

UFRRJ

INSTITUTO DE AGRONOMIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

CIÊNCIA DO SOLO

DISSERTAÇÃO

**Cultivo Simultâneo de *Paraburkholderia tropica* e
Gluconacetobacter diazotrophicus para a Produção
de Inoculante**

Luana Sousa Costa

2018



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CIÊNCIAS DO SOLO**

**CULTIVO SIMULTÂNEO DE *PARABURKHOLDERIA TROPICA* E
GLUCONACETOBACTER DIAZOTROPHICUS PARA A PRODUÇÃO DE
INOCULANTE**

LUANA SOUSA COSTA

Sob a Orientação da Pesquisadora
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 Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo

Seropédica, RJ
Agosto de 2018

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico
Ficha catalográfica elaborada com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C387c

Costa, Luana Sousa 1992-

Cultivo simultâneo de *Paraburkholderia tropica* e *Gluconacetobacter diazotrophicus* para a produção de inoculante / Luana Sousa Costa. Seropédica, 2018.

48 f.: il.

Orientadora: Veronica Massena Reis.

Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo, 2018.

1. Bioprocesso. 2. Cana-de-açúcar. 3. BPCV. I. Reis, Veronica Massena, 1961-, orient. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo. III. Título.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

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
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA - CIÊNCIAS DO SOLO

LUANA SOUSA COSTA

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 07/08/2018.

Veronica Massena Reis. Dra. Embrapa Agrobiologia
(Orientadora)

Irene da Silva Coelho. Dra. UFRRJ

Leda Maria Fortes Gottschalk. Dra. Embrapa Agroindústria de Alimentos

DEDICATÓRIA

Às mulheres que me antecederam e que com muita luta e dedicação abriram as portas para que hoje eu pudesse escolher o espaço que quero ocupar (espero que em um futuro recente isto deixe de ser um privilégio).

Dedico.

*Ao povo brasileiro que subsidia o ensino superior público, gratuito e de qualidade.
Ofereço.*

AGRADECIMENTOS

A Santíssima Trindade que em infinita bondade me contemplou com tantas oportunidades, cuidado, proteção e auxílio nas horas mais difíceis. E mesmo com toda a minha rebeldia, nunca deixou de me amparar e por onde eu ando me presenteia com pessoas incríveis.

Ao papai, Eurico, e a mamãe, Aloiza, que sempre me apoiaram e fizeram das triplas (ligações) coração para que eu conseguisse traçar a minha jornada acadêmica. São referência de amor fraterno, generosidade e cuidado.

À minha irmã Verônica (que me deu os mais valiosos presentes que uma irmã poderia dar, meus sobrinhos Sophia e Miguel) e meu irmão Eudes que são tão compreensivos, por cuidar e dar atenção aos nossos pais, por me apoiarem e também me socorrerem emocionalmente e financeiramente. Sou muito feliz por ter irmãos como vocês!

A toda a minha família, pela preocupação, carinho e atenção. Especialmente a minha vovó Preta, as minhas tias e primas, sem todos os seus carinhos e mimos, eu, não seria eu.

Às minhas amigas para a vida toda, Larissa e Vanessa, que estão sempre presentes e são como a minha família no Rio.

Ao meu companheiro e amigo, Ronnier, pelo seu amor, cuidado e compreensão nas vezes que me fiz ausente.

À minha amiga Fran, que foi sem dúvida o grande presente deste finalzinho de mestrado, presente que quero ter para toda a vida. Deus é bom o tempo todo!

À minha amiga tia Pri (Priscila) que me auxiliou em momentos muito difíceis de modo carinhoso e paciente, esteve sempre à disposição para me ajudar, sem você teria sido muito mais difícil concluir este trabalho.

Aos colegas do Alojamento Embrapa e aos sobreviventes da casa de hóspedes, Ernandes, Aolibama, Edevaldo e Felipe, que foram pacientes e compreensivos nesse momento tão delicado.

Ao Cleudison por toda ajuda na parte de biologia molecular.

A todas as profissionais que trabalham no CRB-JD, pela paciência e colaboração que foram fundamentais para eu desenvolver este trabalho. De modo especial, a Damaris e a Eliane que me acolheram como uma filha, foi muito mais divertido desenvolver as atividades da pesquisa estando com vocês.

Ao seu Claudinho que com muito carinho nos atende e é o nosso braço direito, auxiliando na lavagem e esterilização de todo o material utilizado, aos guardas pela segurança proporcionada nas noites nos laboratórios e à analista do laboratório de Bioquímica, Carolina, que com muito bom humor, esteve sempre à disposição.

A todos os colegas do laboratório de gramíneas, em especial ao Wilson, que com muita paciência esteve sempre à disposição para tirar dúvidas e ajudar com a sua valiosa experiência.

À minha orientadora, Dra. Veronica, pela disponibilidade, ensinamentos e paciência.

Ao meu orientador, Dr. Luis, que com muita paciência e bom humor esteve ao meu lado no laboratório, me ensinando que “não existe autodidata na ciência”.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo pela oportunidade e suporte. A todos os professores e professoras pelos valiosos ensinamentos e incansável esforço em contribuir com o avanço do conhecimento.

À UFRRJ que será lembrada sempre com muito carinho, por todo o suporte e assistência estudantil, desde a graduação, que foi fundamental para que eu conseguisse concluir os estudos.

Aos órgãos de fomento à pesquisa, Capes, CNPq e Faperj pela infraestrutura do programa e bolsas de estudos, subsidiando o, tão fragilizado no momento, desenvolvimento científico no nosso país.

*“Aprendi que se depende sempre
De tanta, muita, diferente gente
Toda pessoa sempre é as marcas
Das lições diárias de outras tantas pessoas
E é tão bonito quando a gente entende
Que a gente é tanta gente onde quer que a gente vá
E é tão bonito quando a gente sente
Que nunca está sozinho por mais que pense estar”
Caminhos do coração – Gonzaguinha*

RESUMO

COSTA, Luana Sousa. **Cultivo simultâneo de *Paraburkholderia tropica* e *Gluconacetobacter diazotrophicus* para a produção de inoculante.** 2018. 48f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

Um inoculante misto foi proposto para a cana-de-açúcar em 2008 com base em estudos de longo prazo de inoculação e desempenho de bactérias diazotróficas na promoção do crescimento da planta. No entanto, este produto não está disponível para os produtores provavelmente pela dificuldade de desenvolvimento de bioprocessos para a multiplicação industrial dos microrganismos. Parâmetros associados ao crescimento foram testados para estabelecer a máxima produção de biomassa de células mediante cultivo simultâneo de duas estirpes que compõem o inoculante misto, *Paraburkholderia tropica* (estirpe BR 11366) e *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11281) visando à produção de inoculantes comerciais. Estabeleceu-se através de curvas de crescimento em agitador orbital que a temperatura ótima de crescimento para as estirpes é 32 °C, com velocidade específica de crescimento máximo $\mu_{\text{máx}} = 0,77 \text{ h}^{-1}$ e $\mu_{\text{máx}} = 0,87 \text{ h}^{-1}$ para a BR11281 e BR11366 respectivamente. As estirpes têm eficiência de crescimento distinto nas condições avaliadas. Mesmo assim não houve inibição de crescimento entre as estirpes, sendo possível cultivá-las simultaneamente. Sendo a máxima produção de número de cópias de DNA mL^{-1} em cultivo simultâneo (quantificada através de PCR em tempo real) observada em biorreator de bancada, com aeração de 4 L min^{-1} e temperatura a 32 °C, chegando a $2,02 \cdot 10^9$ n° de cópias de DNA mL^{-1} da BR11281 e $5,05 \cdot 10^{10}$ n° de cópias de DNA mL^{-1} da BR11366.

Palavras-chave: Bioprocesso. Cana-de-açúcar. BPCV.

ABSTRACT

COSTA, Luana Sousa. **Simultaneous culture with *Paraburkholderia tropica* and *Gluconacetobacter diazotrophicus* for the production of inoculant**. 2018. 48p. Dissertation (Marter's degree in Agronomy, Soil Science). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

A mixed inoculant was proposed for sugarcane in 2008 based on long-term studies of inoculation and performance of diazotrophic bacteria in promoting plant growth. However, this product is not available to producers probably because of the difficulty of developing bioprocesses for the industrial multiplication of microorganisms. Parameters associated with growth were tested to establish maximal cell biomass production by simultaneous cultivation of two strains comprising the mixed inoculant, *Paraburkholderia tropica* (strain BR 11366) and *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11281) for the production of commercial inoculants. It was established through growth curves in orbital shaker that the optimum growth temperature for the strains is 32 °C, with maximum growth specific velocity $\mu_{\max} = 0.77 \text{ h}^{-1}$ and $\mu_{\max} = 0.87 \text{ h}^{-1}$ for BR11281 and BR11366 respectively. The strains have distinct growth efficiency under the evaluated conditions. Even so, there was no inhibition of growth between the strains, being possible to cultivate them simultaneously. The maximum production of DNA copy number mL^{-1} in simultaneous culture was observed in a bench bioreactor, with aeration of 4 L min^{-1} and temperature at 32 °C, reaching $2.02 \cdot 10^9$ DNA copy number mL^{-1} of BR11281 and $5.05 \cdot 10^{10}$ DNA copy number mL^{-1} of BR11366.

Key words: Bioprocessing. Sugarcane. PGPB.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama demonstrativo com exemplos de organismos fixadores de nitrogênio atmosférico nos agroecossistemas e ecossistemas naturais (Modificado de HERRIDGE, PEOPLES e BODDEY, 2008).....	5
Figura 2. Fotomicrografia de <i>G. diazotrophicus</i> com flagelos laterais, por MET. Disponível em https://www.cnpab.embrapa.br/pesquisas/gp.html	6
Figura 3. Fotomicrografia de uma célula de <i>B. tropica sp.</i> por MET, mostrando três flagelos polares. Coloração negativa (silicotungstato de sódio aquoso 1% por 30 s). (Modificado de Reis et al., 2004).	8
Figura 4. Esquema geral de um bioprocesso (SCHMIDELL et al., 2001).....	12
Figura 5. A) Crescimento da estirpe BR11281 em presença da estirpe BR11366; B) Crescimento da estirpe BR11366 em presença da BR11281.	22
Figura 6. Crescimento celular sob agitação de 150 rpm variando a temperatura: 30, 32 e 35 °C. A) <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> BR11281 e B) <i>Paraburkholderia tropica</i> BR11366 e C) Cultivo simultâneo.....	24
Figura 7. Curvas de crescimento celular e produção de compostos indólicos da estirpe BR11281, sob agitação de 150 rpm variando a aeração: A) 2 L min ⁻¹ ; B) 3 L min ⁻¹ e C) 4 L min ⁻¹	26
Figura 8. Cromatograma de padrões dos ácidos (10 g L ⁻¹): 1 = oxálico, 2 = cítrico, 3 = glucônico, 4 = succínico, 5 = fórmico e 6 = acético.	27
Figura 9. Cromatograma das amostras de cultivo retiradas com intervalos de 2 h entre 0 e 16 h de incubação da estirpe BR11281 em biorreator de bancada sob agitação de 150 rpm, 32 °C e aeração de 4 L min ⁻¹ (1 = ácido oxálico / 2 = ácido cítrico / 3 = ácido glucônico / 4 = ácido succínico / 6 = ácido acético).....	27
Figura 10. Cromatograma das amostras de cultivo retiradas com intervalos de 2 h entre as 18 e 28 h de incubação da estirpe BR11281 em biorreator de bancada sob agitação de 150 rpm, 32 °C e aeração de 4 L min ⁻¹ (1 = ácido oxálico / 2 = ácido cítrico / 3 = ácido glucônico / 4 = ácido succínico).	28
Figura 11. Crescimento celular da estirpe BR11366 em biorreator de bancada com 2 L de meio, sob agitação de 150 rpm variando a aeração: A) 2 L min ⁻¹ , B) 3 L min ⁻¹ , C) 4 L min ⁻¹	30
Figura 12. Cromatograma de padrões dos ácidos (10 g L ⁻¹): 1) oxálico, 2) cítrico, 3) glucônico, 4) succínico, 5) fórmico e 6) acético.....	31
Figura 13. Cromatograma das amostras de cultivo retiradas com intervalos de 2 h entre 0 e 12 horas de crescimento da estirpe BR11366 em biorreator de bancada sob agitação de 150 rpm, 32 °C e aeração de 4 L min ⁻¹ (1 = ácido oxálico / 2 = ácido cítrico / 4 = ácido succínico / 6 = ácido acético).....	31
Figura 14. Crescimento celular de cultivo simultâneo em biorreator de bancada com 2 L de meio com as estirpes BR11281 e BR11366, sob agitação de 150 rpm variando a aeração: A) 3 L min ⁻¹ e B) 4 L min ⁻¹	32

- Figura 15.** Cromatograma das amostras de cultivo simultâneo no tempo 0 em biorreator de bancada sob agitação de 150 rpm, 32 °C e aeração de 4 L min⁻¹. (1 = ácido oxálico / 2 = ácido cítrico / 4 = ácido succínico). 32
- Figura 16.** Cromatograma das amostras de cultivo simultâneo com 14 h em biorreator de bancada sob agitação de 150 rpm, 32 °C e aeração de 4 L min⁻¹. (1= ácido oxálico / 2= ácido cítrico / 3= ácido glucônico / 6= ácido acético). 33
- Figura 17.** Cromatograma das amostras de cultivo simultâneo com 22 h em biorreator de bancada sob agitação de 150 rpm, 32 °C e aeração de 4 L min⁻¹. (1 = ácido oxálico / 2 = ácido cítrico / 4 = ácido succínico). 33
- Figura 18.** Curvas padrão para (A) BR11281 iniciadores 4525 e (B) BR11366 iniciadores 3641, por meio de amplificação do DNA genômico por PCR em tempo real. 34
- Figura 19.** Quantificação em número de cópias de DNA mL⁻¹ (por PCR em tempo real) das estirpes envolvidas no crescimento celular simultâneo com BR11281 e BR11366 em agitador orbital sob agitação de 150 rpm variando a temperatura: A) 32 °C e B) 35 °C. . 34
- Figura 20.** Quantificação em número de cópias de DNA mL⁻¹ (por qPCR) das estirpes envolvidas no crescimento celular simultâneo com a BR11281 e BR11366 em biorreator de bancada a 32°C e 150 rpm, variando a aeração: A) 3 L min⁻¹ e B) 4 L min⁻¹ durante 24 h. 35
- Figura 21.** Log₁₀ UFC mL⁻¹ da população de bactérias em inoculantes após um dia do seu preparo. (CS = cultivo simultâneo e CI = cultivo individual). 36
- Figura 22.** Contagem de células viáveis de inoculante em meio sólido LGI-P 24 h após a finalização do bioprocesso. A) Inoculante sólido da BR11281 (diluição 10⁻⁶); B) Inoculante sólido da BR11366 (diluição 10⁻⁶); C) Inoculante sólido do cultivo simultâneo da BR11281 e BR11366 (diluição 10⁻⁶) e; D) Inoculante sólido do cultivo individual e posterior mistura da BR11281 e BR11366 (diluição 10⁻⁷). 37

ÍNDICES DE TABELAS

Tabela 1. Quantidade de doses de inoculantes comercializadas no período de 2011 a 2016 no Brasil, por tipo de veículo imobilizador (turfoso ou líquido) para as culturas. (Dados modificados de ARAÚJO & CASTRO, 2017).....	9
Tabela 2. Parâmetros de crescimento: velocidade máxima específica de crescimento $\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1}), tempo de geração G (h) e produção máxima de biomassa $X_{\text{máx}}$ (g L^{-1}) das estirpes BR11281 e BR11366 incubadas em agitador orbital sob rotação de 150 rpm e temperaturas de 30, 32 e 35 °C.....	24

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Cana-de-Açúcar	3
2.2. Bactérias Promotoras de Crescimento em Cana-de-Açúcar	3
2.3. <i>Gluconacetobacter Diazotrophicus</i>	6
2.4. <i>Paraburkholderia Tropica</i>	7
2.5. Inoculantes e Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal (BPCV)	9
2.6. Bioprocessos	11
2.7. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real – QPCR	14
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. Teste de Antibiose	16
3.6. Pré-Inóculo.....	16
3.7. Curvas de Crescimento	16
3.7.1. Curvas em agitador orbital	16
3.8. Preparo do Inoculante	17
3.9. Métodos Analíticos	18
3.9.1. Tempo de geração e taxa específica de crescimento.....	18
3.9.2. Concentração celular mássica	19
3.9.3. Concentração dos compostos indólicos	19
3.9.4. Identificação de ácidos orgânicos	19
3.9.5. Análises moleculares.....	20
3.9.6. Lise celular	20
3.9.7. PCR em tempo real	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1. Teste de Antibiose	22
4.2. Curvas de Crescimento em Agitador Orbital.....	22
4.3. Curvas de Crescimento em Biorreator de Bancada	25
4.3.1. Curvas de crescimento individuais	25

4.4. Quantificação das Estirpes Br11281 E Br11366 Cultivadas Simultaneamente por PCR Em Tempo Real	33
4.4.1. Curvas padrão.....	33
4.4.2. Cultivos em agitador orbital.....	34
4.4.3. Cultivo Simultâneo e em bioreator	35
4.4.4. Contagem de células viáveis no inoculante	36
5. CONCLUSÕES	38
7. REFERÊNCIAS	39
8. ANEXOS	47

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar está entre as commodities mais importantes do nosso país. Na última safra a produção foi de aproximadamente 700 milhões de toneladas em uma área de 10 milhões de ha (IBGE, 2017). Para produzir esta quantidade estima-se foram utilizados 570 mil toneladas de nitrogênio, para cada tonelada de nitrogênio mineral utilizado na agricultura são emitidos aproximadamente 450 g de gases equivalentes de efeito estufa (GEEE) (ROBERTSON & GRACE, 2004). O nosso país encontra-se em uma posição privilegiada no globo e as condições climáticas podem ser consideradas catalisadoras para o metabolismo microbiano. Com o avanço do conhecimento sobre os recursos biológicos e suas potencialidades, o Brasil a cada dia torna-se referência no uso de insumos biológicos na agricultura. Além disso, a adoção destes insumos associado a práticas conservacionistas são apontados como solução para que a atividade agropecuária alcance o patamar de baixa emissão de carbono.

Os estudos pioneiros de DÖBEREINER et al. (1988) mostraram a capacidade de gramíneas se associarem com diferentes espécies de bactérias diazotróficas. Várias espécies foram isoladas de raízes, colmos e folhas de cana-de-açúcar, entre elas: *Acetobacter diazotrophicus* (CAVALCANTI & DÖBEREINER, 1988) posteriormente renomeada dentro do gênero *Gluconacetobacter* (YAMADA et al., 1997) e estudos posteriores isolaram outras espécies das quais destacaram-se *Herbaspirillum seropedicae* (BALDANI et al., 1986), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BALDANI et al., 1996), *Azospirillum amazonense* (MAGALHÃES et al., 1983) recentemente renomeado dentro do novo gênero *Nitrospirillum* (LIN et al., 2014 gen. nov.) e *Burkholderia tropica* (REIS et al., 2004), também renomeada dentro do gênero *Paraburkholderia* (SAWANA et al., 2014). Estas espécies e muitas outras descritas como colonizando esta cultura podem ser usadas na forma de um produto agrícola. O uso biotecnológico destas espécies torna-se viável a partir dos estudos de eficiência agronômica e recomendação de seu uso com o registro da estirpe / produto no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). A estimativa de economia pelo uso de microrganismos diazotróficos a partir de produtos testados pode representar uma economia de N fertilizante. Uma estimativa de substituição de 50% da dose recomendada de N fertilizante para cana planta de 60 kg N ha⁻¹, representaria uma economia de 150.000 toneladas 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., 2009).

No Brasil, a indústria de inoculantes se desenvolveu de acordo com a demanda de inoculantes para a cultura da soja, com a construção da primeira fábrica de inoculantes em 1956 no Rio Grande do Sul. Hoje a Associação Nacional de Produtores e Importadores de Inoculantes (ANPII) conta com 10 indústrias associadas, sendo estas responsáveis pela produção de 80% dos inoculantes comercializados no país. O inoculante para soja continua sendo o carro chefe destas indústrias, mas conforme o avanço das pesquisas em prospectar novos microrganismos, hoje se encontra no mercado inoculantes para feijão, feijão-caupi e algumas leguminosas florestais. Além disso, de um total de 50 milhões de doses comercializadas no ano de 2016, aproximadamente dois milhões de doses de inoculantes foram comercializados para a cultura do arroz, milho, trigo e algumas pastagens (ARAÚJO & CASTRO, 2017). Observa-se que o mercado de inoculantes vem crescendo e que existe demanda e potencial para produção de inoculantes para gramíneas com as bactérias promotoras de crescimento vegetal.

Baseado em estudos de eficiência agrônômica descritos em diversas publicações (OLIVEIRA et al., 2006; SCHULTZ et al., 2014, 2016; PEREIRA et al., 2018), a proposta inicial de inoculante para a cana era de uma mistura de cinco estirpes, mas o produto final destes vários anos de trabalho será feito com apenas uma das cinco estirpes testada anteriormente devido a facilidade de sua produção. Este primeiro produto recomendado para a cana-de-açúcar foi registrado junto ao MAPA, através de uma parceria público-privada entre a Embrapa e a Basf, sendo formulado com a estirpe *Nitrospirillum Amazonense*, a formulação terá veículo líquido e baseado em testes de eficiência agrônômica será recomendado para aplicação no sulco de plantio. O inculante está em fase de desenvolvimento de mercado e a expectativa é que seja lançado ainda em 2019.

Os testes de eficiência foram feitos com as cinco aplicadas individualmente e comparado com a mistura mais complexa. Este é um fato que vai além da pesquisa científica inicial pois trata do bioprocessamento fermentativo de multiplicação celular e estabilização do número final de células vivas. A fase industrial para se obter uma mistura de duas ou mais estirpes/espécies seria um desafio maior e mais oneroso. Outros entraves referem-se a falta de descrição de bioprocessos necessários para a multiplicação destas estirpes/espécies microbianas.

Para atender a demanda sobre o bioprocessamento em escala industrial, este trabalho tem como objetivo estabelecer as condições de máxima obtenção de biomassa mediante cultivo simultâneo das estirpes *Paraburkholderia tropica* (estirpe BR11366) e *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR11281), por meio de ajustes dos parâmetros de crescimento. A hipótese deste estudo visa descrever o cultivo simultâneo de duas espécies de bactérias, *Paraburkholderia tropica* (estirpe BR11366) e *Gluconacetobacter diazotrophicus* (estirpe BR11281) de modo a viabilizar tecnologicamente o processo para a produção de um inoculante misto destinado a lavouras de cana-de-açúcar.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Cana-de-Açúcar

A cana-de-açúcar pertence à família *Poacea*, tribo *Andropogonea*, subtribo *Saccharine*. A subtribo *Saccharine* possui 10 gêneros, dentre os quais, *Erianthus erundinaceus*, *Miscanthus*, *Sclerostachya*, *Norenga*, *Ripidium* e *Saccharum*, formam um grupo de intercruzamento muito próximo denominado “Complexo *Saccharum*”, envolvidos na origem da cana-de-açúcar. O gênero *Saccharum* é a base genética das principais espécies cultivadas comercialmente no mundo e compreende 6 espécies: *S. officinarum*, *S. robustum*, *S. spontaneum*, *S. sinense*, *S. barberi* e *S. edule*.

Esta cultura é encontrada em mais de 130 países, sendo Brasil, Índia e China os líderes de produção (ZAMPIERI, 2013). Desde 1522 registra-se o cultivo de cana-de-açúcar no Brasil (BASTOS, 1987); sendo que a partir de 1970 esta cultura passou a ser incentivada por políticas públicas do Governo Federal, dada a sua potencialidade como fonte de energia renovável com a produção de etanol, uma solução à época para a crise energética emergente (Barela, 2005). O aumento do consumo doméstico fez com que o etanol conquistasse espaço no segmento agroindustrial do país. Segundo o IBGE, no ano safra de 2016 a área plantada de cana-de-açúcar foi de aproximadamente 10 milhões de hectares. A produção de cana-de-açúcar, estimada para a safra de 2017/18, é de 694,54 milhões de toneladas, 4,4% superior em relação à safra anterior. Esses dados demonstram que a cana é uma importante cultura para a economia do país e atualmente ocupa a terceira posição na balança comercial do agronegócio, principalmente por conta da exportação de açúcar, álcool e energia.

As pesquisas têm buscado equilibrar sustentabilidade com produtividade, selecionando novo genótipos, mais adaptados a determinadas regiões e com maior especificidade para a associação com bactérias diazotróficas. As doses de adubos nitrogenados utilizados em áreas de cana-de-açúcar no Brasil são, em média, de 40 kg ha⁻¹ de nitrogênio (N) na cana-planta e de 80 kg ha⁻¹ de N nas soqueiras, com alguns registros de baixa eficiência de uso do N pelas plantas e até mesmo ausência de respostas a essa adubação nitrogenada (NUNER JUNIOR et al., 2005). Desse modo, a inoculação com bactérias diazotróficas é apontada como uma alternativa eficiente para a nutrição da planta e equilíbrio do seu agroecossistema.

2.2. Bactérias Promotoras de Crescimento em Cana-de-Açúcar

As bactérias promotoras de crescimento de vegetal (BPCV) são bactérias que podem estimular o crescimento das plantas, atuar em mecanismos de resistência a doenças e estresses abióticos por meio de uma ampla variedade de mecanismos. Os mecanismos, comumente descritos, pelos quais as BPCV estimulam o crescimento das plantas envolvem a disponibilidade de nutrientes regulados através de processos genéticos, como a fixação biológica de nitrogênio e solubilização de fosfato, tolerância a estresse através da modulação da expressão da ACC deaminase e a produção de fitohormônios e sideróforos. A fixação biológica de nitrogênio (N₂) atmosférico (FBN) é um processo realizado por microrganismos que podem ser encontradas em vários ambientes, vivendo livremente ou associadas a outros seres vivos (Figura 1). Este processo é muito importante para a manutenção da vida no planeta e apresenta benefícios relacionados à nutrição dos organismos e a fertilidade do solo. A FBN é realizada por organismos denominados diazotróficos que representam uma pequena parcela de espécies dos procariotos. A FBN ocorre devido ao complexo enzimático da nitrogenase, que é capaz de quebrar a tripla ligação do N₂ atmosférico e reduzi-lo a duas moléculas de amônia. A nitrogenase é uma enzima altamente conservada que compreende duas metaloproteínas, FeMo-proteína e Fe-proteína (DIXON & KAHN, 2004; MUS et al.,

2018). Embora existam muitas diferenças morfológicas, fisiológicas e genéticas entre os microrganismos diazotróficos, bem como uma enorme variabilidade de ambientes onde eles podem ser encontrados, todos eles contêm a enzima nitrogenase (ZEHR et al., 2003).

Muitas espécies de microrganismos são utilizadas no cultivo de plantas de interesse econômico com o objetivo de promover o crescimento das plantas hospedeiras sem o uso de fertilizantes nitrogenados. A produção de soja (*Glycine max L.*) no Brasil é um excelente exemplo da eficiência da FBN através do uso de diferentes estirpes de *Bradyrhizobium sp.* (ALVES et al., 2004, TORRES et al., 2012), com base nos preços atuais, o uso dessas estirpes resultam em uma economia de US\$ 13 bilhões anuais, que deixam de ser gastos com fertilizantes nitrogenados. A importância das bactérias endofíticas fixadoras de N₂ também tem sido objeto de estudos em plantas não leguminosas como a cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum L.*).

A interação entre bactérias diazotróficas endofíticas e plantas da família das Gramíneas é um tipo particular de associação, pois as bactérias colonizam os tecidos vegetais sem causar qualquer sintoma de doença, e promove o crescimento das plantas (DOBEREINER, 1992). Relações endofíticas não-simbióticas ocorrem dentro dos espaços intercelulares dos tecidos vegetais, que contêm altos níveis de carboidratos, aminoácidos e nutrientes inorgânicos. Diversas bactérias diazotróficas foram localizadas na rizosfera e colonizando o interior de tecidos das plantas de cana-de-açúcar.

A associação de bactérias diazotróficas que fixam o nitrogênio atmosférico com plantas de interesse econômico é uma excelente opção para a substituição, mesmo que parcial, da adubação nitrogenada. Estudos vêm sendo conduzidos no sentido de diminuir a adubação nitrogenada em diversas culturas, e para a cana-de-açúcar os estudos são realizados no sentido de identificar e selecionar genótipos com maior potencial para a FBN, práticas no manejo da cultura e a seleção de estirpes de bactérias eficientes (OLIVEIRA et al., 2002).

Ao longo de anos de estudos, foram descritos inúmeros gêneros de bactérias e já há bastante conhecimento sobre a ecologia, fisiologia e genética desses microrganismos. Além disso, experimentos foram conduzidos para avaliar a contribuição desses microrganismos como promotores de crescimento vegetal. Estudos de alguns genótipos de cana-de-açúcar sugerem que a contribuição da FBN para a nutrição nitrogenada da cana-de-açúcar no Brasil chega a pelo menos 40 kg ha⁻¹ de N (URQUIAGA et al., 2012). Segundo Boddey et al. (2001), a contribuição da FBN para variedades de cana colhidas em áreas produtoras no Brasil é em média de 30%. Considerando os 8 milhões de hectares de área plantada, o suprimento de 30% da demanda de N pela FBN certamente contribuirá para a sustentabilidade no manejo desta cultura.

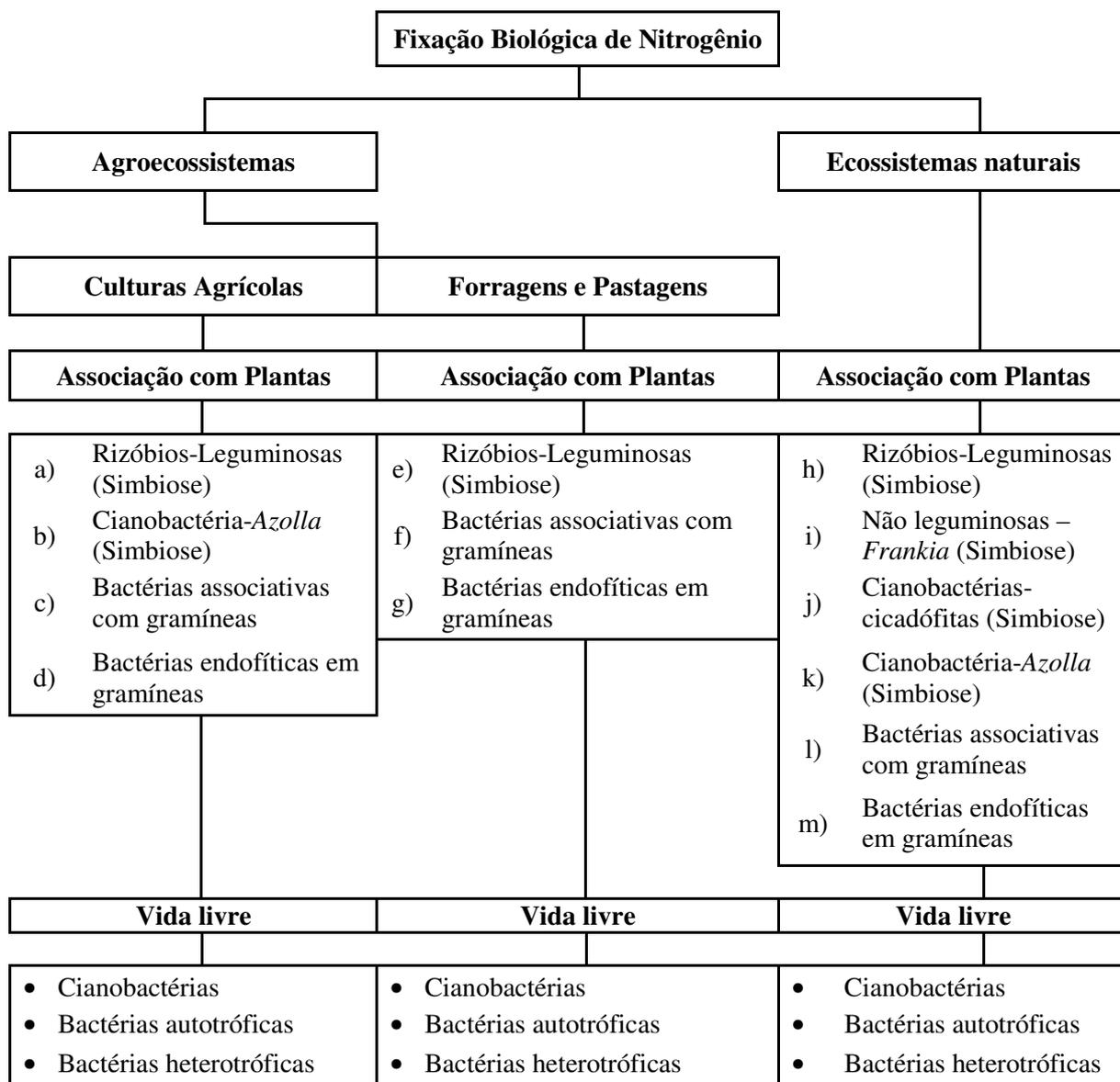


Figura 1. Diagrama demonstrativo com exemplos de organismos fixadores de nitrogênio atmosférico nos agroecossistemas e ecossistemas naturais (Modificado de HERRIDGE, PEOPLES e BODDEY, 2008).

Em 2006, Oliveira e colaboradores observaram que uma mistura de cinco estirpes pertencentes a cinco gêneros de bactérias diazotróficas isoladas da própria cultura e aplicadas em mistura era capaz de atingir o patamar descrito por Boddey et al (2001) de contribuição de 31% do N advindo da fixação. Esta mistura consistia de: *Gluconacetobacter diazotrophicus* estirpe BR11281^T, *Herbaspirillum seropedicae* BR11335, *Herbaspirillum rubrisubalbicans* BR11504, *Nitrospirillum amazonense* BR11145 e *Paraburkholderia tropica* BR11366. Posteriormente esta mistura foi recomendada para aplicação em cana na forma de um inoculante turfoso (REIS et al., 2009). Schultz et al. (2012), estudando a contribuição do inoculante para a cana-de-açúcar em algumas variedades, observou que a variedade RB867515 apresentava uma quantidade de N total acumulado na parte aérea similar ao controle com aplicação de 120 kg ha⁻¹ de N-fertilizante em condições de campo. Enquanto que Pereira et al. (2013) realizando experimento também à campo comparando seis variedades também observaram que essa mesma variedade respondeu positivamente à

inoculação. Esses estudos sugerem que a FBN em cana-de-açúcar é dependente das variedades utilizadas, fertilidade do solo e o manejo da cultura.

Este trabalho propõe a continuidade dos estudos de obtenção de células das estirpes de duas espécies de bactérias diazotróficas isoladas de cana-de-açúcar de forma a propor requisitos de crescimento para a obtenção de bioprocessos. Para tanto, selecionou-se as estirpes BR11366 e BR11281 para estabelecer os parâmetros de máxima obtenção de células a partir de um cultivo simultâneo, buscando reduzir custos e tornar o processo viável em escala industrial.

2.3. *Gluconacetobacter diazotrophicus*

A *Gluconacetobacter diazotrophicus* (YAMADA et al. 1997) foi originalmente isolada de raízes de cana-de-açúcar por Cavalcante e Dobereiner (1988). Esta espécie caracteriza-se como Gram-negativa pertencente ao grupo α -Proteobactéria, ácido-tolerante, aeróbica obrigatória, com células medindo 0,7 a 0,9 μm por 1-2 μm , com flagelos laterais, não formando esporos nem nódulos. Cresce bem em meio de cultura a 30° C, pH de 5,5 e altas concentrações de sacarose (10%). Tolerância a pH mais baixos (inferiores a 3,0), concentrações de sacarose de até 30% em meio de cultivo e tem a habilidade de fixar nitrogênio somente em condições de microaerofilia (CAVALCANTE e DÖBEREINER, 1988). Apresenta boa adaptação a outras condições extremas como temperaturas elevadas e altas concentrações de sal em meio de cultura (TEJERA et al., 2005). É considerada uma das bactérias mais importantes associada a cana-de-açúcar, sendo encontrada em alto número colonizando o interior de tecidos de raízes, colmos e folhas (CAVALCANTE e DOBEREINER, 1988).

A associação entre a *G. diazotrophicus* e a cana-de-açúcar é denominada endofítica obrigatória, já que a bactéria se limita ao interior da planta, não sobrevivendo no solo (BALDANI et al., 1997). A sua colonização ocorre nos espaços intercelulares da raiz e adjacentes aos vasos xilemáticos do colmo, sendo encontrada também em folhas (DONG et al. 1997). O mecanismo sugerido para a entrada e permanência desta bactéria em plantas de cana-de-açúcar é por meio de junções de raízes laterais do apoplasto radicular com células da ponta da raiz (JAMES et al., 1994).

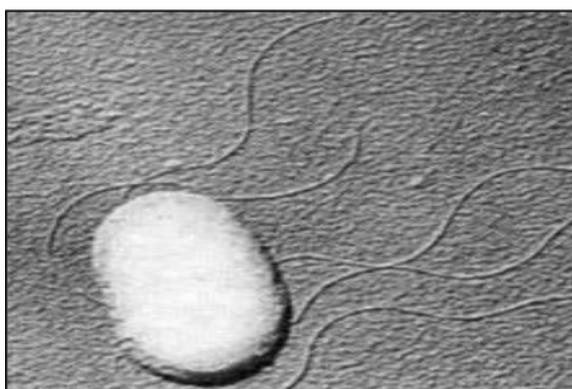


Figura 2. Fotomicrografia de *G. diazotrophicus* com flagelos laterais, por MET. Disponível em <https://www.cnpab.embrapa.br/pesquisas/gp.html>

G. diazotrophicus fixa ativamente nitrogênio atmosférico, fornecendo grandes quantidades a seus hospedeiros. Além da FBN, os mecanismos responsáveis pela promoção de crescimento vegetal englobam outros processos como a produção de hormônios, a bactéria é capaz de produzir ácido 3-indol-acético (AIA) e giberelinas A1 e A2. É capaz também de sintetizar bacteriocinas, cuja atividade de lisossima inibe o crescimento de *Xanthomonas*

albilineas, patógeno da cana-de-açúcar e produz sideróforos dos tipos silicilato e catecolato (LOGESHWARAN et al., 2009). A bactéria também produz levansucrase (LsdA), que permite a bactéria usar sacarose como fonte de carbono, levando esse consumo a uma acumulação de ácidos glucônicos acarretando na acidificação do meio. O acúmulo de ácidos pode promover a solubilização de zinco, fosfato e outros compostos inorgânicos no solo, fazendo com que se tornem disponíveis à planta hospedeira (INTORNE et al., 2009).

G. diazotrophicus tem uma longa história de inter-relação bactéria-planta em uma simbiose capaz de fixar o nitrogênio atmosférico. Em campos de cana-de-açúcar fertilizados com baixo teor de nitrogênio, desempenha um papel significativo e sua ocorrência foi registrada na maioria dos países produtores de cana-de-açúcar (SARAVANAN et al., 2007).

2.4. *Paraburkholderia tropica*

Paraburkholderia tropica foi isolada a partir de cana-de-açúcar var. SP 711406 cultivadas na Usina Cruangi, localizada na cidade de Timbaúba, Pernambuco e pertenciam ao gênero *Burkholderia* (REIS et al., 2004). Em 2014 este gênero foi renomeado e dividido em dois grandes grupos onde foi separado o grupo das bactérias patogênicas das não-patogênicas (SAWANA et al. 2014, comb. nov.).

O gênero *Burkholderia* tem sua origem no antigo gênero *Pseudomonas* e, é encontrado em uma grande diversidade de ambientes, sendo considerado cosmopolita. É capaz de colonizar uma grande variedade de nichos ecológicos, incluindo aquáticos, edáficos, rizosféricos e ambientes clínicos, sugerindo uma grande capacidade de adaptação metabólica e fisiológica. A criação de um novo gênero contendo *Burkholderia* não patogênico pode ter impacto no uso dessas bactérias na agricultura e para fins ambientais (ESTRADA-DE LOS SANTOS et al., 2016). Recentemente, a proposta de dividir a espécie em dois novos gêneros, *Paraburkholderia* e *Caballeronia* foi taxonomicamente aceita (OREN e GARRITY, 2015; DOBRITSA e SAMADPOUR, 2016). Os novos gêneros incluem espécies ambientais, mas vale a pena mencionar que algumas são oportunistas. Esta divisão foi baseada em critérios moleculares de análise de seus genomas e não na sua condição de patogenicidade (COENYE e VANDAMME, 2003; GYANESHWAR et al., 2011, VIAL et al., 2011; SUAREZ-MORENO et al., 2012; ZULETA et al., 2014). Com isso, algumas ainda permaneceram no gênero *Burkholderia* mesmo sendo descritas a partir de amostras ambientais como *B. ferrariae* e *B. insulsa* (VALVERDE et al., 2006, RUSCH et al., 2015), indicando uma compreensão crescente da diversidade desse gênero, se destacando como promissores para a aplicação biotecnológica. No entanto, a grande maioria dos estudos realizados até agora são de espécies clínicas, com menos informação sobre estirpes ambientais não patogênicas.

Conforme a descrição morfológica de *Paraburkholderia tropica*, as células possuem hastes ligeiramente curvadas, com aproximadamente 1.5 – 1.6 μm de comprimento e 0.7 - 0.8 μm de largura. Elas ocorrem isoladamente e possuem uma cápsula. São móveis por meio de um a quatro flagelos polares. Os isolados são Gram negativos e oxidase e catalase positivos. No meio sólido LGI-P, são formadas pequenas colônias com um centro amarelo e margens brancas. O crescimento e a redução de acetileno em etileno são observados em meios semi-sólidos isentos de nitrogênio. As estirpes têm um metabolismo aeróbico mas fixam o nitrogênio em condições de microaerofilia. Crescem bem com o amônio, e o nitrato é reduzido ao nitrito, mas o nitrito não é mais reduzido. Nitrato e amônio inibem a fixação de N_2 , mas pequenas quantidades de extrato de levedura (100 mg L^{-1}) aumentam a fixação de N_2 . Suportam o crescimento em várias fontes de carbono, incluindo açúcares e ácidos orgânicos. O crescimento ocorre de 22 a 40 °C e a temperatura ótima é de 30 °C. Não se observa hidrólise de amido ou gelatina (REIS et al., 2004).

Uma relação de estirpes desta espécie tem sido testada em diferentes culturas, alguns resultados obtidos em experimentos de casa de vegetação sugerem que a inoculação de tomate com *Paraburkholderia tropica* foi capaz de promover um aumento de 15% na produção dos frutos quando comparado com controle não inoculado (BERNABEU et al., 2015). Em trabalho buscando a compreensão dos mecanismos de promoção de crescimento, Bernabeu e outras autoras (2016) observaram em testes in vitro que a regulação da solubilização de fosfato mineral em *Paraburkholderia tropica* se deu em condições ambientais com baixa disponibilidade de fósforo e nitrogênio, e esta condição levou a uma oxidação ativa da glicose em ambiente extracelular. Sugerindo, deste modo, que a solubilização de fosfato mineral em *P. tropica* envolve uma glicose desidrogenase induzida por pirroloquinolina quinona. Estes estudos contribuem para reforçar o potencial efeito promotor de crescimento vegetal que estas estirpes possuem, sendo a adoção do uso de inoculantes uma promissora tecnologia para reduzir a dependência de fertilizantes minerais.

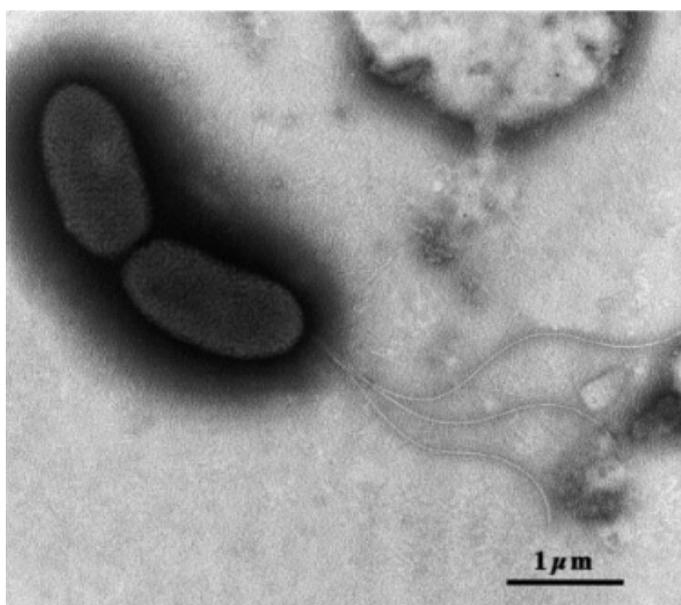


Figura 3. Fotomicrografia de uma célula de *B. tropica* sp. por MET, mostrando três flagelos polares. Coloração negativa (silicotungstato de sódio aquoso 1% por 30 s). (Modificado de REIS et al., 2004).

Apesar da atenção dada às espécies com potencial uso na promoção de crescimento de vegetais nos últimos anos, poucas são as informações sobre bioprocessos de produção de células em escala industrial para espécies não-leguminosas, sendo essas informações relevantes para que o potencial uso seja convertido em tecnologia e os seus efeitos alcançados no campo junto às culturas agrícolas.

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 a produção de inoculantes para as gramíneas. As espécies *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Paraburkholderia tropica* compõem o inoculante misto proposto para a cana-de-açúcar, mas poucas são as informações que possibilitem cultivos em escala industrial das estirpes recomendadas. Com isso, estudos que estabeleçam as condições otimizadas para o cultivo destas bactérias visando produção de inoculantes em escala industrial com menores gastos e maior produtividade são relevantes, de modo a garantir que o potencial destas estirpes como promotoras de crescimento seja convertido em um produto biotecnológico e, chegue ao produtor com sua eficiência garantida.

2.5. Inoculantes e Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal (BPCV)

O uso de inoculantes microbianos emergiu como uma alternativa biotecnológica alinhada com os princípios da agricultura sustentável, contribuindo para aumentar a eficiência agrônômica, reduzindo os custos de produção e a poluição ambiental, uma vez que o uso de fertilizantes nitrogenados pode ser reduzido ou eliminado se os inoculantes forem eficientes.

Os inoculantes são definidos como formulações ou produtos, contendo uma ou mais estirpes microbianas benéficas. Os microrganismos previamente selecionados e cultivados sob rigorosos bioprocessos são colocados em veículos imobilizadores, orgânicos ou sintéticos, sólidos ou líquidos para serem então disponibilizados para as plantas. No Brasil, este produto é elaborado a partir de estirpes selecionadas e registradas pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento MAPA. Conforme dados da Associação Brasileira de Produtores e Importadores de Inoculantes ANPII, o Brasil produz anualmente mais de 50 milhões de doses de inoculantes, com um expressivo crescimento nos últimos anos (Tabela 1).

Tabela 1. Quantidade de doses de inoculantes comercializadas no período de 2011 a 2016 no Brasil, por tipo de veículo imobilizador (turfoso ou líquido) para as culturas. (Dados modificados de ARAÚJO & CASTRO, 2017).

Cultura/tipo de inoculante	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Soja turfoso	3.414.482	5.329.414	7.796.974	8.543.436	10.150.917	11.064.168
Soja líquido	12.076.740	13.845.110	19.671.508	25.654.185	30.905.942	34.737.612
Feijão turfoso	208.612	269.248	461.378	314.840	311.490	260.507
Feijão líquido	12.060	1.200	16.470	24.500	92.330	117.056
Caupi	-	180.914	239.260	46.524	96.259	67.624
Gramíneas	-	2.537.192	2.106.116	2.229.048	2.849.780	4.532.317
Outros	150.582	38.035	42.672	25.938	24.839	65.436
Total	15.962.476	22.201.113	30.334.378	36.838.471	44.431.557	50.844.720

Os inoculantes são formulações contendo alta densidade de células bacterianas selecionadas para determinada cultura de interesse agrícola. Podem ser comercializados com a finalidade de aplicação em sementes, no sulco de plantio e ainda com aplicação foliar. São comercializados em veículos imobilizadores na forma líquida ou sólida. Um veículo imobilizador ideal deve atender as seguintes características, não toxicidade as estirpes, boa capacidade de adesão, alta capacidade de tamponamento do pH e capacidade de troca catiônica (HERRIDGE, 2002).

O inculante turfoso foi por muitos anos o mais utilizado, a turfa tem propriedades que conferem a formulação maior capacidade de retenção de umidade, capacidade de promover o crescimento e proteger as bactérias, quando inoculado. A turfa é uma substância fóssil, orgânica e mineral, originada da decomposição de restos vegetais, encontrada em áreas com solos hidromórficos e regiões com clima temperado (as maiores reservas encontram-se no Canadá). Essa substância é moída em moinhos de bolas até chegar a granulometria de pó fino.

Por ser um recurso natural não renovável, há alguns inconvenientes associados ao uso da turfa como reservas finitas e de difícil acesso, dificuldade para padronização de pH e esterilização e dificuldades para aplicação em grande escala no campo (ALVAREZ et al., 2010).

Atualmente as empresas costumam utilizar, preferencialmente, formulações líquidas (Tabela 1), que consistem em caldos ou meios líquidos contendo altas densidades celulares. São utilizados aditivos nas formulações líquidas, sendo os mais utilizados: o glicerol,

polivinilpirrolidona ou goma arábica, carboximetilcelulose, goma xantana, entre outros polímeros. Esses aditivos desempenha a função de promover melhor aderência do produto, estabilizar o produto, inativar toxinas solúveis, aumentar a sobrevivência das estirpes durante o armazenamento e após a exposição a condições ambientais. Adicionalmente, as formulações líquidas são de fácil utilização no campo e com isso tem apresentado bons resultados, são também de fácil comercialização em volumes concentrados e utilizam materiais de baixo custo (ALVARES et al., 2010).

O sucesso do inoculante bacteriano relaciona-se com os processos que podem influenciar a eficiência da inoculação, como por exemplo a exsudação de substâncias sinalizadoras pelas raízes das plantas e a facilidade da colonização bacteriana das raízes. As interações entre plantas e bactérias ocorrem através de processos simbióticos, endofíticos ou associativos com distintos graus de proximidade com as raízes e o solo circundante. Com isso, BPCV endofíticos são bons candidatos a inoculantes, porque colonizam as raízes e criam um ambiente que favorece a interação planta-microrganismo (BASHAM, 1998).

Para que as estirpes com potenciais efeito promotor de crescimento vegetal sejam transformadas em inoculante deve-se projetar uma formulação específica considerando a cultura-alvo, estabelecer um método de aplicação prática, observando além dos parâmetros técnicos do produto, as limitações em relação a logística e também facilidade de uso pelos produtores. O registro de novas estirpes, recomendação de estirpes específicas para cada tipo de inoculante, a sua produção e o controle de qualidade segue a Instrução Normativa n° 6, de 10 de março de 2016 (que alterou a Instrução Normativa n° 53 de 2013) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento MAPA, que orienta através de protocolos oficiais como proceder na avaliação da viabilidade e eficiência agrônômica de estirpes, produtos e tecnologias relacionada às bactérias associativas.

De modo geral, para desenvolver um inoculante para plantas com BPCV é necessário selecionar a melhor linhagem de bactérias ou um consórcio microbiano que apresente o efeito pretendido na cultura-alvo (essa etapa acontece em instituições de pesquisa). O próximo passo é projetar uma formulação específica de inoculante para a cultura-alvo, estabelecendo a concentração de inóculo ideal e a capacidade que o inóculo tem de sobreviver no veículo e na superfície em que foi inoculado, além de estabelecer a tolerância aos agrotóxicos comumente utilizados nas lavouras e um método de aplicação prática, considerando as limitações dos produtores (etapa muitas vezes desenvolvida através de parcerias entre instituições de pesquisas e biofábricas). Em termos práticos, a formulação escolhida e o método de aplicação determinam o potencial sucesso na fabricação e posterior uso do inoculante. A formulação do inoculante deve atender ainda aos seguintes requisitos: manter estabilidade genética, produzir efeito sobre a cultura agrícola, competir com populações microbianas nativas do solo, migrar do substrato do inoculante para a planta hospedeira e persistir em ambientes adversos do solo na ausência do hospedeiro, adicionalmente, a eficiência da colonização por BPCV e subsequente ação depende de características química, física e biológicas do ambiente agrícola no momento de sua aplicação (BASHAN et al., 2014).

A literatura científica está repleta de estirpes potencialmente úteis que não estão registradas e com isso estão indisponíveis para a comercialização, isto ocorre, provavelmente, porque não é dada a sequencia na pesquisa até o desenvolvimento da tecnologia, registrando-se junto ao órgão responsável as estirpes e os processos de desenvolvimento das formulações. Este é o caso do inoculante misto proposto há dez anos para a cultura da cana-de-açúcar e, para reverter esta situação, pesquisas recentes têm buscado desenvolver bioprocessos e formulações no sentido de viabilizar a produção e comercialização deste inoculante (OLIVEIRA et al., 2006).

2.6. Bioprocessos

Denomina-se bioprocesso os processos que englobam operações de tratamento da matéria-prima e resíduo, preparo de meios de cultura, esterilização do meio de cultura e transformação do substrato em produto. Os bioprocessos que são conduzidos utilizando micro-organismos para a conversão do substrato em biomassa ou metabólicos, são tradicionalmente conhecidos como processos fermentativos, sendo este processo uma importante fonte de produtos de natureza biológica para a indústria farmacêutica, química, alimentícia, agrícola e energética (PEREIRA et al., 2008).

De modo geral, as etapas em escala industrial de um bioprocesso (Figura 4) podem ser divididas em cinco etapas: 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 e tratamento de resíduos e efluentes (PEREIRA et al., 2008).

Em um bioprocesso existem dois sistemas que interagem: a fase biológica composta pela população microbiana ou culturas e a fase ambiental que contém os substratos e produtos de processo, chamada de meio de cultura. Para a realização de um bioprocesso, devem-se atender quatro pontos básicos: o microrganismo, o meio de cultura, a forma de condução do processo e as etapas de recuperação do produto. A composição do meio de cultura para fim industrial deve, além de atender as necessidades nutricionais do microrganismo, ser determinado de acordo com o fator econômico, pois alguns meios são muito complexos e acabam por onerar o processo tornando-o inviável (SCHMIDELL et al., 2001). O meio de cultivo é um dos principais determinantes do custo de produção, estudos tem sido desenvolvido sobre as condições de bioprocessos das cinco estirpes da cana-de-açúcar, em escala de bancada. Alguns resultados permitiram reduções acima de 65% nos tempos de cultivo com simplificação de meio de cultura, aumentos exponenciais na concentração celular e aumento nos fatores de conversão de nutrientes em biomassa (SOARES et al., 2012).

O bioprocesso é conduzido em biorreatores de diferentes escalas, além disso os bioprocessos podem ser contínuos, semicontínuos, descontínuos (batelada). Em indústrias de inoculantes, os biorreatores são conduzidos por cultivo descontínuo. Esta condução consiste em duas fases: a de esterilização e a de inoculação (SOUSA, 2011). Enquanto que em laboratórios de pesquisas, o bioprocessos para obtenção de células é realizado em recipiente de pequena dimensão, como Erlenmeyers, com volumes variando entre 125 mL e 2 L ou em biorreatores de bancada, que apresentam volumes que variam de 2 L a 7 L. Os cultivos realizados sob bioprocessos descontínuos são considerados como sendo um sistema fechado, dependendo do bioproduto e se deseja obter haverá a adição de ácidos e bases para a manutenção do pH em determinada faixa. Nesse processo acompanha-se as fases de crescimento do inóculo. Todo o substrato é fornecido no início do processo (PEREIRA, 2008).

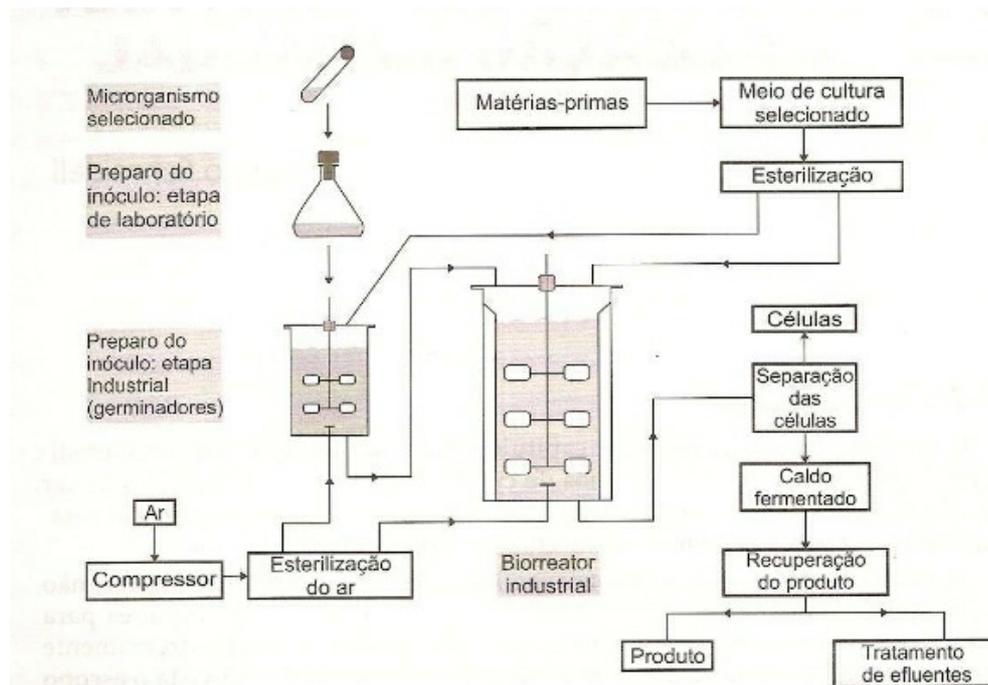


Figura 4. Esquema geral de um bioprocesso (SCHMIDELL et al., 2001).

A disponibilização de novos insumos biológicos em ampla escala para a agricultura, como os inoculantes, deve ser vista além do processo de escolha dos micro-organismos adequados. A eficiência e a produtividade dos bioprocessos são componentes importantes para viabilizar um produto, e relacionam-se diretamente com os processos de conversão e o estabelecimento das condições operacionais ideais dos sistemas de cultivo, condicionamento e estabilização biológica (SOARES et al., 2012). Além disso, para um eficiente desenvolvimento de um bioprocessos do ponto de vista da produção, quanto aos custos, é o meio de cultivo a ser empregado, ponto observado ainda na escala de bancada. A elaboração do meio de cultivo exige que sua composição atenda às necessidades nutricionais do microrganismo e que seja economicamente viável. Para isso, é necessário a adição de fontes de carbono, nitrogênio, vitaminas, entre outros componentes, agitação e aeração e dependendo do processo, controle do pH.

Entre os processos industriais, envolvendo o cultivo de células microbianas, sem dúvida os processos conduzidos em aerobiose encontram uma situação de enorme destaque. Em condições de aerobiose são produzidos, por exemplo, antibióticos, enzimas, vitaminas, inoculantes e proteínas recombinantes (hormônios de crescimento, insulina; etc.) (SCHMIDELL, 2001).

Na cadeia respiratória, o oxigênio (O_2) é o aceptor final de elétrons e 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, percebe-se a importância da aeração em bioprocessos. Geralmente, o fornecimento de oxigênio ao meio é fator limitante decisivo, devido à sua baixa solubilidade em água (PRADELLA et al., 2001). 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 $35 \text{ }^\circ\text{C}$ (SCHMIDELL, 2001). Além disso, esse elemento precisa vencer várias

barreiras para sair da bolha de ar, atravessar o meio de cultura e ser assimilado pelo microrganismo. Toda essa resistência, influencia a taxa de crescimento celular, pois relaciona-se diretamente na velocidade de chegada do O₂ até a célula. Parece óbvio imaginar que, então, basta fornecer a maior quantidade de ar possível durante o processo. Porém, grandes quantidades de ar, dependendo do organismo, pode perturbar as células e promover o efeito contrário (PEREIRA, 2008).

A mistura do caldo de cultivo 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 (OLDSHUE, 1997). Logo, para fornecer condições ideais de crescimento, os parâmetros que influenciam o crescimento dos microrganismos devem ser avaliados integralmente. A transferência de oxigênio para as células depende de vários fatores, sendo que a aeração e agitação são críticos dentro do processo.

Os efeitos benéficos do aumento da agitação estão relacionados ao aumento da transferência de nutrientes e oxigênio do meio para microrganismo (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. Em estudo que avaliou a influência da agitação, ao submeter o bioprocessos a alta velocidade de agitação (800 rpm) foi observada pouco crescimento celular e baixa produção de xantana, provavelmente, causados por danos celulares devido ao estresse hidrodinâmico (CASAS et al., 2000). Além da não adequação dos microrganismos, algumas pás de agitação, em altas rotações, podem causar cisalhamento significativo das células, diminuindo também a obtenção de biomassa.

Estudos são realizados para a otimização de meios de cultura com o objetivo de propor combinações dos componentes e suas quantidades que garantam uma melhor relação custo/benefício para o processo, ou seja, maior produção com um menor custo. Em estudo de otimização dos parâmetros de produção de biomassa de *Azospirillum amazonense* (BR11145) (hoje denominada de *Nitrospirillum amazonense*) para incorporação em inoculantes agrícolas, Fernandes (2013) propôs a simplificação do meio Dygs, alcançando uma redução do número de componentes de 7 para apenas 4 componentes nutricionais. Nesse estudo foi possível reduzir em 66,4% os custos da matéria prima, além de aumentar, aproximadamente, em 70% a capacidade de produção de biomassa celular.

A técnica de cultivo simultâneo ou cultura mista 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 microrganismos buscam obter metabólitos secundários que, geralmente, só são expressos nessas condições ou apresentam produção acentuada. Conforme anteriormente descrito, o inoculante formulado para a cultura da cana-de-açúcar pela Embrapa conta com cinco espécies de bactérias diazotróficas. 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 simultâneo dessas estirpes resultaria em grande avanço para a produção do inoculante.

2.7. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real – qPCR

A PCR (Polymerase Chain Reaction ou Reação em cadeia da Polimerase) é uma técnica pela qual moléculas de ácidos nucleicos específicos são amplificadas milhões de vezes de uma forma bastante rápida, onde utilizam-se dois oligonucleotídeos sintéticos denominados *primers* ou iniciadores, que são complementares a duas regiões específicas do DNA alvo a ser amplificado. Esta técnica 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 à 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).

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. A qPCR possui as mesmas etapas de uma PCR convencional, e difere apenas porque 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 (KRALIK & RICCHI, 2017).

As fases de cada reação por ambos os métodos, 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 onde a não há 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* (PELT-VERKUIL et al., 2008), limite mínimo de detecção de fluorescência (ruído de fundo).

A qPCR tem sido amplamente utilizada em estudos recentes de ecologia microbiana ambiental como uma ferramenta para detectar e quantificar microrganismos (KIM et al., 2013). Para este estudo, com microrganismos cultivados simultaneamente, adotou-se a quantificação absoluta, através da 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 conhecidas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Localização

Os parâmetros de crescimento e as condições de cultivo simultâneo das bactérias *Paraburkholderia tropica* BR11366 e *Gluconacetobacter diazotrophicus* BR11281 foram obtidos através da condução de uma série de experimentos de cultivo em meio líquido em agitador orbital e biorreator de bancada. Todos os experimentos foram realizados na Embrapa Agrobiologia, localizada em Seropédica – RJ, no Laboratório de Bioprocessos, sob a supervisão e co-orientação do pesquisador responsável Dr. Luis Henrique de Barros Soares.

3.2. Material Biológico

As bactérias *Paraburkholderia tropica* BR11366^T e *Gluconacetobacter diazotrophicus* BR11281^T foram fornecidas pela Coleção de Culturas de Bactérias Diazotróficas e Outros Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Agrobiologia (CCBD).

3.3 Meio de Cultura

Para o cultivo das bactérias se utilizou como base o meio Dextrose Yeast Glucose Sucrose – DYGS (BALDANI et al., 2014) (componentes descritos no anexo I), modificado pelo uso de uma fonte de carbono, a sacarose (10 g L⁻¹), extrato de levedura (3,5 g L⁻¹), K₂HPO₄ (0,5 g L⁻¹), MgSO₄.7H₂O (0,5 g L⁻¹) e pH ajustado para 6,0, aqui nomeado para facilitar o entendimento de meio modificado com sacarose MMS. O meio DYGS é considerado um meio de cultivo rico e que proporciona rápido crescimento bacteriano. A modificação do meio foi proposta e testada para o cultivo de *Herbaspirillum seropedicae* BR11417 por Scheidt (2015).

3.4. Estoque de Bactérias

Os isolados fornecidos pela coleção de cultura foram semeados em placas com o meio de cultura sólido JMV e LGI-P (componentes descritos no anexo I) para as estirpes BR11366^T e BR11281^T respectivamente, a fim de garantir a pureza da cultura selecionada, sob temperatura de 30 °C por 48 h. Após o crescimento da cultura, selecionou-se uma colônia, sendo esta inoculada em tubo de ensaio com 5 mL do meio líquido DYGS. Após o período de crescimento, a solução foi transferida para um Erlenmeyer de 500 mL contendo 50 mL do mesmo meio. Ambas as etapas ocorreram em agitador orbital por 24 h com temperatura de 30 °C e agitação de 150 rpm. Em seguida padronizou-se a densidade do cultivo para densidade óptica a 600 nm (D.O._{600 nm}) de 2,0 e adicionou-se 20% de glicerol ao caldo do cultivo, coletando-se alíquotas de 1,0 mL do caldo que foram transferidas para microtubos Eppendorf de 1,5 mL para serem utilizados como estoque de curto período. Os microtubos foram mantidos em geladeira por 30 min e, posteriormente, armazenados em freezer a -20 °C.

3.5. Teste de Antibiose

Seguiu-se a metodologia de antibiose por difusão em dupla camada descrita por Kékessy e Piguet (1970). Uma colônia característica da estirpe BR11281 foi inoculada em 5 mL de meio líquido DYGS e incubada a 30°C sob agitação de 150 rpm por 48 h. Após o crescimento, a cultura foi ajustada para uma D.O._{600nm} de 0,6, utilizando um espectrofotômetro. Após esse período, uma alíquota de 100 µL da suspensão celular foi inoculada em uma placa contendo o meio sólido DYGS e incubadas por 24 h. O mesmo procedimento foi realizado para a estirpe BR11366, sendo que esta foi incubada em tubo por 24 h. Todos os testes foram realizados em triplicata.

3.6. Pré-Inóculo

Para o preparo do pré-inóculo foi adicionando 0,5 mL de solução estoque de bactéria a um tubo de ensaio contendo 5 mL de meio MMS e posteriormente este foi incubado em agitador orbital e o crescimento inicial foi feito nas temperaturas de 30, 32 e 35 °C, a 150 rpm por 24 h.

3.7. Curvas de Crescimento

3.7.1. Curvas em agitador orbital

a) Cultivos individuais

O pré-inóculo obtido das duas estirpes foi transferido para Erlenmeyer de 500 mL contendo 50 mL de meio MMS e incubado em agitador orbital nas temperaturas citadas anteriormente em 150 rpm por 18 h. Decorrido este tempo, transferiu-se 25 mL de cultivo para Erlenmeyer de 1000 mL contendo 250 mL de meio MMS, o qual foi incubado em agitador orbital sob temperatura de estudo a 150 rpm. Nesta etapa, houve a avaliação da densidade óptica (DO) do cultivo no espectrofotômetro, em comprimento de onda de 600 nm (DO₆₀₀) e intervalos regulares de 2 horas, para a elaboração da curva de crescimento das estirpes relacionando tempo de crescimento e DO₆₀₀.

b) Cultivos Simultâneos

Para este ensaio, foi preparado um pré-inóculo adicionando 0,5 mL da solução estoque de cada estirpe em tubo de ensaio contendo 5 mL de meio MMS. O tubo foi incubado em agitador orbital sob as temperaturas de estudo citadas anteriormente, a 150 rpm, por 24 h. Assim como nos ensaios individuais, o conteúdo do tubo foi vertido em um Erlenmeyer de 500 mL contendo 50 mL de meio MMS, o qual foi incubado em agitador orbital sob as temperaturas de estudo, a 150 rpm, por 24 h para a estirpe BR11281 e 12 h para a estirpe BR11366 (Tendo em vista o tempo de geração de cada estirpe). Decorrido o tempo de incubação, os conteúdos dos Erlenmeyers foram misturados e desta mistura foram transferidos 25 mL de cultivo para Erlenmeyer de 1000 mL contendo 250 mL de meio MMS. Este último Erlenmeyer foi incubado em agitador orbital sob temperaturas de estudo, a 150 rpm e em intervalos regulares de 2 h foram realizadas as leituras da DO₆₀₀ no espectrofotômetro em comprimento de onda de 600 nm para a construção da curva de crescimento relacionando tempo e DO₆₀₀. Concomitante a estas leituras, amostras de 1,0 mL do cultivo simultâneo foram acondicionadas em microtubos e centrifugadas por 5 min a

15.000 rpm e armazenadas em freezer a -20 °C para posterior lise celular e quantificação em números de cópias de DNA de cada estirpe por meio da técnica de PCR em tempo real.

c) Curvas de crescimento em Biorreator

Para esta etapa, utilizou-se 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), de vazão de ar ($L\ min^{-1}$), temperatura (°C) e oxigênio dissolvido (% pO_2). Todas as etapas dos cultivos em biorreator de bancada foram realizadas com o meio MMS.

d) Cultivos individuais

Após o pré-cultivo e etapa de crescimento no Erlenmeyer, todo o seu conteúdo foi vertido no biorreator contendo 2,0 L de meio previamente esterilizado em autoclave por 40 min. Amostras foram retiradas para leitura da DO_{600} em intervalos de 2 h. Amostras de 1,0 mL foram acondicionadas em microtubos e centrifugadas por 5 min a 15.000 rpm e armazenadas em freezer a -20 °C para posterior análise dos ácidos orgânicos produzidos.

e) Cultivos simultâneos

O pré cultivo e a etapa de Erlenmeyers feita conforme descrita anteriormente. O conteúdo dos dois crescimentos foi misturado e desta mistura 100 mL 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 DO_{600} . Foram armazenadas amostras de 1,0 mL para posterior análise dos ácidos orgânicos produzidos e lise celular. As alíquotas foram centrifugadas por 5 min a 15.000 rpm e armazenadas em freezer a -20 °C.

3.8. Preparo do Inoculante

Para a produção do inoculante realizou-se o cultivo das estirpes em Erlenmeyer com o meio de cultivo MMS, incubação em agitador orbital com rotação a 150 rpm e temperatura de 32 °C, conforme as etapas descritas nos itens anteriores. Realizou-se cultivos individuais e cultivos simultâneos para constituir os seguintes tratamentos: a) inoculante sólido (turfa) produzido com as estirpes cultivadas individualmente, sendo estas misturadas no momento da transferência para o veículo imobilizador; b) inoculante com veículo à base de composição polimérica produzido com as estirpes cultivadas individualmente, sendo estas misturadas no momento da transferência para o veículo imobilizador; c) inoculante sólido (turfa) produzido com as estirpes cultivadas simultaneamente; e d) inoculante com veículo à base de composição polimérica produzido com as estirpes cultivadas simultaneamente.

As estirpes foram incubadas por tempo suficiente até chegar ao fim da fase exponencial, momento ideal para coletar as alíquotas e transferi-las para o veículo imobilizador, de modo a garantir o máximo de células viáveis. Após cultivar a BR11281 e BR11366 individualmente, os caldos dos cultivos foram misturados e desta mistura coletou-se alíquotas de 20 mL, que foram transferidas para a embalagens com 30 g de turfa previamente esterilizada, e 25 mL que foram transferidas para embalagens com 25 mL com veículo à base de composição polimérica previamente esterilizado. O mesmo procedimento foi adotado para a produção dos inoculantes a partir dos cultivos simultâneos. Após a transferência das alíquotas, as embalagens foram homogeneizadas.

A contagem das células viáveis no inoculante foi realizada 24 h após o seu preparo. A contagem foi realizada conforme a Instrução Normativa nº 30 de 12 de novembro de 2010 (MAPA) que estabelece os métodos oficiais para análise de inoculantes, sua contagem, identificação e análise de pureza. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Para os inoculantes sólidos pesou-se na capela de fluxo laminar 10,0 g do inoculante, sendo esta quantidade transferida para um Erlenmeyer de 250 mL, previamente esterilizado, além da amostra do inoculante, foi adicionado ao Erlenmeyer 90,0 mL de solução de NaCl (8,5 g L⁻¹) e mantido em agitador orbital por um período de 20 min, formando assim a diluição 10⁻¹. Para os inoculantes com veículo à base de composição polimérica, a embalagem foi homogeneizada vigorosamente e coletada asépticamente, uma alíquota de 1,0 mL. A diluição seriada (10⁻¹ até 10⁻⁷) das amostras foi realizada em solução salina (8,5 g L⁻¹ de NaCl). As diluições 10⁻⁵, 10⁻⁶ e 10⁻⁷ foram utilizadas para o espalhamento e contagem em placas de Petri com meio sólido LGI-P (componentes descritos no anexo I), alíquotas de 0,1 mL das diluições sucessivas foram inoculadas na superfície dos meios de cultura nas placas de Petri e em sequência essas alíquotas foram uniformemente distribuídas na superfície do meio, usando-se para isso a alça de Drigalski, fazendo para cada diluição três repetições das análises. As placas foram incubadas em estufa tipo BOD a 30 °C e, após cinco dias realizou-se a contagem das placas que apresentavam de 30 a 300 colônias.

3.9. Métodos Analíticos

3.9.1. Tempo de geração e taxa específica de crescimento

Admitindo-se que a curva de crescimento está sob um processo de cultivo em batelada e que na fase exponencial não havia limitação de substrato, o tempo de geração foi calculado com o intervalo de valores de biomassa g L⁻¹ e tempo de incubação no período em que as estirpes se encontravam em crescimento exponencial durante os cultivos individuais em agitador orbital a fim de se estabelecer qual a melhor temperatura de crescimento (SCHMIDELL et al., 2001). Para tanto utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\mu_{m\acute{a}x} = \frac{\ln X_f - \ln X_i}{t_f - t_i}$$

Onde:

$\mu_{m\acute{a}x}$ = taxa específica de crescimento máximo;
 X_i = biomassa de célula g L⁻¹ no início da fase exponencial;
 X_f = biomassa de célula g L⁻¹ no final da fase exponencial;
 t_i = tempo inicial da fase exponencial (h);
 t_f = tempo final da fase exponencial (h).

$$G = \frac{\ln 2}{\mu_{m\acute{a}x}}$$

Onde:

G = tempo de geração (h)

3.9.2. Concentração celular mássica

Determinou-se a concentração celular mássica por meio da técnica do peso seco, relacionando a densidade óptica (600 nm) com a concentração celular em (g L^{-1}).

A partir de um caldo de cultivo concentrado, que se trata de uma alíquota do cultivo de cada estirpe que foi dividida e diluída em água ultrapura nas proporções de 2/3, 1/2 e 1/3. O caldo de cultivo concentrado e as diluições foram homogeneizadas e sua absorvância mensurada. Posteriormente, uma alíquota de 10 mL do caldo de cultivo concentrado e de cada diluição foi filtrada em membrana Millipore 0,22 μm previamente pesada. As membranas juntamente com os filtrados foram incubadas em estufa a 65 °C por 12 horas. Após este período, foi acompanhado o peso do conjunto até que ficasse constante para, assim, efetuar os cálculos.

Com auxílio do software *Microsoft Office Excel* (2013) relacionou-se a densidade óptica (DO_{600}) com a respectiva concentração celular, então obteve-se uma regressão linear, a equação da reta e o R^2 . Por meio do coeficiente angular α , foi obtida a relação para o cálculo da concentração celular (X):

$$X = Abs * \alpha$$

3.9.3. Concentração dos compostos indólicos

Os compostos indólicos, foram quantificados por leitura da absorvância no espectrofotômetro em comprimento de onda (λ) de 530 nm utilizando espectrofotômetro Biochrom Anthos Zenyth 200st. Coletou-se de cada cultivo amostras com alíquotas de 150 μL que foram transferidas em triplicata para micro placas de 96 poços com capacidade de 300 μL por poço, em seguida adicionaram-se 100 μL do reagente de Salkowski, a micro placa foi armazenada e após 30 minutos de reação no escuro procedeu-se à leitura da absorvância no espectrofotômetro.

Para cada análise de AIA em amostras de cultivo, com intuito de reduzir erros, preparou-se uma curva de calibração nas concentrações de 0,0 mg L^{-1} , 5 mg L^{-1} , 10,0 mg L^{-1} , 15,0 mg L^{-1} , 20,0 mg L^{-1} e 40,0 mg L^{-1} na mesma placa em que se realizou as leituras das amostras de cultivo.

3.9.4. Identificação de ácidos orgânicos

Para a identificação dos compostos fez-se uso de um cromatógrafo Shimadzu (Shimadzu Corporation, Japão) composto pelos seguintes módulos: bomba (modelo LC-10AD), auto-injetor (modelo SIL - 10A), forno para coluna (modelo CTO-10AC) e detector UV-VIS (modelo SPD-10AV). A aquisição e o tratamento dos dados foram controlados pelo software LC Solution (Shimadzu, Japão). Foram programadas injeções de 20 μL de cada amostra. A condição cromatográfica empregada nestas análises foi: coluna Bio - Rad Aminex HPX-87H com pré-coluna e fase móvel consistindo de H_2SO_4 0,005 mol L^{-1} , fluxo de 0,6 mL min^{-1} e temperatura de 40 °C.

Para determinação do tempo de retenção de cada ácido orgânico analisado, foram injetados padrões dissolvidos em água Mili-Q (ultrapura) com concentração de 10 g L^{-1} . Os padrões utilizados foram: ácido oxálico, cítrico, succínico, glucônico, acético e fórmico (Sigma).

3.9.5. Análises Moleculares

Para a quantificação de células de cada estirpe em cultivo simultâneo, foram utilizadas as técnicas de lise celular e quantificação por PCR em tempo real com *primers* espécie-específicos que foram desenhados e as condições estabelecidos por Silva (2017).

3.9.6. Lise celular

Os peletes das amostras, obtidas através das curvas em cultivos simultâneos, foram resuspendidos em 1 mL de solução tampão para PCR (*buffer* dez vezes concentrado) diluída na proporção 1:10 em água ultrapura. Em seguida as amostras foram submetidas a pulsos de ondas de ultrassom por 3 ciclos de 25 minutos em frequência de 40 kHz, o equipamento utilizado para emitir os pulsos foi a lavadora ultrassônica Sanders Soniclean. Optou-se pelo método físico de lise celular, por este ser considerado conservativo, reduzindo as possíveis perdas inerentes ao método químico de lise e extração de DNA, evitando deste modo que os valores quantificados através da técnica de qPCR fossem subestimados.

3.9.7. PCR 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 triplicatas técnicas com volume total de 15 µL utilizando o kit GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, USA). Para o funcionamento do equipamento utilizou-se as seguintes condições: 95 °C por 2 min seguido por 40 ciclos envolvendo desnaturação a 95 °C por 20s, anelamento e aquisição de fluorescência a 60 °C por 45s para a estirpe BR 11366 e 63 °C por 45s para a estirpe BR 11281. Para a BR11366 cada reação foi composta por: 7,5 µL do kit, 0,3 µL do par de *primer* C14F2/C14R2 (sequencia 5'-3' GATGCCTTTGCTTCCGGTGC e CCGCTAGGGCTCCCTAATCC respectivamente e amplicon com 111 pb), 1,9 µL de H₂O para PCR e 5 µL de cada amostra a ser quantificada. Para BR11281 cada reação foi composta por: 7,5 µL do kit, 0,5 µL do par de *primer* C4525F2/C452R2 (sequencia 5'-3' GCCTTCCCCAAGGTCGCTA e TGGTCCCAGTCGAAACCGC respectivamente e amplicon com 143 pb), 1,5 µL de H₂O para PCR e 5 µL de cada amostra a ser quantificada (Silva, 2017).

Para análise dos resultados, elaborou-se uma curva padrão para cada estirpe por meio de diluição seriada de seu DNA, nas concentrações de 10² a 10⁻³ ng µL⁻¹. Essas amostras foram submetidas, em triplicata técnica, à qPCR e, ao final da reação, relacionou-se o log₁₀ 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 (expressa em números de cópias de DNA) das qPCR's a partir de amostras dos cultivos simultâneos.

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

Onde:

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

6,0221*10²³ = constante de Avogadro;

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

660 = massa média de 1 pb dsDNA;
1,0*10⁹ = 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: coeficiente angular da curva padrão.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Teste de Antibiose

Observou-se que as estirpes em estudo não produzem substâncias antagônicas. Sugerindo deste modo que essas duas estirpes podem ser utilizadas para desenvolver um sistema de cultivo simultâneo para a produção de inoculantes. Resultados parecidos foram obtidos em metodologia semelhante por Drechsel, (2011) em estudos para a avaliação da interação entre as bactérias que compõem o inoculante misto proposto para a cana-de-açúcar. Os estudos a respeito da interação entre as estirpes que compõem o inoculante misto são fundamentais para viabilizar a sua produção em escala industrial, refletindo, deste modo, na exploração do potencial biotecnológico dessas bactérias no aumento da produtividade de cana-de-açúcar e demais gramíneas.

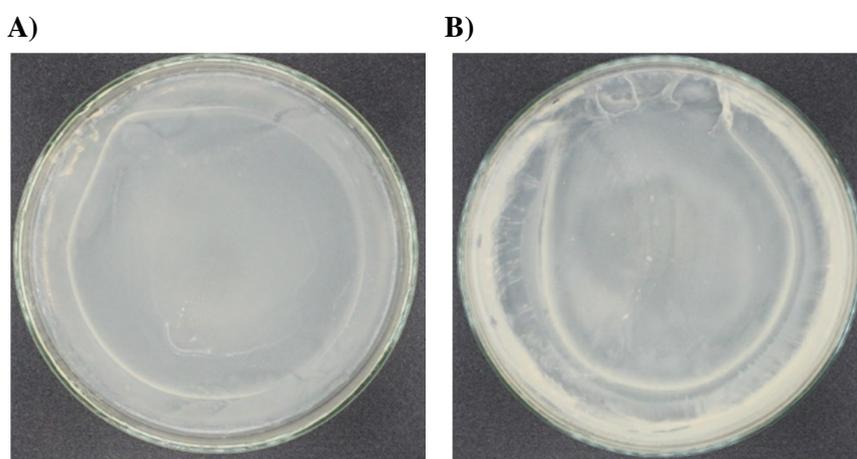


Figura 5. A) Crescimento da estirpe BR11281 em presença da estirpe BR11366; B) Crescimento da estirpe BR11366 em presença da BR11281.

4.2. Curvas de Crescimento em Agitador Orbital

A estirpe BR11366 tem melhor desempenho em produção de biomassa a 32 e 35 °C, chegando a 2,38 g L⁻¹ de biomassa em 16 h quando incubada a 35 °C (Figura 6 B). Enquanto que a estirpe BR11281 teve melhor desempenho em produção de biomassa a 32 °C, chegando a uma produção máxima de 2,14 g L⁻¹ em 29 h e o pior desempenho registrado a 35 °C (Figura 6 A). Conforme estudos de descrição, a espécie cresce bem a 30 °C (Cavalcante & Dobereiner, 1988), outros estudos relataram que a espécie apresenta boa adaptação a temperaturas elevadas (TEJERA et al., 2005), porém neste estudo observou-se que a estirpe tem menor desempenho em temperaturas acima de 35 °C no meio MMS quando comparado aos resultados de crescimento em 30 °C e 32 °C.

Os valores máximos de biomassas obtidos em cultivos individuais foram muito próximos para as duas estirpes nas temperaturas de 32 °C e 35 °C, houve variação no tempo da fase exponencial e no tempo de crescimento total de cada estirpe. A BR11281 tem maior velocidade específica de crescimento máximo ($\mu_{\text{máx}} = 0,7768 \text{ h}^{-1}$) a 32 °C enquanto que a BR11366 o maior valor de $\mu_{\text{máx}} = 0,8716 \text{ h}^{-1}$ ocorre a 35 °C, a BR11366 tem maior eficiência de crescimento a 32 e 35 °C, com tempo de geração menor que a BR11281 (Tabela 2).

Em estudo de otimização de parâmetros para a produção de biopolímero com *Burkholderia sacchari* verificou-se que a temperatura não influenciou as taxas de $\mu_{\text{máx}}$, que permaneceram em torno de $0,54 \text{ h}^{-1}$ em cultivos que tiveram como fonte de carbono glicose e sacarose, porém demonstrou que a temperatura é importante para otimizar a produção de biopolímero (NASCIMENTO et al., 2016). A *Paraburkholderia tropica* apresentou taxa de $\mu_{\text{máx}}$ em torno de $0,85 \text{ h}^{-1}$ em temperaturas de 32 e 35 °C, sendo que em 30 °C a taxa de $\mu_{\text{máx}}$ caiu pela metade (Tabela 1).

O cultivo simultâneo apresentou uma fase exponencial curta sendo a máxima produção de biomassa de $2,2 \text{ g L}^{-1}$ alcançada a 32 °C com 12 h de incubação. A fase estacionária se prolongou por 8 h. Observa-se comportamento semelhante em todas as temperaturas testadas neste estudo (Figura 6 C).

O final da fase exponencial e/ou momento de máximo crescimento é o ideal para retirar alíquotas dos cultivos e produzir o inoculante de modo a garantir o máximo de células viáveis no produto, porque as estirpes estão expressando todo o seu potencial produtivo, supostamente sem limitações físicas ou químicas no meio.

Observando que nos cultivos individuais realizados em agitador orbital a BR11366 teve menor taxa de $\mu_{\text{máx}}$ a temperatura de 30 °C e a BR11281 apresentou menor $\mu_{\text{máx}}$ a 35 °C, e que a diferença entre as taxas de $\mu_{\text{máx}}$ em 32 °C e 35 °C para a BR11366 não foram significativas, se estabeleceu que a temperatura de 32 °C como a ideal para realizar o cultivo simultâneo com as estirpes (Tabela 2). Com isso, a temperatura de 32 °C foi selecionada para a realização dos ensaios de crescimento em biorreator de bancada.

Tabela 2. Parâmetros de crescimento: velocidade máxima específica de crescimento $\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1}), tempo de geração G (h) e produção máxima de biomassa $X_{\text{máx}}$ (g L^{-1}) das estirpes BR11281 e BR11366 incubadas em agitador orbital sob rotação de 150 rpm e temperaturas de 30, 32 e 35 °C.

Estirpe	30 °C			32 °C			35 °C		
	$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	G (h)	$X_{\text{máx}}$ (g L^{-1})	$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	G (h)	$X_{\text{máx}}$ (g L^{-1})	$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	G (h)	$X_{\text{máx}}$ (g L^{-1})
BR11281	0,7586	0,9137	2,11 ± 0,096	0,7768	0,8922	2,14 ± 0,084	0,6691	1,036	1,93 ± ,036
BR11366	0,4413	1,5707	1,55 ± 0,058	0,8466	0,8187	2,34 ± 0,118	0,8716	0,7953	2,38 ± 0,11

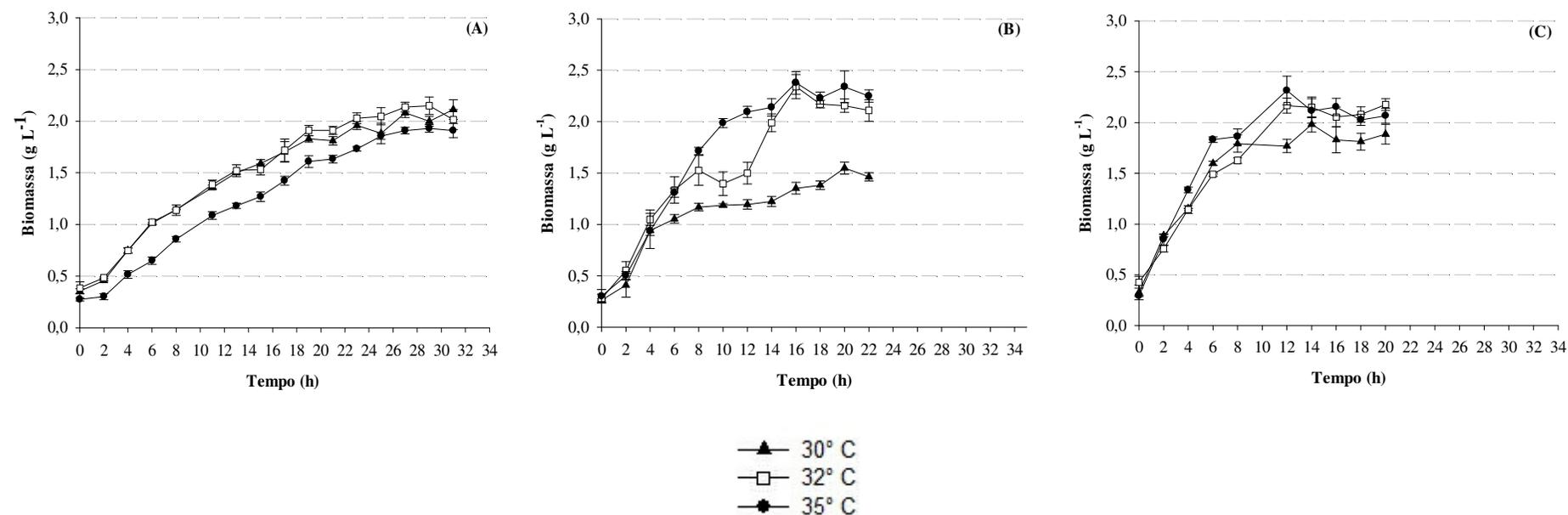


Figura 6. Crescimento celular sob agitação de 150 rpm variando a temperatura: 30, 32 e 35 °C. A) *Gluconacetobacter diazotrophicus* BR11281 e B) *Paraburkholderia tropica* BR11366 e C) Cultivo simultâneo.

4.3. Curvas de Crescimento em Biorreator de Bancada

4.3.1. Curvas de crescimento individuais

a) *Gluconacetobacter diazotrophicus* – BR11281

A partir das curvas de crescimento, observa-se o típico comportamento metabólico da BR11281 (Figura 7). A capacidade de conversão do substrato em biomassa aumenta conforme o aumento do volume da aeração, a maior biomassa, 3,28 g L⁻¹, foi observada no cultivo realizado com a aeração de 4 L min⁻¹ (Figura 7 C). Nas três aerações testadas (2, 3 e 4 L min⁻¹) o oxigênio foi totalmente consumido pelas estirpes nas primeiras horas do cultivo, permanecendo em torno de 0% no restante das horas do processo.

A velocidade de crescimento da célula é limitada pelo consumo de oxigênio, conhecida como velocidade máxima de crescimento, que reflete a capacidade máxima de síntese das enzimas envolvidas no bioprocessamento (SCHIMIDEL, 2001). As células consumiram rapidamente todo o oxigênio dissolvido, sendo a velocidade máxima de crescimento limitada pelo suprimento de oxigênio. O oxigênio foi limitante, porém não inviabilizou o crescimento das células.

A máxima produção de ácidos indólicos foi observada com 30 horas de incubação do cultivo que estava sob a aeração de 2 L min⁻¹, mantendo-se até o final da curva de crescimento (Figura 7 B). Estudos recentes confirmam que, em meio de cultivo que contém triptofano, a produção de compostos indólicos pela BR11281 ocorre através da via indol-3-piruvato. Adicionalmente, sugerem que a presença de antranilato no caldo pode ser derivado de uma via de catabolismo dos ácidos indólicos (RODRIGUES et al., 2016). A variação da concentração de compostos indólicos durante o tempo de incubação pode estar relacionada com esta via catabólica. A capacidade de produção desse hormônio pela estirpe tem sido relacionada com o seu potencial efeito promotor de crescimento vegetal (SARAVANAN et al., 2007). Porém, não está claro qual a função desse ácido especificamente para o metabolismo da bactéria. É evidente o potencial biotecnológico desta espécie, tanto para produção de inoculantes e/ou para a comercialização dos produtos do seu metabolismo. A possibilidade de comercializar esses produtos pode dinamizar a atividade das indústrias produtoras de inoculantes.

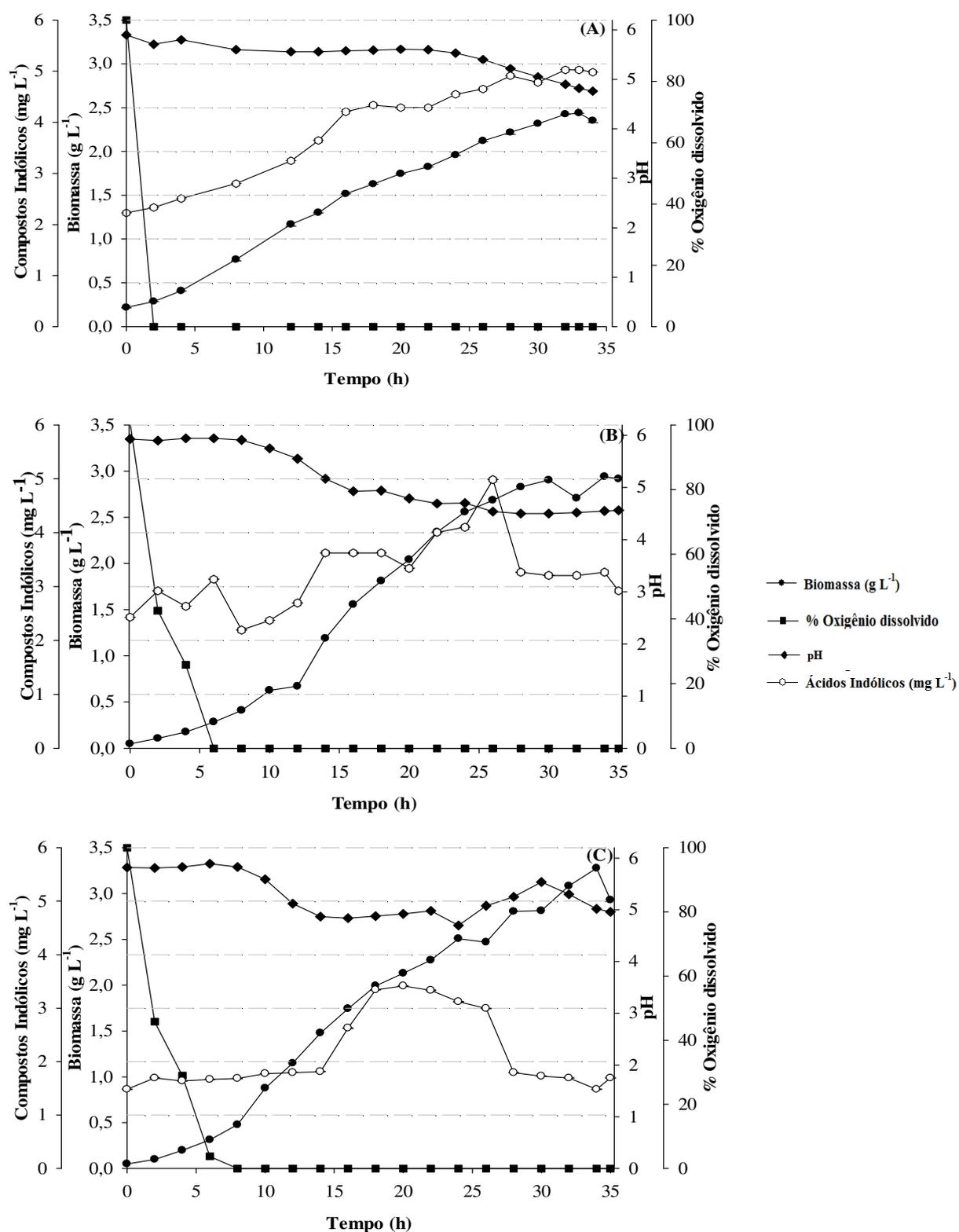


Figura 7. Curvas de crescimento celular e produção de compostos indólicos da estirpe BR11281, sob agitação de 150 rpm variando a aeração: A) 2 L min⁻¹; B) 3 L min⁻¹ e C) 4 L min⁻¹.

b) Identificação de ácidos orgânicos produzidos pela estirpe BR11281

Comparando os resultados das amostras (Figura 9 e 10) com o cromatograma dos padrões de ácidos (Figura 8) observa-se, através dos picos de maior elevação, a produção de modo mais acentuado dos ácidos oxálico e succínico. Identifica-se também a produção do ácido acético.

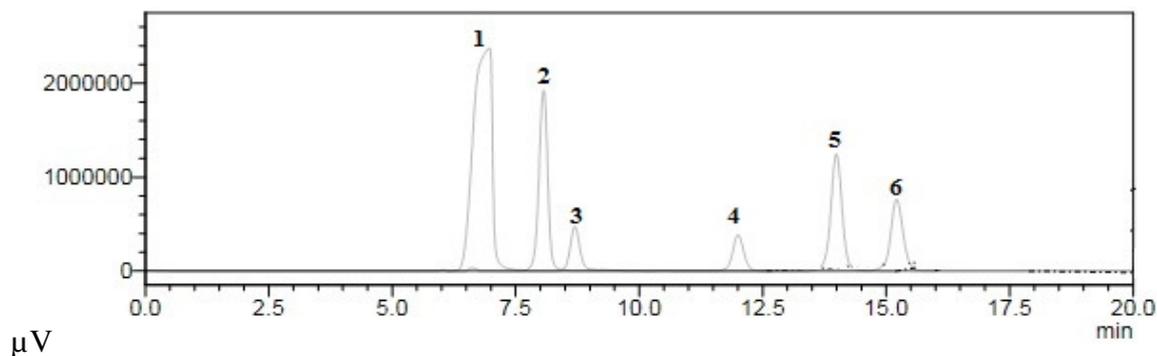


Figura 8. Cromatograma de padrões dos ácidos (10 g L⁻¹): 1 = oxálico, 2 = cítrico, 3 = glucônico, 4 = succínico, 5 = fórmico e 6 = acético.

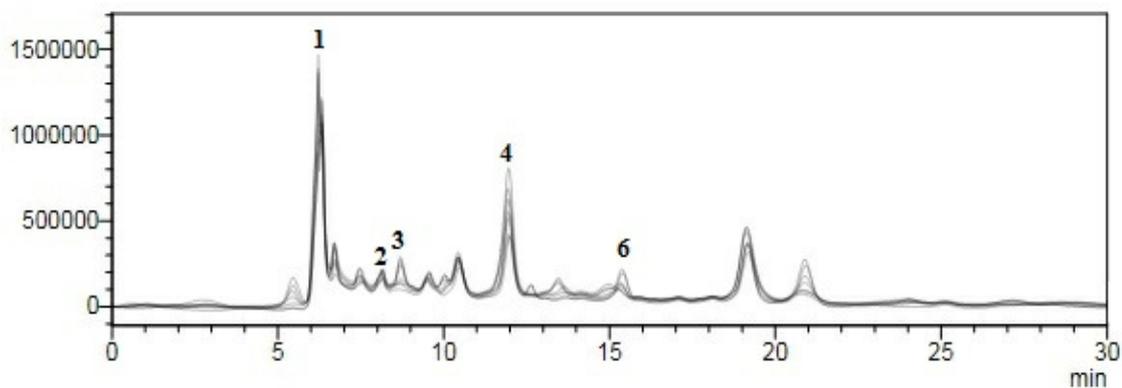


Figura 9. Cromatograma das amostras de cultivo retiradas com intervalos de 2 h entre 0 e 16 h de incubação da estirpe BR11281 em biorreator de bancada sob agitação de 150 rpm, 32 °C e aeração de 4 L min⁻¹ (1 = ácido oxálico / 2 = ácido cítrico / 3 = ácido glucônico / 4 = ácido succínico / 6 = ácido acético).

A produção de diferentes ácidos orgânicos explica a acidificação do meio durante a fase de crescimento exponencial da estirpe. Este comportamento é considerado descritivo deste gênero e desta família de bactérias. Por exemplo, a primeira descrição da família Acetobacteriaceae foi feita para a espécie *A. aceti* fato relacionado a produção de ácido acético (PASTEUR 1864, BEIJERINCK, 1898). Em 1935 surgiu o segundo gênero, *Gluconobacter* (ASAI, 1935) devido ao comportamento diferenciado de oxidar incompletamente a glicose produzindo ácido glicônico e derivados, em detrimento da metabolização de etanol a ácido acético e a falta de oxidação do acetato.

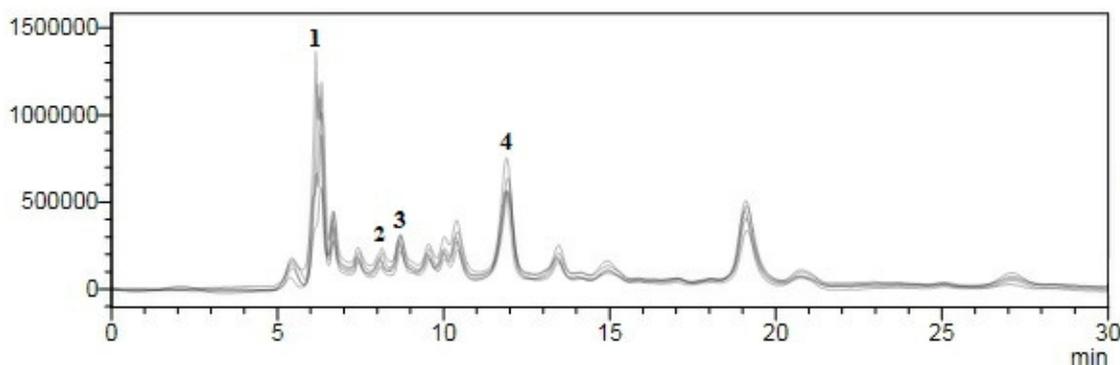


Figura 10. Cromatograma das amostras de cultivo retiradas com intervalos de 2 h entre as 18 e 28 h de incubação da estirpe BR11281 em biorreator de bancada sob agitação de 150 rpm, 32 °C e aeração de 4 L min⁻¹ (1 = ácido oxálico / 2 = ácido cítrico / 3 = ácido glucônico / 4 = ácido succínico).

Manzo et al. (2015) sugerem que a álcool desidrogenase ligada à membrana (ADHa) de *G. diazotrophicus* atua como uma enzima de função dupla, que é capaz de usar álcoois primários (C2-C6) e seus respectivos aldeídos como substratos alternativos. E que a enzima utiliza o etanol como substrato em um mecanismo de reação onde este é submetido a um processo de oxidação em duas etapas para produzir ácido acético sem liberar o intermediário acetaldeído para o meio. A partir desta observação eles propuseram um mecanismo que poderia permitir uma conversão maciça de etanol em ácido acético, como usualmente ocorre nas bactérias do ácido acético, mas sem o acúmulo transitório do acetaldeído. Esses resultados enzimáticos identificados em *G. diazotrophicus* são relevantes para desenvolvimento de processos biotecnológicos que simplificam as etapas de produção de metabólitos sem o acúmulo de acetaldeído, que é altamente tóxico. Entretanto, não é só na produção de vinagre que estas bactérias são utilizadas, esses microrganismos atuam diretamente na produção de diversas bebidas fermentadas, “nata de coco”, subprodutos da fermentação do cacau, celulose, assim como de diversos ácidos orgânicos importantes para a biossíntese de diversos compostos para vários setores da indústria (ácido 2-ceto-glucônico que é usado na produção de vitamina C, D-tagalose tipo de açúcar não calórico, shikimato que é um intermediário na produção de muitos antibióticos) (Raspor & Goranovic, 2008). Portanto, nossos resultados mostram claramente este comportamento ácido do crescimento.

Além disso, a principal via do metabolismo de *G. diazotrophicus* ocorre por meio da oxidação periplasmática de glicose através da glicose desidrogenase ligada à pirroloquinolina quinona (PQQ-GDH), que oxida a glicose em ácido glucônico no ambiente extracelular, produzindo uma grande quantidade de energia. Estudos sugerem que a oxidação extracelular de glicose, seguida pela formação de ácido glucônico é necessária para o início do crescimento exponencial da espécie (STEPHAN et al., 1991; ESKIN et al., 2014).

Junto a possibilidade de dinamizar a produção de inoculantes por biofábricas soma-se o potencial que a BR11281 tem de produzir os ácidos orgânicos. Esses ácidos são de grande interesse para a indústria de alimentos e farmacêutica e o bioprocesso desenvolvido em suas condições ótimas, especificamente para a recuperação desses compostos, apresenta vantagens competitivas, como economia de energia e baixa geração de resíduos, quando comparado com a produção sintética.

Embora uma grande variedade destas bactérias produza ácidos orgânicos, a maioria das que são usadas comercialmente pertencem aos gêneros *Acetobacter*, *Gluconacetobacter* e *Gluconobacter*. De uma forma geral, as bactérias do gênero *Acetobacter* preferem ambientes ricos em álcoois e as do gênero *Gluconobacter*, os ricos em açúcares (Raspor & Goranovic, 2008), o que faz estas bactérias serem muito adaptadas a condições adversas para outros

microrganismos como a adaptação a pH muito baixo e elevada concentração alcoólica ou mesmo alta osmolaridade. As bactérias isoladas de fermentações para a obtenção de vinagre são tolerantes a concentrações elevadas de ácido acético variando de 4 a 8 % em meio sólido e de 10 a 14 % em fermentadores industriais. Esta tolerância a acidez (crescem em pH 2,5 - 3,5) fez desta família uma campeã na utilização industrial e uma forma de selecionar novas espécies de amostras ambientais.

c) *Paraburkholderia tropica* – BR11366

A estirpe BR11366 tem uma elevada taxa de conversão de substrato em biomassa, dado o seu rápido acúmulo de biomassa em um curto intervalo de tempo, porém a máxima produção de biomassa, 1,1 g L⁻¹, observada em cultivo sob aeração de 4 L min⁻¹ com 8 h de incubação (Figura 11 C) foi inferior a biomassa obtida nos cultivos em agitador orbital, que chegou a 2,2 g L⁻¹ quando incubado a 32 °C. Deste modo, é possível inferir que o cultivo em biorreator de bancada apresentou alguma limitação para o crescimento da estirpe.

A estirpe tem comportamento de crescimento semelhante nas diferentes condições de aeração (Figura 11). Quando comparado com a BR11281, apresenta comportamento de crescimento bastante distinto nas condições deste estudo, uma vez que seu metabolismo tende a levemente alcalinizar o meio. Diferente do que é geralmente observado quando esta estirpe cresce em meio LGI-P, condição onde seu metabolismo de crescimento tende a acidificar o meio (REIS et al., 2004).

É possível observar que sob a maior aeração, 4 L min⁻¹, foi preciso um tempo menor para chegar a máxima produção de biomassa (Figura 11 C), ou seja, o maior suprimento de aeração promoveu o crescimento rápido da estirpe e a partir de 8 h de incubação atingiu a fase estacionária. Provavelmente, a maior aeração estimulou o aumento da taxa de duplicação das células, sendo em 8 h essa taxa saturada pela quantidade de microrganismo, tornando o suprimento de pO₂ insuficiente para manter a taxa metabólica, levando a população à fase de declínio com 10 h de incubação, condição confirmada pelo aumento de pO₂ para 80%. Provavelmente, a população diminuiu de tal maneira que em um intervalo de 2 h o volume de oxigênio dissolvido no meio aumentou significativamente. Por limitações técnicas não foi possível realizar ensaios com o suprimento de volumes maiores de aeração. Não foi identificado nas condições de cultivo desta estirpe a produção de compostos indólicos.

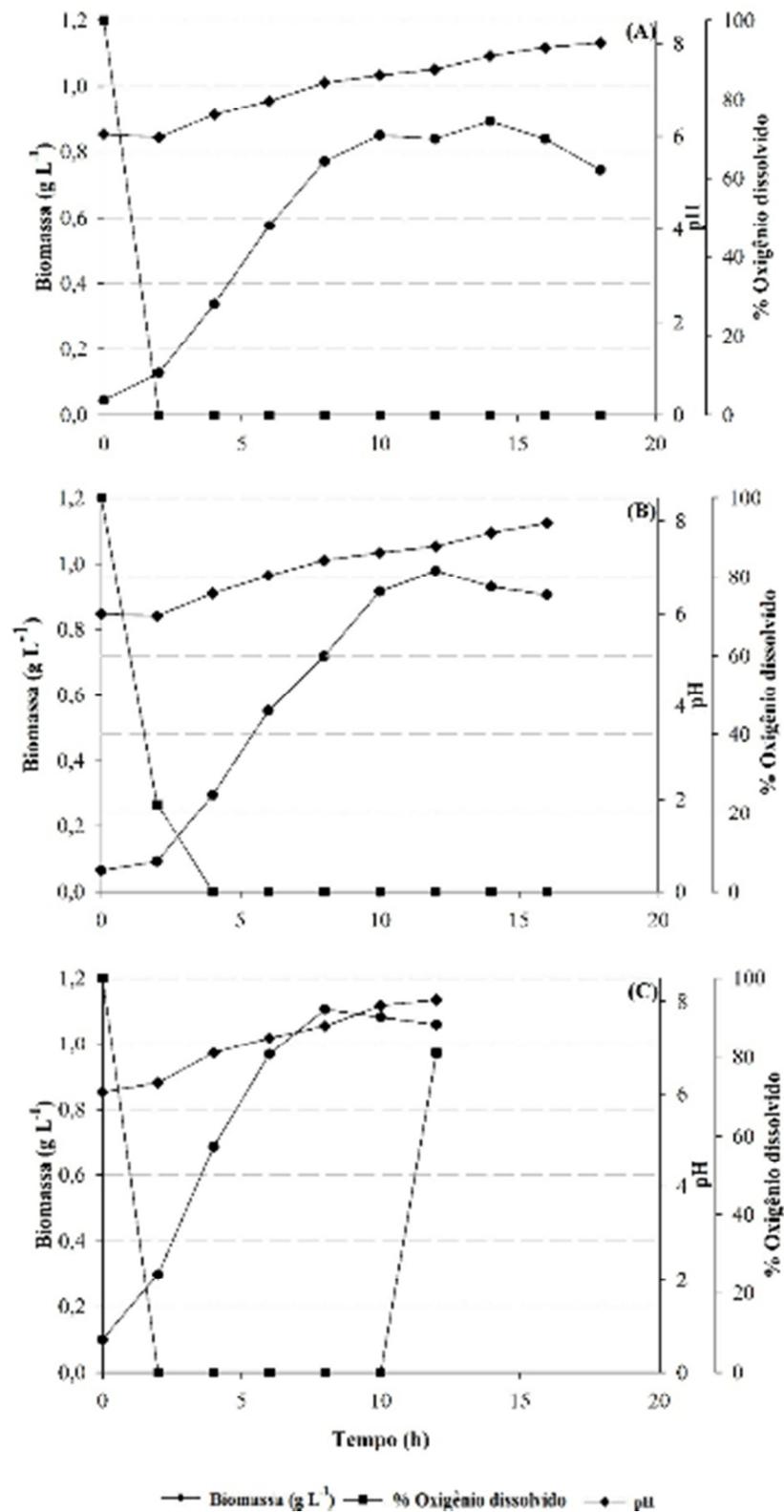


Figura 11. Crescimento celular da estirpe BR11366 em biorreator de bancada com 2 L de meio, sob agitação de 150 rpm variando a aeração: A) 2 L min⁻¹, B) 3 L min⁻¹, C) 4 L min⁻¹.

d) Identificação de ácidos orgânicos produzidos pela BR11366

A BR11366 não apresentou uma produção de ácidos que fosse suficiente para influenciar o pH do meio. Foram identificados com maior expressão os ácidos oxálicos e succínico (Figuras 12 e 13).

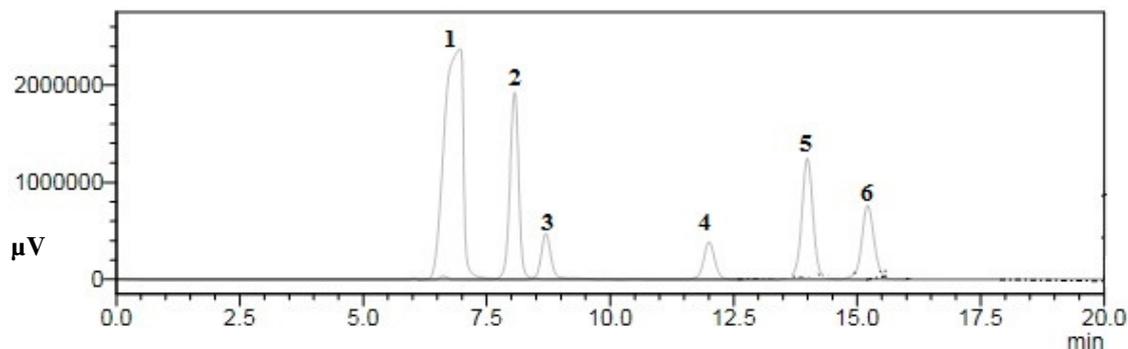


Figura 12. Cromatograma de padrões dos ácidos (10 g L⁻¹): 1) oxálico, 2) cítrico, 3) glucônico, 4) succínico, 5) fórmico e 6) acético.

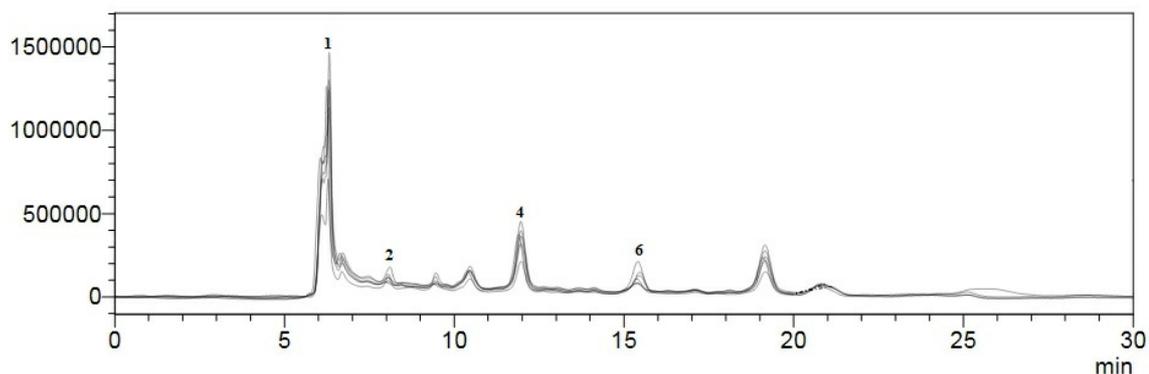


Figura 13. Cromatograma das amostras de cultivo retiradas com intervalos de 2 h entre 0 e 12 horas de crescimento da estirpe BR11366 em biorreator de bancada sob agitação de 150 rpm, 32 °C e aeração de 4 L min⁻¹ (1 = ácido oxálico / 2 = ácido cítrico / 4 = ácido succínico / 6 = ácido acético).

Em condições aeróbicas, o succinato é um intermediário do ciclo do ácido cítrico e da derivação do glioxilato, e em microrganismos pode acumular-se em grandes quantidades (CAO et al., 2013).

e) Curvas de crescimento em cultivo simultâneo em biorreator

Observou-se nos cultivos individuais que o crescimento das estirpes foi favorecido com o aumento do volume da aeração. Sendo assim, selecionou-se as aerações de 3 L min⁻¹ e 4 L min⁻¹ (Figura 14) para os ensaios de cultivos simultâneos em biorreator com as estirpes BR11281 e BR11366. O cultivo simultâneo em aeração de 3 L min⁻¹ (Figura 14 A) teve um padrão de crescimento ao longo do tempo de incubação semelhante ao do cultivo individual da estirpe BR11366.

Foi possível identificar ao longo do tempo de incubação os ácidos oxálico, cítrico, glucônico e acético. A partir do cromatograma (Figura 16), observa-se que há uma melhor

expressão dos ácidos oxálico, cítrico, glucônico e acético, os dois últimos ácidos foram identificados no cultivo individual da BR11281. Avaliando o a distribuição dos ácidos ao longo do tempo de cultivo e comparando-o com a variação do pH durante a curva de crescimento, sugere-se que a BR11281 tem seu crescimento potencializado a partir das 10 h de cultivo. Após as 18 h decorrida do início da curva, há uma retomada da expressão do metabolismo da BR11366 coincidindo com a retomado do aumento do pH, sendo identificado no cromatograma o ácido succínico a partir das 20 h (Figura 17). Com a análise da variação do pH e do padrão de produção de ácidos orgânicos é possível inferir que as estirpes se desenvolveram em cultivo simultâneo quando submetidas a aeração de 4 L min^{-1} mesmo tendo metabolismo de crescimento distinto.

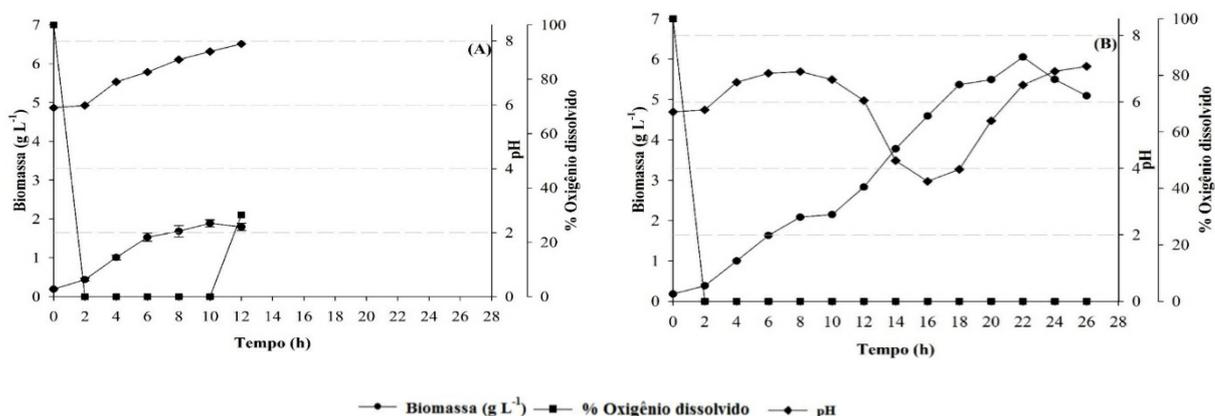


Figura 14. Crescimento celular de cultivo simultâneo em biorreator de bancada com 2 L de meio com as estirpes BR11281 e BR11366, sob agitação de 150 rpm variando a aeração: A) 3 L min^{-1} e B) 4 L min^{-1} .

f) Identificação de ácidos orgânicos produzidos durante o cultivo simultâneo

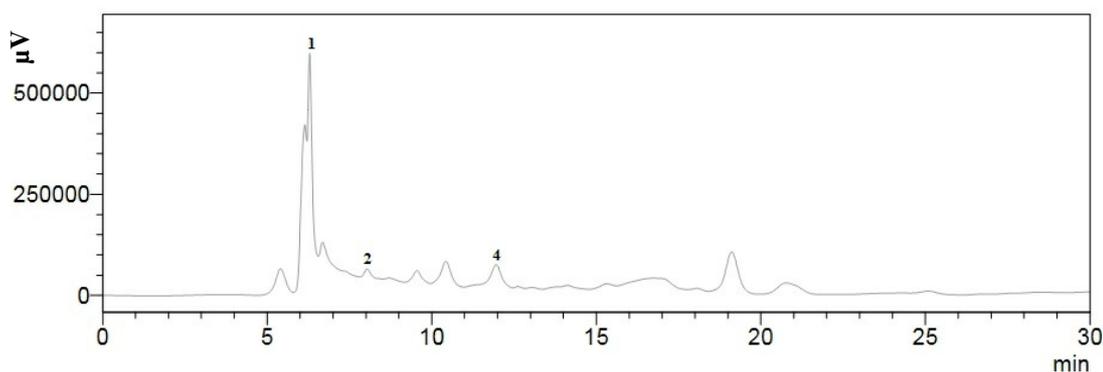


Figura 15. Cromatograma das amostras de cultivo simultâneo no tempo 0 em biorreator de bancada sob agitação de 150 rpm, $32 \text{ }^\circ\text{C}$ e aeração de 4 L min^{-1} . (1 = ácido oxálico / 2 = ácido cítrico / 4 = ácido succínico).

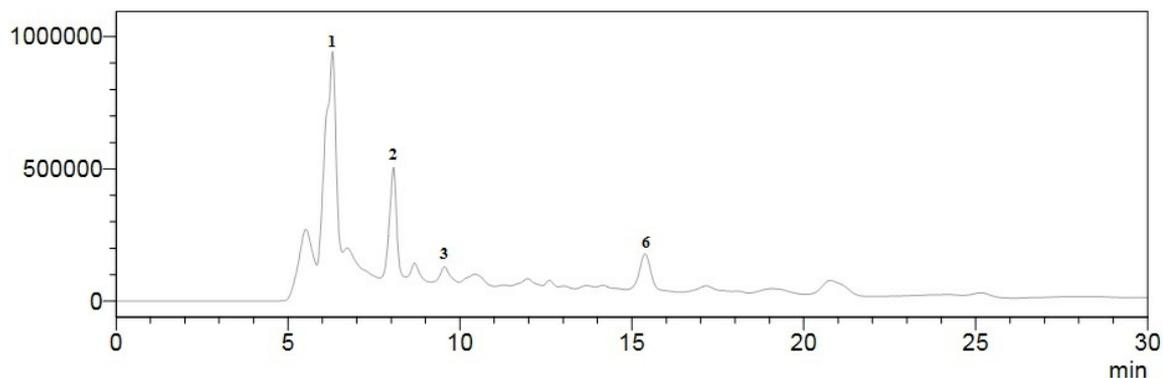


Figura 16. Cromatograma das amostras de cultivo simultâneo com 14 h em biorreator de bancada sob agitação de 150 rpm, 32 °C e aeração de 4 L min⁻¹. (1= ácido oxálico / 2= ácido cítrico / 3= ácido glucônico / 6= ácido acético).

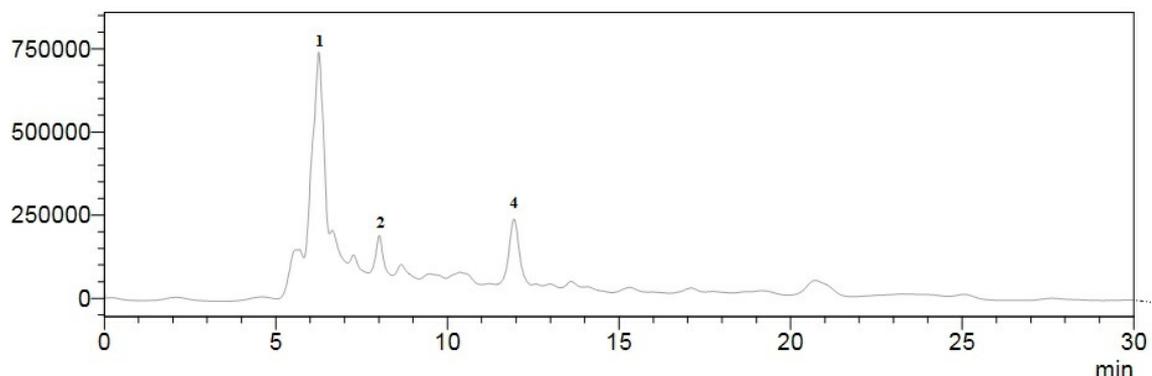


Figura 17. Cromatograma das amostras de cultivo simultâneo com 22 h em biorreator de bancada sob agitação de 150 rpm, 32 °C e aeração de 4 L min⁻¹. (1 = ácido oxálico / 2 = ácido cítrico / 4 = ácido succínico).

4.4. Quantificação das Estirpes BR11281 e BR11366 Cultivadas Simultaneamente por PCR em Tempo Real

4.4.1. Curvas padrão

A partir da curva padrão é possível observar boa eficiência dos *primers* utilizados (Figura 18). 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 (coeficiente angular) 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 e slope próximos a 3,33.

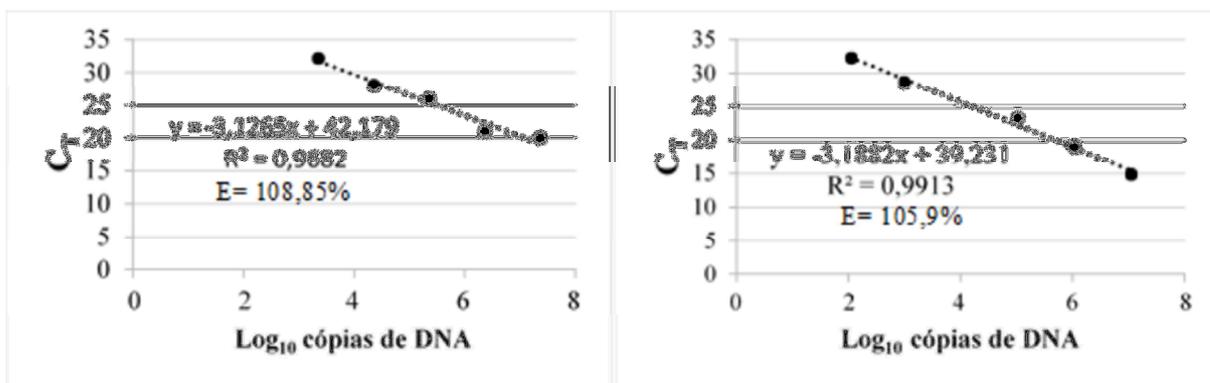


Figura 18. Curvas padrão para (A) BR11281 iniciadores 4525 e (B) BR11366 iniciadores 3641, por meio de amplificação do DNA genômico por PCR em tempo real.

4.4.2. Cultivos em agitador orbital

A partir da quantificação por PCR em tempo real, observa-se que houve variação entre as populações das estirpes envolvidas no cultivo simultâneo (Figura 19). *Paraburkholderia tropica* estirpe BR11366 predominou nas duas temperaturas, conforme observado também no cultivo individual, sendo 35 °C a temperatura que mais favoreceu o seu crescimento (Figura 19 B). Conforme observado nos ensaios de crescimento individual em agitador orbital, *G. diazotrophicus* estirpe BR11281 tem o seu crescimento limitado em temperatura de 35 °C. Mesmo com o predomínio da BR11366, foi possível obter células das duas estirpes em cultivo simultâneo incubados em agitador orbital.

Para os ensaios em biorreator de bancada foi escolhida a temperatura de 32 °C, buscando equilibrar a população das estirpes envolvidas no cultivo simultâneo através da variação da aeração.

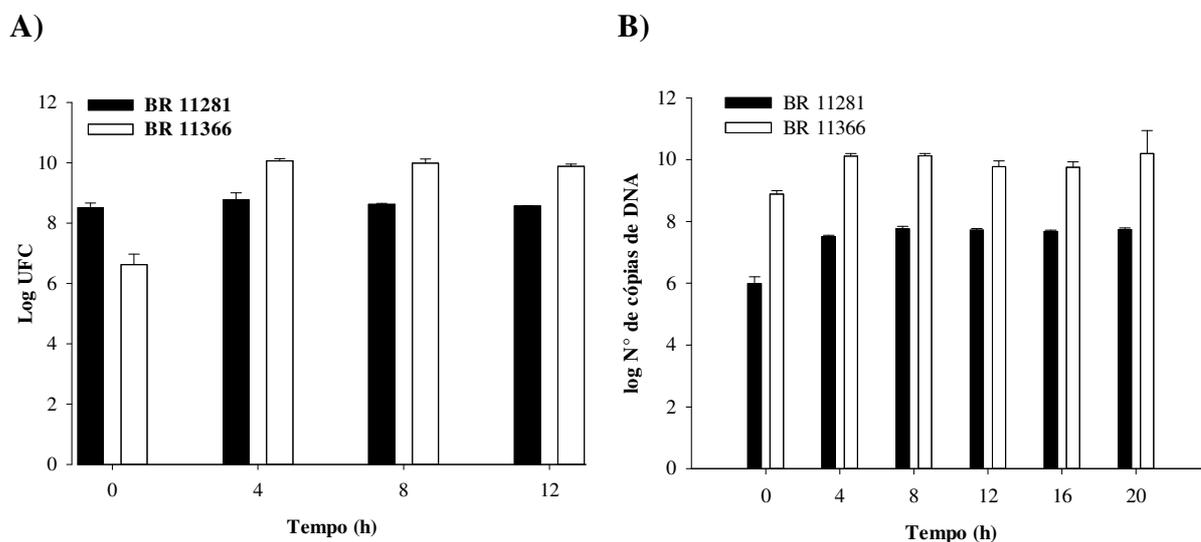


Figura 19. Quantificação em número de cópias de DNA mL⁻¹ (por PCR em tempo real) das estirpes envolvidas no crescimento celular simultâneo com BR11281 e BR11366 em agitador orbital sob agitação de 150 rpm variando a temperatura: A) 32 °C e B) 35 °C.

4.4.3. Cultivo simultâneo em bioreator

Sob aeração de 3 L min^{-1} a BR11281 praticamente não cresceu, confirmando o que foi observado em relação a ausência de produção dos ácidos orgânicos neste cultivo. Provavelmente, o $\%pO_2$ não foi suficiente para atender a demanda da glicose desidrogenase ligada à pirroloquinolina quinona, sendo esta rota de obtenção de energia suprimida. Entretanto, a estirpe manteve-se viável em uma população estável de $4,15 \cdot 10^8 \text{ UFC mL}^{-1}$. Por outro lado a *P. tropica* manteve seu crescimento, atingindo uma população final de $9,52 \cdot 10^9 \text{ UFC mL}^{-1}$, quase 100 vezes maior que a população de *G. diazotrophicus* (Figura 20 A).

Sob a aeração de 4 L min^{-1} ambas as estirpes se desenvolveram (Figura 20 B). Sendo o tempo de geração e taxa de crescimento nestas condições respectivamente $1,78 \text{ h}^{-1}$ e $0,389 \text{ h}^{-1}$ para a BR11281, enquanto que para a BR11366 foi $0,987 \text{ h}^{-1}$ e $0,702 \text{ h}^{-1}$. Deste modo, a *P. tropica* chegou a aproximadamente $10^{10} \text{ UFC mL}^{-1}$, enquanto a quantidade máxima de UFC mL^{-1} da *G. diazotrophicus* foi de aproximadamente 10^9 .

Observa-se que enquanto a BR11281 estava na fase exponencial de crescimento a BR11366 ficou em fase estacionária. De acordo com o sequenciamento genômico da linhagem Ppe8 de *Paraburkholderia tropica*, os genes relacionados ao processo de fixação de nitrogênio, os sistemas de secreção (I, II, III, IV e VI) relacionados a uma variedade de características metabólicas, como metabolismo de carboidratos, aminoácidos, vitaminas e proteínas, foram detectados, além disso esta espécie apresenta transportadores de cátions e sistemas uni-, sim e antiporte, sugerindo que a bactéria tem diversa capacidade de transportar diferentes moléculas e ampla capacidade metabólica (SILVA et al., 2018). Deste modo, pode-se inferir que esta plasticidade metabólica, provavelmente, foi utilizada como estratégia para desenvolver um poder de tamponamento capaz de manter as células viáveis em uma população estável em $10^{10} \text{ UFC mL}^{-1}$ enquanto a BR11281 crescia e acidificava significativamente o meio. Conforme o esperado, a quantificação das células em biomassa (g L^{-1}) e em UFC mL^{-1} apresentaram padrão semelhante de crescimento em relação ao tempo de incubação.

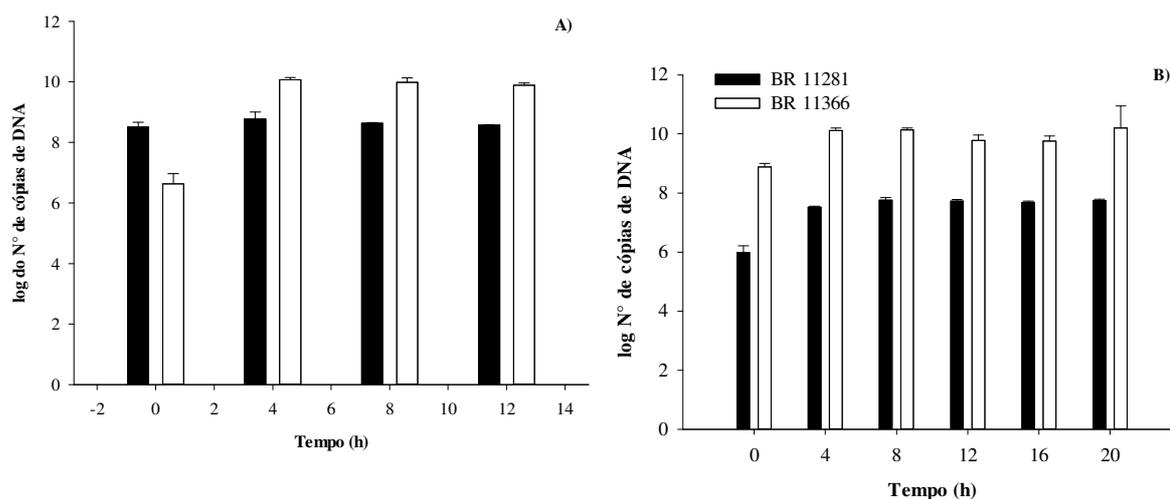


Figura 20. Quantificação em número de cópias de DNA mL^{-1} (por qPCR) das estirpes envolvidas no crescimento celular simultâneo com a BR11281 e BR11366 em biorreator de bancada a 32°C e 150 rpm , variando a aeração: A) 3 L min^{-1} e B) 4 L min^{-1} durante 24 h.

4.4.4. Contagem de células viáveis no inoculante

A contagem das células viáveis do inoculante foi realizada um dia após o seu preparo (Figura 21). Conforme a IN n° 6 de 10 de março de 2016, não existe uma recomendação com a população mínima de bactérias que deve conter os inoculantes feitos com bactérias associativas, a instrução recomenda que o fabricante informe qual a população de microrganismos que contém a embalagem.

A contagem do inoculante das estirpes cultivadas simultaneamente foi possível tendo em vista a morfologia distinta das colônias (Figura 22). O inoculante produzido a partir do cultivo simultâneo apresentou uma população total de $1,52 \cdot 10^9$ ($2,5 \cdot 10^8$ de UFC mL⁻¹ da BR11281 e $1,29 \cdot 10^9$ da BR11366) e $2,15 \cdot 10^9$ UFC mL⁻¹ ($4,3 \cdot 10^8$ UFC mL⁻¹ da BR11281 e $1,79 \cdot 10^9$ UFC mL⁻¹ da BR11366) em veículo turfoso e líquido respectivamente (Figura 21).

De modo geral, os trabalhos realizados para estudos das estirpes recomendadas como inoculante para a cana-de-açúcar, adotam uma população entre 10^7 - 10^9 UFC mL⁻¹ (SANTOS et al., 2017; PEREIRA et al., 2018). Porém, as concentrações são padronizadas, de modo a garantir que as populações de cada estirpe estejam equilibradas no momento da inoculação.

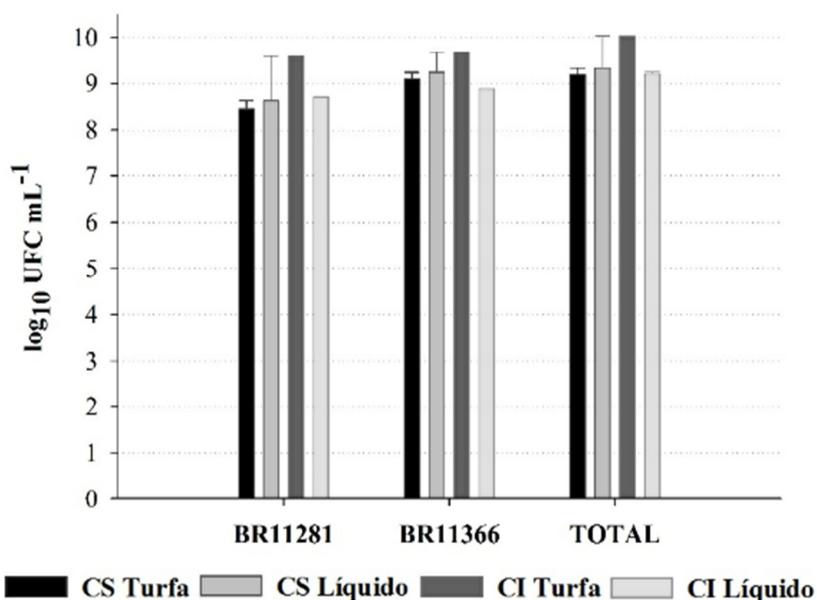


Figura 21. Log₁₀ UFC mL⁻¹ da população de bactérias em inoculantes após um dia do seu preparo. (CS = cultivo simultâneo e CI = cultivo individual).

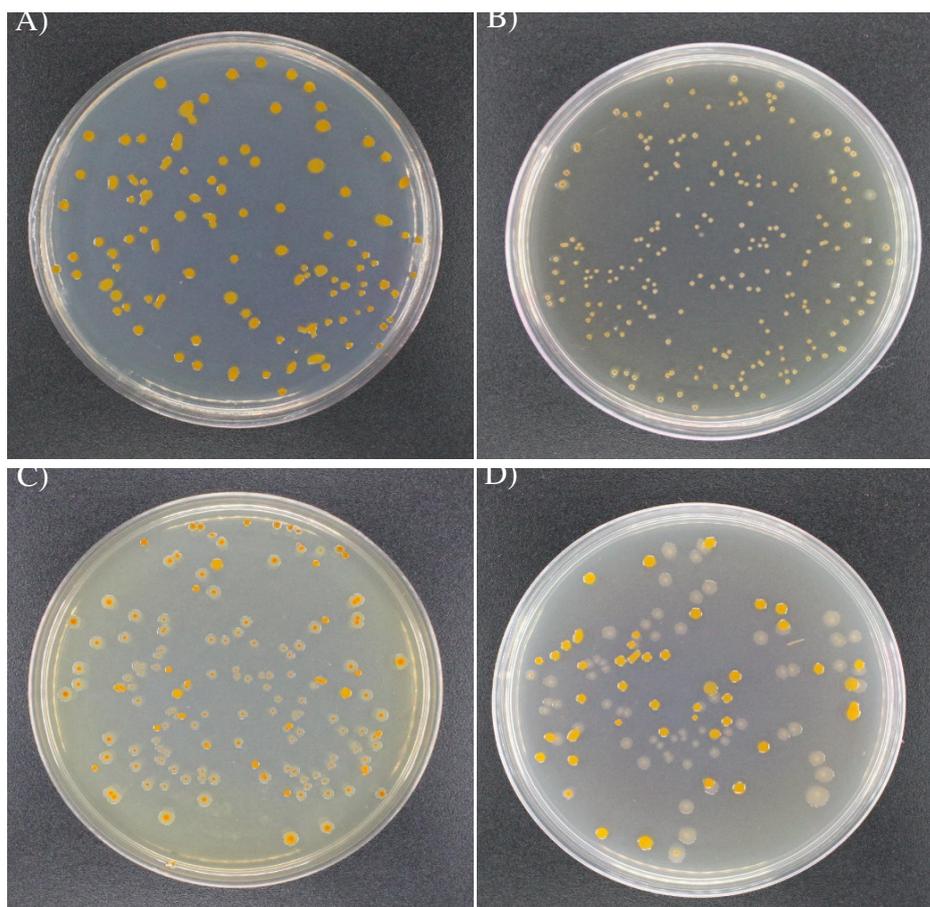


Figura 22. Contagem de células viáveis de inoculante em meio sólido LGI-P 24 h após a finalização do bioprocesso. A) Inoculante sólido da BR11281 (diluição 10^{-6}); B) Inoculante sólido da BR11366 (diluição 10^{-6}); C) Inoculante sólido do cultivo simultâneo da BR11281 e BR11366 (diluição 10^{-6}) e; D) Inoculante sólido do cultivo individual e posterior mistura da BR11281 e BR11366 (diluição 10^{-7}).

5. CONCLUSÕES

As duas estirpes *Gluconacetobacter diazotrophicus* BR 11281 e *Paraburkholderia tropica* BR11366 se adaptaram bem as condições de cultivo com meio simplificado, produzindo uma quantidade satisfatória de células em cultivos individuais, sendo a temperatura ótima de crescimento 32 °C, produzindo a biomassa de 2,14 g L⁻¹ em 29 h de incubação ($\mu_{\text{máx}} = 0,77 \text{ h}^{-1}$) e 32 °C e 35 °C, produzindo aproximadamente 2,4 g L⁻¹ de biomassa em 16 h de incubação ($\mu_{\text{máx}} \sim 0,85 \text{ h}^{-1}$), para a BR11281 e BR11366 respectivamente.

Nos cultivos individuais e simultâneos, nas três condições de aeração avaliadas, o oxigênio dissolvido foi totalmente consumido, sendo, portanto, o principal fator limitante deste bioprocessos.

As estirpes têm metabolismo distinto nas condições avaliadas. Mesmo assim não houve inibição de crescimento entre as estirpes, sendo possível cultivá-las simultaneamente.

Foi possível produzir o inoculante a partir do cultivo simultâneo, sendo a contagem da BR11366 superior na ordem de dez vezes em relação a BR11281.

7. REFERÊNCIAS

ALVARES, 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.** Badajoz: Formatex, p. 160-167, 2010. Disponível em < https://www.researchgate.net/publication/259656181_Evaluation_of_solgel_silica_matrices_as_inoculant_carriers_for_Mesorhizobium_spp_cells> Acesso em 2018.

ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. The success of BNF in soybean in Brazil. **Plant Soil**, v. 252, p. 1-9, 2004.

ASAI, T. Taxonomic studies on acetic acid bacteria and allied oxidative bacteria isolated from fruits: a new classification of the oxidative bacteria. **Journal of Agriculture and Chemistry Society of Japan**, v.11, p. 674-708 (in Japanese), 1935.

ARAÚJO, S.; CASTRO, J. R. P. A fixação biológica de nitrogênio. Conteúdo especial. **Agroanalysis**, agosto de 2017. Disponível em < <http://www.anpii.org.br/anpii-na-revista-agroanalysis-edicao-agosto-de-2017/>> Acesso em 2017.

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.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, 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 mild plant pathogen as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov. and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.46, p.802-810, 1996.

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

BARELA, J. F. **Seletividade de herbicidas para a cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) afetada pela interação com nematicidas aplicados no plantio.** 82 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

BASHAN, Y.; BASHAN, L. E.; PRABHU, S. R.; HERNANDEZ, J-R. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). **Plant Soil**, v. 378, p.1-33, 2014.

BASTOS, E. **Cana-de-açúcar, o verde mar de energia.** São Paulo, Ícone, 1987. 130 p.

BEIJERINCK, M.W. **Über die Arten der Essigbakterien. Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde. Infekt. Hyg.**, 4:209–216, 1898.

BERNABEU, P.R.; PISTORIO, M.; TORRES, G. T.; SANTOS, P. E.; GALAR, M. L.; BOIARDI, J.L.; LUNA M. F. Colonization and plant growth-promotion of tomato by

Burkholderia tropica. **Scientia Horticulturae**, v. 191, p. 113–120, 2015.

BERNABEU, P. R.; GARCÍA, S. S.; FERREYRA G, F. GUIDI, V. I.; GALAR, M. L.; BOIARDI, J. L.; LUNA, M. F. Mineral phosphate solubilization in *Burkholderia tropica* involves an inducible PQQ-glucose dehydrogenase. **British Microbioly Research Journal**, v. 13, p. 1–8, 2016.

BODDEY, R. M.; POLIDORO, J. C.; REZENDE, A. S.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S. Use the ¹⁵N natural abundance technique for the quantification of the contribution of N₂ fixation to sugar cane and other grasses. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.28, p. 889-895, 2001.

BRASIL. Instrução Normativa n. 6 de 10 de março de 2016. **Diário Oficial da União**, Brasília, n. 49, 14 de mar. 2016. Disponível em <<http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=14/03/2016&jornal=1&pagina=11&totalArquivos=92>> Acesso em outubro de 2017.

BRASIL. Instrução Normativa n. 30 de 12 de novembro de 2010. **Diário Oficial da União**, Brasília, n. 4, 17 nov. 2010. Disponível em:<www.in.gov.br/visualiza/index.jsp?data=17/11/2010&jornal=1&pagina=4&totalArquivo=180>. Acesso em agosto de 2017.

BRASIL. Instrução Normativa n. 13 de 24 de março de 2011. **Diário Oficial da União**, Brasília, n. 58, 25 mar. 2011. Disponível em <<http://www.in.gov.br/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=3&data=25/03/2011>>. Acesso em agosto de 2017.

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.

CAO, Y.; ZHANG, R.; SUN, C.; CHENG, T.; LIU, Y.; XIAN, M. Fermentative succinate production: an emerging technology to replace the traditional petrochemical processes. **Biomed Res Int.**, v. 2013, p. 1-12, 2013.

CASAS, J. A.; SANTOS, V. E.; GARCÍA-OCHOA, F. Xanthan gum production under several operational conditions: molecular structure and rheological properties. **Enzyme and Microbiology Technology**, v. 26, p. 282-291, 2000.

CAVALCANTE V.A.; DOBEREINER J. A new acid-tolerant nitrogen fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant Soil**, v. 108, p. 23-31, 1988.

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

COENYE T.; VANDAMME P. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. **Environ Microbiol**, v. 5, p. 719-729, 2003.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_08_17_10_07_35_boletim_cana_p_ortugues_-_2o_lev_-_16-17.pdf> Acesso em 2017.

DIXON R., KAHN D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature Reviews Microbiology**, v.2, p. 621-631, 2004.

DRECHSEL, M. M. **Antibiose de *Gluconacetobacter diazotrophicus* contra bactérias diazotróficas e fitopatogênica de cana-de-açúcar e caracterização molecular de genes envolvidos na síntese de substâncias antagônicas**. 114p. Tese (Doutorado em Agronomia – Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2011.

DÖBEREINER, J. Recent changes in concepts of plant bacteria interactions: endophytic N₂ fixing bacteria. **Ciência e Cultura**, v. 44, p. 310-313, 1992.

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.

DOBRITSA A. P.; SAMADPOUR M. Transfer of eleven *Burkholderia* species to the genus *Paraburkholderia* and proposal of *Caballeronia* gen. nov., a new genus to accommodate twelve species of *Burkholderia* and *Paraburkholderia*. **Int. J. System. Evol. Microbiol**, v. 66, p. 2836-46, 2016.

DONG, Z.; MCCULLY, M. E.; CANNY, M. J. Does *Acetobacter diazotrophicus* live and move in the xylem of sugarcane stems Anatomical and physiological data. **Ann Bot**, v. 80, p. 147–158, 1997.

ESKIN, N.; VESSEY, K.; TIAN, L. Research Progress and Perspectives of Nitrogen Fixing Bacterium, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, in Monocot Plants. **Intern. J. Agron.**, v. 2014, p. 1-13, 2014.

ESTRADA-DE LOS SANTOS P.; ROJAS-ROJAS F. U.; TAPIA-GARCÍA E. Y. To split or not to split: an opinion on dividing the genus *Burkholderia*. **Annals of Microbiology**, v. 66, p. 1303–1314, 2016.

GYANESHWAR P.; HIRSCH A. M.; MOULIN L.; CHEN, W. M.; ELLIOTT, G. N.; BONTEMPS, C. SANTOS, P. E.; GROSS, E.; REIS, JR. F. B.; SPRENT, J. I.; YOUNG, J. P. W.; JAMES, E. K. Legume-nodulating betaproteobacteria: diversity, host range, and future prospects. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 24, p. 1276-1288. 2011.

HERRIDGE, D. F.; GEMLL, G.; HARTLEY, E. **Legume inoculants and quality control: inoculants and nitrogen fixation of legumes in Vietnam**. Canberr: Aciar Proceedings, 109 p., 2002.

HERRIDGE, D. F.; PEOPLES, M. B.; BODDEY, R. M. Global inputs of biological nitrogen

fixation in agricultural systems David F. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 311, p. 1-18, 2008.
IBGE (2017). Levantamento Sistemático da Produção Agrícola, Sistema IBGE de recuperação automática – **SIDRA**. <
ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_%5Bmensal%5D/Fasciculo/2017/lspa_201712.pdf>. Acesso em: 2018.

INTORNE, A. C. Identification and characterization of *Gluconacetobacter diazotrophicus* mutants defective in the solubilization of phosphorus and zinc. **Arch. Microbiol.**, v. 191, p. 477-483. 2009.

JAMES, E. K.; REIS, V. M.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Infection of sugarcane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. **J Exp Bot**, v. 45, p. 757–766. 1994.

KÉKESSY, D.A.; PIGUET, J.D. New method for detecting bacteriocin production. **Appl. Microbiol.**, v. 20, p. 282-283, 1970.

KIM, J.; LIM, J.; LEE, C. Quantitative real-time PCR approaches for microbial community studies in wastewater treatment systems: Applications and considerations. **Biotechnol. Advances**, v. 31, p. 1358-1373, 2013.

KRALIK, P. & RICCHI, M. A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. **Front. Microbiol.** v. 08, art 108, p. 1-9. 2017.

LOGESHWARAN, P.; THANGARAJU, M.; RAJASUNDARI, K. Hydroxamate Siderophores of Endophytic Bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* Isolated from Sugarcane Roots. **Aust. J. Basic App. Sci.** v. 4, p. 3564–3567. 2009.

MAGALHÃES, F.M.M.; BALDANI, J.I.; SOUTO, S.M.; KUYKENDALL, J.R. & DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. An. **Acad. Bras. Ci.**, 55:417-430, 1983.

MANZO, S. G.; ESCAMILLA, J. E.; VALDEZ, A. G.; VELÁZQUEZ, G. L.; CARLO, A. V.; QUINO, J. M.; MORA, I. M.; TORRES, I. G.; FLORES, S. E.; ZENTELLA, M. L. C.; ESPINOSA, R. A.; KRONECK, P.M.H.; TORRES, M. E. S. The oxidative fermentation of ethanol in *Gluconacetobacter diazotrophicus* is a two-step pathway catalyzed by a single enzyme: Alcohol-Aldehyde Dehydrogenase (ADHa). **Int. J. Mol. Sci.** v,16, p. 1293-1311, 2015.

MUS, F.; ALLEMAN, A. B.; PENCE, N.; SEEFELDT, L. C.; PETERS, J. W. Exploring the alternatives of biological nitrogen fixation. **Metallomics**, v.10, p. 523-538, 2018.

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.

OLIVEIRA, T. M. S. **PCR em tempo real: Métodos e aplicações**. Tese (Mestrado) - Universidade de Aveiro. Aveiro, 2010.

OLIVEIRA, A.L.M. de; CANUTO, E.D. de; 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, A. L. M.; URQUIAGA, S.; DOBEREINER, J.; BALDANI, J. I. The effect of inoculating endophytic N₂ – fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant Soil**, v. 242, p. 205-2015, 2002.

OREN A.; GARRITY G. M. Notification of changes in taxonomic opinion previously published outside the IJSEM. **Int J Syst Evol Microbiol**, 65: 2028-2029. 2015.

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

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

PASTEUR, L. Mémoire sur la fermentation acétique. **Annual Science Lécole Normative Supérative**. Paris, v.1, p.113–158, 1864.

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

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

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, p. 367-370, 2013.

PEREIRA, W.; SOUSA, J. S.; SCHULTZ, N.; REIS, V. M. Sugarcane productivity as a function of nitrogen fertilization and inoculation with diazotrophic plant growth-promoting bacteria. **Sugar Tech**, p. 1-12, 2018.

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

RASPOR, P., GORANOVIĆ, D. Biotechnological applications of Acetic Acid Bacteria. **Cri. Rev. Biotechnol.**, v.28, p.101–124, 2008.

REIS, V. M.; ESTRADA, P. S.; TENORIO, S. S.; VOGEL, J.; STOFFELS, M.; GUYON, S.; MAVINGUI, P.; BALDANI, V. L.; SCHMID, M.; BALDANI, J. I.; BALANDREAU, J. (2004). *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. **Int J Syst Evol Microbiol**, v.54, p. 2155-2162, 2004.

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, (Embrapa Agrobiologia. Circular Técnica 30. ISSN 1519-7328). 4p. 2009.

RODRIGUES, E. P.; SOARES, C. P.; GALVÃO, P. G.; EDDIE L. IMADA, E. L.; ARAÚJO, J. L. S.; ROUWS, L. F. M.; OLIVEIRA, A. L. M.; VIDAL, M. S.; BALDANI, J. I. Identification of genes involved in indole-3-acetic acid biosynthesis by *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 strain using transposon mutagenesis. *Front. Microbiol.*, v. 7, p. 1-12, 2016.

ROBERTSON, P. G. & GRACE, P. R. Greenhouse Gas Fluxes in Tropical and Temperate Agriculture: The need for a Full-Cost accounting of Global Warming Potentials. *Environment, Development and Sustainability*, v.6, p. 51-63, 2004.

RUSCH A.; ISLAM S.; SAVALIA P. *Burkholderia insulsa* sp. nov., a facultatively chemolithotrophic bacterium isolated from an arsenic-rich shallow marine hydrothermal system. *Int J Syst Evol Microbiol*, v. 65, p. 189-194. 2015.

SANTOS, G. S.; RIBEIRO, F. S.; FONSECA, C. S.; PEREIRA, W.; SANTOS, L. A.; REIS, V. M. Development and nitrate reductase activity of sugarcane inoculated with five diazotrophic strains. *Archives of Microbiology*, v. 199, p. 863-873, 2017.

SARAVANAN, V. S., MADHAIYAN, M.; THANGARAJU, M. Solubilization of zinc compounds by the diazotrophic, plant growth promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Chemosphere*. v. 66, pp. 1794–1798. 2007.

SCHEIDT, W. **Estratégias de cultivo para produção de biomassa e promotores de crescimento por *Herbaspirillum seropedicae* BR-11417**. 102p Dissertação (Mestrado em Ciências, Engenharia Química). Instituto de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

SCHMIDELL, W. Modelagem e simulação de processos fermentativos. In: **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. Eds. Lima, U.A.; Aquarone, E.; Borzani, W.; Schmidell, W. Editora Edgard Blücher Ltda. São Paulo, Brasil, v.2, 2001.

SCHULTZ N., PEREIRA W., REIS V.M, URQUIAGA S. Produtividade e diluição isotópica de ¹⁵N em cana-de-açúcar inoculada com bactérias diazotróficas. **Pesq. agropec. bras.** v. 51 n. 9, p. 1594-1601, Sept. 2016.

SCHULTZ N., SILVA J.A., SOUSA J.S., MONTEIRO R.C., OLIVEIRA R.P., CHAVES V.A., PEREIRA W., SILVA M.F., REIS V.M, URQUIAGA S. Inoculation of sugarcane with diazotrophic bacteria. **R Bras Ci Solo**. v 38:359-71, 2014.

SCHULTZ, N.; MORAIS, R. F.; SILVA, J. A.; BAPTISTA, R. B.; OLIVEIRA, 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 agrônômica de duas variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas e adubadas com nitrogênio. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 47, p.261-268, 2012.

SILVA, P. R. A. D.; ARAÚJO, J. L. S.; VIDAL, M. S.; CRUZ, L. M.; SOUZA, E. M.; BALDANI, J. I. Draft genome sequence of *Paraburkholderia tropica* Ppe8 strain, a sugarcane endophytic diazotrophic bacterium. *Braz J Microbiol*, v.49, p. 210-211, 2018.

SILVA, C. G. N. Uso da técnica de PCR em Tempo Real para quantificação das bactérias que compõem o inoculante para cana-de-açúcar. 103p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2017.

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

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. (Embrapa soja – Documento 350. ISSN 2176-2937). 2012.

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

STEPHAN, M.P., OLIVEIRA, M., TEIXEIRA, K.R.S., MARTINEZ-DRETS, G. AND DÖBEREINER, J.: Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 77, p. 67–72, 1991.

SUAREZ-MORENO Z. R.; CABALLERO-MELLADO, J.; COUTINHO, B. G. Common Features of Environmental and Potentially Beneficial Plant-Associated *Burkholderia*. **Microbial Ecology**, v. 63, p. 249–266. 2012.

SAWANA, A., ADEOLU, M. AND GUPTA, R.S. Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus *Burkholderia*: proposal for division of this genus into the emended genus *Burkholderia* containing pathogenic organisms and a new genus *Paraburkholderia* gen. nov. harboring environmental species. **Front. Genet.**, 5, 429, 2014.

TEJERA, N.; LLUCH, C.; MARTINEZ-TOLEDO, M. V.; GONZÁLEZ-LO PEZ, J. Isolation and characterization of *Azotobacter* and *Azospirillum* strains from the sugarcane rhizosphere. **Plant Soil**, v. 270, p.223–232. 2005.

TORRES, A. R.; KASCHUK, G.; SARIDAKIS, G. P.; HUNGRIA, M. Genetic variability in *Bradyrhizobium japonicum* strains nodulating soybean *Glycine max* (L.) Merrill. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 28, p. 1831-1835, 2012.

URQUIAGA, S.; XAVIER, R.; MORAIS, R. F.; BATISTA, R.; SCHULTZ, N.; LEITE, J. M.; RESENDE, A.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M. Evidence from field nitrogen balance and ¹⁵N natural abundance data of the contribution of biological N₂ fixation to Brazilian sugarcane varieties. **Plant Soil**, v. 356, p. 5-21. 2012.

VIAL, L.; CHAPALAIN, A.; GROLEAU, M. C. The various lifestyles of the *Burkholderia cepacia* complex species: a tribute to adaptation. **Environmental Microbiology**, v.13, p. 1-12, 2011.

YAMADA (Y.), HOSHINO (K.) and ISHIKAWA (T.): The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to generic level. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v.61, p. 1244-

1251, 1997.

ZAMPIERI, D. Cana-de-açúcar e Sucroalcooleiro – Prognóstico. SEAB – **Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento** DERAL - Departamento de Economia Rural. PR, 2013. Disponível em <http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/cana_2012_13.pdf> Acesso em 2017.

ZEHR, J. P.; JENKINS, B. D.; SHORT, S.M.; STEWARD, G. F. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: A cross-system comparison. **Environmental Microbiology**, v.5, p. 539-554, 2003.

ZULETA, L. F.; DE CUNHA, C.; DE CARVALHO, F. M. The complete genome of *Burkholderia phenoliruptrix* strain BR3459a, a symbiont of *Mimosa flocculosa*: highlighting the coexistence of symbiotic and pathogenic genes. **BMC Genomics**; 15: 535. 2014.

8. ANEXOS

8.1. Meios de Cultura

8.1.1 Dextrose Yeast Glucose Sucrose – DYGS (1 L)

- 2,0g de glicose
- 2,0g de ácido málico
- 1,5g de Peptona bacteriológica
- 2,0g de Extrato de levedura
- 0,5g de K_2HPO_4
- 0,5g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
- 1,5g de ácido glutâmico

O pH foi ajustado para 6,0 com solução de KOH a 10% e/ou solução de H_2SO_4 a 10%.

8.1.2 JMV (1 L)

- 5 g de Manitol
- 6 mL de Solução de Fosfato de Potássio Dibásico
- 18 mL de Solução de Fosfato de Potássio Monobásico
- 2 mL de Solução de Sulfato de Magnésio Hidratado
- 1 mL de Solução de Cloreto de Sódio
- 2 mL de Solução de Cloreto de Cálcio
- 2 mL de Solução de Azul de Bromotimol
- 2 mL de Solução de Micronutrientes para Meio de Cultura
- 4 mL de Solução de EDTA de Ferro
- 1 mL de Solução de Vitamina para Meio de Cultura

O pH foi ajustado para 4,2 – 4,5 usando H_2SO_4 a 5% e/ou KOH a 10%

- Adicionar agar, nas seguintes quantidades:
- 2,1 g por litro para meio semissólido (dissolver antes da distribuição)
- 25 g por litro de meio sólido, adicionar 100 mg de extrato de levedura

8.1.3. LGI-P

- 100,0 g de sacarose
- 0,2 g de K_2HPO_4
- 0,6 g de KH_2PO_4
- 0,2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
- 0,02 g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$
- 0,002 g de Na_2Mo_4
- 5,0 mL de azul de bromotimol
- 0,01g de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$
- 1 mL de solução de vitaminas
- 0,02g de extrato de levedura
- 25 g de ágar

O pH foi ajustado para 5,5 com solução de KOH a 10% e/ou solução de H_2SO_4 a 10%.

8.2. Meio Modificado com Sacarose MMS

- 10g de sacarose
- 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.