de multiplicação de cana-de-açúcar com uso de mudas pré-brotadas (MPB), oriundas de gemas individualizadas. Campinas: **Instituto Agronômico**, 2012. (Documentos, 109)

LIPP, M.; SHILLITO, R.; GIROUX, R.; SPIEGELHALTER, F.; CHALTON, S.; PINERO, S.; SONG, P. Polymerase chain reaction technology as analytical tool in agricultural biotechnology. **Journal of Aoac International**, v. 88, n. 1, p. 136-155, 2005.

LODHI, M. A.; GUANG-NING, Y.; WEEDEN N.F.; REISCH, B. I. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 12, p. 6-13, 1994.

MACKAY, I.M.; ARDEN, K.E., NITSCHKE, A. Real-time PCR in virology. **Nucleic Acids Research**, v. 30, p. 1292-1305, 2002.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas**. Piracicaba: Associação Brasileira para a Pesquisa de Potássio e do Fósforo, 1997. 319p.

MONTEIRO, R. A.; BALSANELLI, E.; WASSEM, R.; MARIN, A. M.; BRUSAMARELLO-SANTOS, L. C. C.; SCHIMIDT, M. A.; TADRA-SFEIR, M. Z.; PANKIEVICZ, V. C. S.; CRUZ, L. M.; CHUBATSU, L. S.; PEDROSA, F. O., SOUZA, E. M. *Herbaspirillum*-plant interactions: microscopical, histological and molecular aspects. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1-2, p. 175-196, 2012.

MAPA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Culturas: cana-de-açúcar**. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar> >. Acesso em setembro de 2016.

MARIN, V.A.; BALDANI, V. L. D.; TEIXEIRA, K. R. S.; BALDANI, J. I. **Fixação biológica de nitrogênio: bactérias fixadoras de nitrogênio de importância para a agricultura tropical**. Embrapa, 1999. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/598661> >. Acesso em julho de 2016.

MARQUES JÚNIOR, R. B.; CANELLAS, L. P.; SILVA, L. G. da.; OLIVARES, F. L. Promoção de enraizamento de microtoletes de cana-de-açúcar pelo uso conjunto de substâncias húmicas e bactérias diazotróficas endofíticas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.52, p.1121-1128, 2008.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUERA, J.O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras: Editora UFLA. 2002 p. 625.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M.; SILVA, F. F. PCR em tempo real: uma inovação tecnológica da reação em cadeia da polimerase (PCR). **Revista Biotecnológica Ciência e Desenvolvimento**, 33ª ed., 2004.

NUNES, C. F.; FERREIRA, J. F.; FERNANDES, M. C. N.; BREVES, S. S.; GENEROSO, A. L.; SOARES, B. D. F.; DIAS, M. S. C.; PASQUAL, M.; BOREM, A.; CANÇADO, G. M. A.; Otimização de um método para extração de DNA genômico a partir de folhas de morangueiro. **Ciência Rural**, v. 8, p. 1382-1389, 2011.

NWODO, U. U.; GREEN, E.; OKOH, A. I. Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospects. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 13, p. 14002-14015, 2012.

OLDSHUE, J.K. Agitation. In: VOGEL, H.C.; TODARO, C.L. **Fermentation and biochemical engineering handbook**. 2.nd. New Jersey: Noyes, cap.5, p.181-241, 1997.

OLIVARES, F. L. **Taxonomia, ecologia e mecanismos envolvidos na infecção e colonização de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp. híbrido) por bactérias diazotróficas endofíticas do gênero *Herbaspirillum***. 1997. 328f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I.; JAMES, E. K.; DOBEREINER, J. Infection of mottled stripe disease – susceptible and resistant sugar cane varieties by endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. **New Phytol.** v.135, p.723-737, 1997.

OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems and leaves predominately of Gramineae. **Biology and Fertility of Soils**, v.21, p.197-200, 1996.

OLIVARES, F.L.; REIS, V.M. & FAÇANHA, A.R. The role of endophytic diazotrops in sugarcane root morphogenesis and development. In: FINAN, T.M.; O'BRIAN, M.R.; LAYZELL, D.B., VESSEY, J.K. & NEWTON. W., eds. **Nitrogen fixation: Global perspectives**. Oxon, CAB International, p.476-477, 2000.

OLIVEIRA, A. L. M., CANUTO, E. L., URQUIAGA, S., REIS, V. M., BALDANI, J. I. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. **Plant and soil**, v. 284, p. 23-32, 2006.

OLIVEIRA, T.M. dos S. **PCR em tempo real: métodos e aplicações**. 2010. 111f. Dissertação (Mestrado em Biologia). Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal.

OLIVER, R. **Interação entre bactérias diazotróficas e doses de n-fertilizante na cultura da cana-de-açúcar**. 2014. 61p. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Agricultura). Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNES, Botucatu, SP.

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, n. 2, p. 213-22, 2007.

PAPAGIANNI, M.; PSOMAS, S. K.; BATSILAS, L.; PARAS, S. V.; KYRIAKIDIS, D. A.; LIAKOPOULOUKYRIAKIDES, M. Xanthan production by *X. campestris* in batch cultures. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 73-80, 2001.

PARTIDA-MARTINEZ, L. P.; HERTWECK, C. Pathogenic fungus harbours endosymbiotic bacteria for toxin production. **Nature**, v. 437, p. 884-888, 2005.

PELT-VERKUIL, E., VAN BELKUM, A., HAYS, J. P. Principles and technical aspects of PCR amplification, **Springer**, p.332, 2008.

PEREIRA JR., N.; BON, E. P. S.; FERRARA, M. A. **Tecnologia de bioprocessos**. Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ, 2008.

PEREIRA, T. P. **Interação entre a bactéria promotora de crescimento *Herbaspirillum seropedicae* cepa SmR1 e plantas de milho inoculadas: quantificação de DNA bacteriano por qPCR**. 2014. 103f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

PEREIRA, W. **Produtividade e qualidade tecnológica da cana-de-açúcar inoculada com bactérias diazotróficas**. 2011. 70f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

PEREIRA, W.; LEITE, J. M.; HIPÓLITO, G. de S.; SANTOS, C. L. R. dos; REIS, V. M. Acúmulo de biomassa em variedades de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes estirpes de bactérias diazotróficas. **Revista Ciência Agronômica**, v. 44, n. 22, p367-370, 2013.

PERIN, L. **Estudo da comunidade de bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia* em associação com cana-de-açúcar e descrição de *Burkholderia silvatlantica***. 2007. 103 f. Tese (Doutorado em Agronomia Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

POLIDORO, J. C.; RESENDE, A. S.; QUESADA, D. M.; XAVIER, R. P.; COELHO, C. H. M.; ALVES, B. J. R.; BODDEY R. M.; URQUIAGA, S. **Levantamento da contribuição da fixação biológica de nitrogênio (FBN) para a cultura cana-de-açúcar no Brasil**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2001, p. 26. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 144)

PRADELLA, J.G.C.; OLIVEIRA, M.S.; URENHA, L.C. Produção de inoculantes agrícolas. In: LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo, Edgard Blücher Ltda, v.3, cap.12, p.279-305, 2001.

RADWAN, E. E.; MOHAMED, Z. K.; REIS, V. M. Adição de sais na produção de ácido indol acético por bactérias diazotróficas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, n.10, p.997-1004, 2005.

RADWAN, E. E.; MOHAMED, Z. K., REIS, V. M. Efeitos da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.10, p.987-994, out, 2004.

RADWAN, E.E.; MOHAMED, Z.K.; REIS, V.M. Production of indole-3-acetic acid by different strains of *Azospirillum* and *Herbaspirillum* spp. **Symbiosis**, v.32, p.39-54, 2002.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R Foundation for Statistical Computing**. Viena, Áustria, 2008.

REIS JÚNIOR, F. B. dos; SILVA, L. G. da; REIS, V. M., DÖBEREINER, J. Ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.5, p.985-994, 2000.

REIS, V. M.; ALVES, G. C.; MARRIEL, I. E.; REIS JÚNIOR, F. B.; ZILLI, J. E. **Recomendação de inoculante para a cultura de milho utilizando a bactéria *Herbaspirillum seropedicae*, estirpe BR11417**. Seropédica, RJ: Embrapa Agrobiologia, 2009b. 2p (Embrapa Agrobiologia. Circular Técnica 119. ISSN 1517-8862).

REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; URQUIAGA, S. **Fixação Biológica de nitrogênio associativa: um futuro promissor para cana-de-açúcar e outras gramíneas**. Boletim Informativo da SBCS, p. 28-29, 2009a.

REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; URQUIAGA, S. **Recomendação de uma mistura de estirpes de cinco bactérias fixadoras de nitrogênio para inoculação de cana-de-açúcar: *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11281), *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11335), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BR 11504), *Azospirillum amazonense* (BR 11145) e *Burkholderia tropica* (BR 11366)**. Seropédica, RJ: Embrapa Agrobiologia, 2009d. 4p. (Embrapa Agrobiologia. Circular Técnica 30. ISSN 1519-7328).

REIS, V. M.; OLIVEIRA, A. L. M.; SILVA, M. F.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I.; BODDEY, R. M. AND URQUIAGA, S. Biological Nitrogen Fixation: Towards Poverty Alleviation through Sustainable Agriculture. In: CHIMPHANGO, S. B. M.; VALENTINE, A. J.; ELMERICH, C.; NEWTON, W. E. (Eds.). **Proceedings of the 15th International Nitrogen Fixation Congress and the 12th International Conference of the African Association for Biological Nitrogen Fixation**. Series: Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture , v. 42, 394 p. Dakora, F.D.; 2008.

REIS, V. M.; URQUIAGA, S.; PEREIRA, W.; SILVA, M. F.; HIPÓLITO, G.; OLIVEIRA, O. P.; MORAIS, R. F., LEITE, J. M. SCHULTZ, N.; BAPTISTA, R. B. Eficiência agrônômica do inoculante de cana-de-açúcar aplicado em três ensaios conduzidos no Estado do Rio de Janeiro durante o primeiro ano de cultivo. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2009c. 22 p. (Embrapa Agrobiologia. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 45).

RICHARDS, E. Preparation of genomic DNA from plant tissue. In: **Current Protocols in Molecular Biology** (eds. F.M. Ausubel, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.A. Smith, J.G. Seidman and K. Struhl), p. 232-233. Greene Publishing Associates and WileyInterscience, New York.

RONCATO MACCARI, L. D. B.; RAMOS, H. J. O.; PEDROSA, F. O.; ALQUINI, Y.; CHUBATSU, L. S.; YATES, M. G.; RIGO, L. U.; STEFFENS, M. B. R.; SOUZA, E. M. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses *nif* in gramineous plants. **FEMS Microbiol Ecol**. v. 45, p.39 – 47, 2003.

ROSSETO, R.; DIAS, F. L.; VITTI, A. C. F. Fertilidade do solo, nutrição e adubação. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M. de; LANDELL, M. G. A. de. (org). **Cana-de-açúcar**. Campinas: IAC, v.1, p.221-228, 2010.

ROSSIELO, R. O. P. **Bases fisiológicas na acumulação de nitrogênio e potássio em cana-de-açúcar (*Saccharum spp.* cv. NA 56-79)**. 198. 172p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1987.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. Molecular cloning: a laboratory manual. 3 ed., **Cold Spring Harbor Press**, v.2, p.8004-8102, 2001.

SCHEIDT, W. **Estratégias de cultivo para produção de biomassa e promotores de crescimento por *Herbaspirillum seropedicae* BR11417**. 2015. 119f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

SCHMIDELL, W.; FACCIOTTI, M. C. R. Biorreatores e processos fermentativos. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biocologia**

Industrial: Engenharia Bioquímica. São Paulo, Edgard Blücher Ltda, vol 2, cap.8, p.179-192, 2001.

SCHMIDDEEL, W. Agitação e aeração em biorreatores. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica.** São Paulo, Edgard Blücher Ltda, vol 2, cap.14, p.277-332, 2001.

SCHULTZ, N.; MORAIS, R. F.; SILVA, J. A.; BAPTISTA, R. B.; OLICEIRA, R. P.; LEITE, J. M.; PEREIRA, W.; CARNEIRO JÚNIOR, J. B.; ALVES, B. J. R.; BALDANI, J. I.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. Avaliação agronômica de duas variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas e adubadas com nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, p.261-268, 2012.

SCHULTZ, N.; REIS, V. M.; URQUIAGA, S. **Resposta da cana-de-açúcar à adubação nitrogenada: fontes de nitrogênio, forma de aplicação, épocas de aplicação e efeito varietal.** Seropédica, RJ: Embrapa Agrobiologia, 2015. 52p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos 298, ISSN 1517-8489).

SCHULTZ, N.; SILVA, J. A.; SOUSA, J. S.; MONTEIRO, R. C.; OLIVEIRA, R. P.; CHAVES, V. A.; PEREIRA, W.; REIS, V. M.; URQUIAGA, S. Inoculação de bactérias diazotróficas na cultura de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.38, p.359-371, 2014.

SEGATO, S. V. **Atualização em produção de cana-de-açúcar.** Piracicaba, 2006.

SERRATO, R.V. **Caracterização química e estrutural de exopolissacarídeos produzidos por bactérias diazotróficas endofíticas.** 2008. 177f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

SHIODA, M.; MARAKAMI-MUOFUSHI, K Selective inhibition of DNA polymerase by a polysaccharide purified from slime of *Physarum polycephalum*. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v. 146, p. 61-66, 1987.

SILVA, E. O. **Desenvolvimento de curvas-padrão com aplicabilidade na análise de expressão do RNA mensageiro de genes da superfamília dos receptores nucleares.** 2014. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, São Paulo, SP.

SILVA, M. F. da; OLIVEIRA, P. J. de; XAVIER, G. R., RUMJANEK, N. G.; REIS, V. M. Inoculantes formulados com polímeros e bactérias endofíticas para a cultura da cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.11, p.1437-1443, 2009.

SILVA, M. F. **Uso de inoculante polimérico contendo bactérias diazotróficas na cultura de cana-de-açúcar.** 2009. 80f. Tese (Doutorado em Agronomia – Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

SINGH, U. S.; KAPOOR, K. **Microbial biotechnology.** Jaipur: Oxford Book Company, 310p. 2010.

SOARES, L. H. de B.; FERNANDES, V. H.; FACHIM, D. L.; REIS, V. M. Tecnologia de bioprocessos aplicada ao desenvolvimento de inoculantes e novos insumos biológicos. **Anais da XVI Relare**, Londrina, PR, ago, 2012. (Embrapa soja – Documento 350. ISSN 2176-2937).

SOUSA, P. M. **Otimização do processo de produção de células das estirpes de *Bradyrhizobium* INPA 3-11B e UFLA 3-84, inoculantes do feijão**. 2011. 141p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

STRALIOTTO, R.; TEIXEIRA, M.G.; MERCANTE, F.M. Fixação biológica de nitrogênio. In: AIDAR, H.; KLUTHCOUSKI, J.; STONE, L.F. (Ed.). **Produção do feijoeiro-comum em várzeas tropicais**. Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, p.121-153, 2002.

URQUIAGA, S.; CRUZ, K. H. S.; BODDEY, R. M. Contribution o nitrogen fication to sugarcane: nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. **Soil Science Society of America Journal**, v.56, p. 105-114, 1992.

TAULÉ, C.; MAREQUE, C.; BARVOCCO, C.; HACKEMBRUCH, F.; REIS, V. M.; SICARDI, M.; BATTISTONI, F. The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community. **Plant and Soil**, v. 356, p. 35-49, 2011.

TITTABUTR, P.; PAYAKAPONG, W.; TEAUMROONG N.; SINGLETON W.; BOONKERD N. Growth, survival and field performance of *Bradyrhizobial* liquid inoculant formulations with polymeric additives. **ScienceAsia**, v.33, p. 69-77, 2007.

URQUIAGA, S.; XAVIER, R. P.; MORAIS, R. F. de; BAPTISTA, R. B.; SCHULTZ, N.; LEITE, J. M. e; BARBOSA, K. P.; RESENDE, A. S. de; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M. Evidence of field nitrogen balance and ¹⁵N natural abundance data for the contribution of biological N₂ fication to Brazilian sugarcane varieties. **Plant and Soil**, v. 35, p. 5-22, 2012.

VALASEK, M.; REPA, J. The power of real-time PCR. **Advances in Physiology Education**, v. 29, n. 3, p. 15159, 2005.

VITTI, G. C.; CANTARELLA, H.; TRIVELIN, P. C. O.; ROSSETO, R. Nitrogênio. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M. de; LANDELL, M. G. A. de. (Org). **Cana-de-açúcar**. Campinas: IAC, v.1, p.239-270, 2010.

ZHANG, T.; FANG, H. H. Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.70, n. 3, p. 281-289, 2006.

8. ANEXOS

1. Meios de Cultura

1.1 DYGS modificado (DÖBEREINER et al.,1995)

- 8,75 ml de glicerol;
- 3,5 g de extrato de levedura;
- 0,5 g de K_2HPO_4 ;
- 0,5 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$.

O pH foi ajustado para 6,0 com solução de KOH a 10% e/ou solução de H_2SO_4 a 5%. Para o meio sólido, serão adicionados $15g L^{-1}$ de ágar bacteriológico.

1.2 JNFb (DÖBEREINER et al., 1995)

Para produção de solução estoque de bactérias, utilizou-se meio JNFb composto, para 1,0 L de água destilada, por:

- 5,0 g de ácido málico;
- 0,6 g de K_2HPO_4 ;
- 1,8 g de KH_2PO_4 ;
- 0,2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$;
- 0,1 g de NaCl;
- 0,02 g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$;
- 2,0 mL de solução de micronutrientes;
- 4,0 mL de FeEDTA;
- 1 mL de solução de vitaminas;
- 4,5 g de KOH.

O pH foi ajustado para 6,0 com solução de KOH a 10% e/ou solução de H_2SO_4 a 5%. Originalmente, a este meio adiciona-se 2,0 mL de azul de bromotimol, porém geralmente não se utiliza corantes no preparo de soluções estoque de bactérias.