

Biopolímeros na conservação de células de rizobactérias em meios de cultura alternativos

Biopolymers in the conservation of rizobacteria cells in alternative culture media

Biopolímeros en la conservación de células de rizobacterias en medios de cultivo alternativos

Recebido: 28/02/2022 | Revisado: 08/03/2022 | Aceito: 12/03/2022 | Publicado: 20/03/2022

Manuella Costa Souza

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4697-6178>
Universidade Federal do Tocantins, Brasil
E-mail: manuella8_gpi@hotmail.com

Celso Afonso Lima

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9684-0682>
Universidade Federal do Tocantins, Brasil
E-mail: celsoa.lima@hotmail.com

Dalilla Moreira de Oliveira Moura

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7559-809X>
Universidade Federal do Tocantins, Brasil
E-mail: dalilla.moreira@mail.uft.edu.br

Silmara Moraes de Sousa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3821-8553>
Universidade Federal do Tocantins, Brasil
E-mail: sousasilmaramoraes@outlook.com

Ana Licia Leão Ferreira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9871-9819>
Universidade Federal do Tocantins, Brasil
E-mail: licia.leao@mail.uft.edu.br

Aloisio Freitas Chagas Junior

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7489-8701>
Universidade Federal do Tocantins, Brasil
E-mail: chagasjraf@uft.edu.br*

Resumo

Os inoculantes são formulados com microrganismos de ação benéfica para plantas numa composição simples e acessível. Eles necessitam de um transportador de qualidade que garanta a concentração de células ativas, além de tolerar variações de temperatura, umidade, aeração e tempo de armazenamento sem que apresente altos níveis de contaminantes, tornando necessário o uso de conservantes. Polímeros como carboximetilcelulose (CMC) e goma xantana (GX) têm sido usados para a fabricação de inoculantes relacionado à sua capacidade de limitar a transferência de calor, e às suas propriedades reológicas, que é a medida da viscosidade e tensão de escoamento. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência destes biopolímeros na preservação de células de *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium diazoefficiens* e *Azospirillum* sp. em meios de cultura alternativos com 7, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180 e 210 dias a 5 °C. Os inoculantes foram avaliados por 210 dias, aferindo o pH e realizando contagem de UFC mL⁻¹ a partir do plaqueamento pela técnica *Spread Plate*. Foi possível concluir que a utilização dos biopolímeros foi eficiente na conservação e viabilidade de células dos microrganismos durante o período de armazenamento, sendo o meio de cultura MS2 o que obteve melhor resultado em UFC mL⁻¹, obtendo aos 210 dias 3,0 x10⁸ UFC mL⁻¹ com a utilização de CMC e 1,4 x10⁸ UFC mL⁻¹ com GX para *B. elkanii*, 1,3 x10⁷ UFC mL⁻¹ com CMC e 6,0 x10⁶ UFC mL⁻¹ com GX para *B. diazoefficiens*, 8,5 x10⁸ UFC mL⁻¹ com GX para *Azospirillum* sp.

Palavras-chave: Inoculante; Microrganismo; Conservante.

Abstract

The inoculants are formulated with microorganisms of beneficial action for plants in a simple and accessible composition. They need a quality carrier that guarantees the concentration of active cells, in addition to tolerating variations in temperature, humidity, aeration and storage time without presenting high levels of contaminants, making it necessary to use preservatives. Polymers such as carboxymethylcellulose (CMC) and xanthan gum (XG) have been used for the manufacture of inoculants related to their ability to limit heat transfer, and to their rheological properties, which is the measure of the viscosity and flow strain. Thus, the objective of this work was to evaluate the efficiency of these biopolymers in the preservation of *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium diazoefficiens* and *Azospirillum* sp. in alternative culture media with 7, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180 and 210 days at 5 °C. The inoculants were

evaluated at 210 days, checking the pH and counting CFU mL⁻¹ from the plating using the *Spread Plate* technique. It was concluded that the use of biopolymers was efficient in the conservation and viability of microorganism cells during the storage period, being the culture medium MS2 that obtained the best results in UFC mL⁻¹, obtaining at 210 days 3.0 x10⁸ CFU mL⁻¹ with use of CMC e 1.4 x10⁸ CFU mL⁻¹ with XG for *B. elkanii*, 1.3 x10⁷ CFU mL⁻¹ with CMC, and 6.0 x10⁶ CFU mL⁻¹ with XG for *B. diazoefficiens*, 8.5 x10⁸ CFU mL⁻¹ with XG for *Azospirillum* sp.

Keywords: Inoculant; Microorganism; Preservative.

Resumen

Los inoculantes están formulados con microorganismos de acción beneficiosa para las plantas en una composición sencilla y accesible. Necesitan un portador de calidad que garantice la concentración de células activas, además de tolerar variaciones de temperatura, humedad, aireación y tiempo de almacenamiento sin presentar altos niveles de contaminantes, siendo necesario el uso de conservantes. Se han utilizado polímeros como la carboximetilcelulosa (CMC) y la goma xantana (GX) para fabricar inoculantes relacionados con su capacidad para limitar la transferencia de calor y con sus propiedades reológicas, que es una medida de la viscosidad y el límite elástico. Así, el objetivo de este trabajo fue evaluar la eficiencia de estos biopolímeros en la conservación de células de *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium diazoefficiens* y *Azospirillum* sp. en medios de cultivo alternativos con 7, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180 y 210 días a 5 °C. Los inoculantes se evaluaron durante 210 días, midiendo el pH y contando las UFC mL⁻¹ del sembrado mediante la técnica de *Spread Plate*. Se pudo concluir que el uso de biopolímeros fue eficiente en la conservación y viabilidad de las células de los microorganismos durante el periodo de almacenamiento, siendo el medio de cultivo MS2 el que obtuvo mejores resultados en UFC mL⁻¹, obteniendo a los 210 días 3.0 x10⁸ UFC mL⁻¹ usando CMC y 1.4 x10⁸ CFU mL⁻¹ con GX para *B. elkanii*, 1.3 x10⁷ CFU mL⁻¹ con CMC y 6.0 x10⁶ CFU mL⁻¹ con GX para *B. diazoefficiens*, 8.5 x10⁸ CFU mL⁻¹ con GX para *Azospirillum* sp.

Palabras clave: Inoculante; Microorganismo; Preservativo.

1. Introdução

A produção de inoculantes no Brasil vem sendo desenvolvida desde a década de 1950, onde inicialmente optou-se por utilizar a turfa como veículo de transporte para microorganismos, sendo utilizado até o presente, porém busca-se alternativas para substituição desta, visando ser um recurso natural pouco frequente, principalmente no Brasil (Castro e Araújo, 2018).

A fim de reduzir o uso de fertilizantes nitrogenados, as bactérias do gênero *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* são utilizadas como fornecedoras de nitrogênio, pois promovem a fixação do nitrogênio atmosférico para diversas espécies de plantas, e são capazes de produzir compostos promotores de crescimento (Fachinelli, 2018). As chamadas rizobactérias são promotoras de crescimento em plantas, atuam diretamente na supressão de doenças, na produção de fitormônios, solubilização de nutrientes do solo, aumento da permeabilidade das raízes e fixação de nitrogênio (Moncada et al., 2021). São bactérias gram-negativas capazes de criar uma relação simbiótica de fixação de nitrogênio nas raízes de leguminosas, garantindo o desenvolvimento na ausência de fertilizante nitrogenado, além de diminuir as taxas de óxido nitroso (N₂O) no solo (Ramongolalaina, 2020).

Dentre as características que um inoculante deve apresentar, as mais desejáveis e importantes são a garantia de que o produto vá promover o crescimento microbiano, de que as células vão continuar viáveis durante todo o período de armazenamento e garantir que a população de microorganismos presentes no produto esteja apta a serem liberadas para associar-se às plantas e desempenharem sua função (Bashan et al., 2014).

O grande desafio da produção de inoculantes é ajustar as formulações para que tenha em campo o mesmo desempenho que no laboratório, garantindo a longevidade e estabilidade do microorganismo, com a capacidade de mantê-los viáveis após meses de armazenagem, sem a presença de contaminantes e mutações (Barreto, 2008; Silva et al., 2013). Há poucos estudos realizados na área de conservantes para inoculantes agrícolas, porém alguns autores apostam no uso de polímeros utilizados na indústria alimentícia e farmacêutica, como por exemplo o uso de amido e carboximetilcelulose (CMC) para avaliar o armazenamento de rizóbios (Fernandes Júnior et al., 2009).

Diversos tipos de polímeros como carboximetilcelulose, goma arábica, polivinilpirrolidona e alginato, têm sido usados para a fabricação de inoculantes relacionado à sua capacidade de limitar a transferência de calor, e às suas propriedades

reológicas, sendo normalmente utilizados como compostos adesivos quando aplicados em sementes, e protegendo contra dessecação durante a secagem à vácuo (Tittabutr et al., 2007; Silva et al., 2009).

Os biopolímeros podem ser utilizados na fabricação de inoculantes devido apresentarem características atóxicas para o microrganismo e para planta que receberá as células preservadas no solo, além de que a maioria dos biopolímeros tem capacidade de liberar as células bacterianas gradativamente, desde o momento da germinação das sementes, garantindo a presença do microrganismo benéfico na rizosfera para o desenvolvimento da planta (Bashan et al., 2014).

O polímero carboximetilcelulose é fisiologicamente inerte e atóxico, sendo muito aplicado em indústrias alimentícias e farmacêuticas em virtude de sua viscosidade (Sanz et al., 2005). Já para o uso em inoculantes, é devido sua propriedade adesiva que melhora a fixação em sementes de leguminosas, protegendo-as de bactérias nocivas durante o armazenamento, além de promover o encapsulamento das células prevenindo contra estresses ambientais (Reis e Alves, 2015).

Goma xantana é um biopolímero natural biodegradável, de baixo custo, capaz de promover o encapsulamento de células bacterianas e liberá-las no ambiente após a degradação do material no ambiente (Silva et al., 2009).

Neste estudo é abordado a utilização de carboximetilcelulose e goma xantana como conservante para inoculantes a base de *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium diazoefficiens* e *Azospirillum* sp. em diferentes meios de cultura, com o objetivo de manter a concentração adequada de células bacterianas por um longo período de prateleira.

2. Metodologia

Obtenção dos microrganismos

Os experimentos foram realizados no laboratório de Agromicrobiologia Aplicada e Biotecnologia, da Universidade Federal do Tocantins - Campus de Gurupi (PPGPV/UFT). As cepas dos microrganismos utilizados foram de *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium diazoefficiens* e *Azospirillum* sp., todas obtidas do banco de cepas do laboratório, armazenadas a 5 °C em tubos de conservação com meio de cultura, através do repique dos microrganismos em placas de Petri com meio de cultura CCY (0,0222 g L⁻¹ de L-glutamina, 1,0 g L⁻¹ de caseína hidrolisada, 1,0 g L⁻¹ de peptona, 0,4 g L⁻¹ de extrato de levedura, 0,6 L L⁻¹ de glicerina bi-destilada, 0,068 g L⁻¹ de ZnCl₂, 0,11 g L⁻¹ de MgCl₂, 0,0196 g L⁻¹ de MnCl₂, 0,0294 g L⁻¹ de CaCl₂, 0,0134 g L⁻¹ de FeCl₃, 0,0884 KH₂PO₄, 0,25 g L⁻¹ de K₂HPO₄) (Abbas et al., 2014), utilizando alça de inoculação estéril em cabine de fluxo laminar.

Formulação, preparo do meio de cultura e inoculação

Foram testados dois meios de cultura, MS1 e MS2, cuja formulação está especificada na tabela 1. Os meios foram formulados no intuito de utilizar reagentes menos onerosos a fim de tornar a formulação simples, porém com nutrientes necessários aos microrganismos. Os meios de cultura foram preparados em Erlenmeyer de 1 L, devidamente identificados, e o pH foi ajustado para 6,0. Em seguida esterilizou-se o meio de cultura em autoclave a 121 °C durante 30 minutos.

Após o meio de cultura atingir temperatura ambiente, os Erlenmeyer foram inoculados com os microrganismos transferindo as cepas com o auxílio de uma alça de inoculação estéril, em cabine de fluxo laminar. Logo após a inoculação os Erlenmeyer foram colocados em incubadora Shaker (Novatecnica®) a 28°C, e 120 rpm por 96 horas.

Tabela 1 - Composição do Meio de cultura MS1 e MS2

MS1	MS2
1000 mL H ₂ O (destilada)	1000 mL H ₂ O (destilada)
10 mL de melaço de soja	16 mL de melaço de soja
0,50 g de fosfato de potássio	4,0 g de extrato de levedura
5,0 g de sulfato de magnésio	
2,5 g de extrato de levedura	

Fonte: Autores.

Quantificação e controle de pH

Logo após a inoculação, retirou-se uma amostra de cada Erlenmeyer, aferiu-se o pH e realizou-se o plaqueamento por superfície pela técnica *Spread Plate* (Taylor et al., 1993) para a quantificação de microrganismo em unidades formadoras de colônia (UFC mL⁻¹) no tempo 0 h, nas diluições 10⁴, 10⁶ e 10⁸, e incubou-se as placas de Petri em estufa bacteriológica a 28 °C por 72 horas para que fosse possível fazer a contagem das colônias. O mesmo procedimento foi realizado com 24, 48, 72 e 96 h para controle da fermentação. O controle do pH foi realizado a partir das amostras retiradas em cada tempo de fermentação, a cada 24 horas, utilizando pHmetro digital (Hanna Instruments®).

Preparo e adição dos biopolímeros

As soluções conservantes foram preparadas adicionando 0,1 g do biopolímero em 100 mL de água destilada, e em seguida foi esterilizado a 121 °C por 30 minutos. Para cada meio de cultura, foi adicionado, após as 96 horas de fermentação, 15 mL da solução conservante em 150 mL de inóculo fermentado, fazendo a homogeneização, e depois transferindo para tubos de polipropileno do tipo Falcon de 15 mL, devidamente identificados, e armazenados em geladeira a 5 °C. Foram armazenados 10 tubos Falcon para cada tratamento, sendo um tratamento a testemunha sem o biopolímero, outro o inóculo com solução conservante de goma xantana, e inóculo com solução conservante de carboximetilcelulose.

Avaliação dos inoculantes em diferentes tempos de prateleira

Os tratamentos foram armazenados em geladeira a 5 °C, a fim de garantir melhor preservação do microrganismo, e foi retirado uma amostra a cada período de avaliação, sendo eles: 0, 7, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, e 210 dias. Para cada avaliação foi realizado o plaqueamento pela técnica *Spread Plate*, em meio de cultura CCY, nas diluições 10⁴, 10⁶ e 10⁸, em triplicatas, incubando as placas em estufa bacteriológica a 28 °C, por 72 horas para que fosse realizada a contagem das colônias. Também foi realizado a aferição do pH das amostras utilizando-se pHmetro digital (Hanna Instruments®). Os dados do experimento foram avaliados em fatorial duplo em delineamento inteiramente casualizado, sendo um fator o meio de cultura, e outro os biopolímeros.

Análise estatística

Os experimentos foram submetidos à análise de variância e teste de médias Tuckey a 5%, por meio do software estatístico Rstudio versão 1.3. Os gráficos foram confeccionados utilizando o software SigmaPlot versão 12.0.

3. Resultados e Discussão

Bradyrhizobium elkanii

Para a fermentação com *B. elkanii* foi possível observar que desde o início o microrganismo adaptou-se melhor ao meio de cultura MS2, visto que no tempo zero obteve $1,0 \times 10^{10}$ UFC mL⁻¹ no meio MS1, e $4,5 \times 10^{10}$ UFC mL⁻¹ no meio MS2 (Tabela 2), o que pode ser explicado devido a composição, que tornou o meio MS1 mais ácido, impossibilitando que o ambiente estivesse adequado para o metabolismo deste microrganismo, já que o pH ideal para *Bradyrhizobium* sp. é em torno de 6,8 a 7,0.

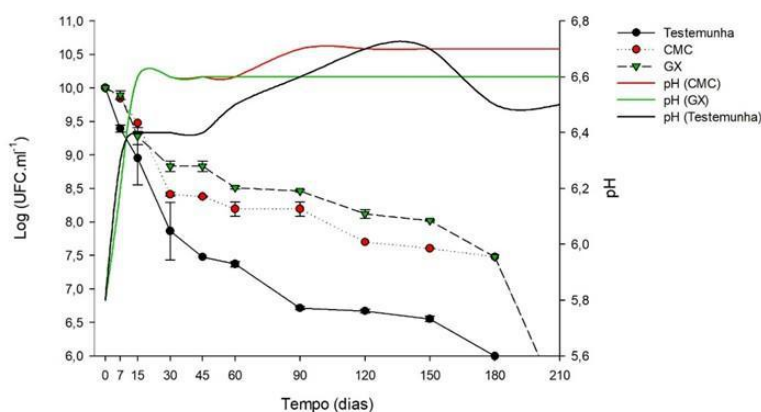
Nas Figuras 1 e 2 é possível observar que o pH das amostras aumentou, o que pode ser devido às características do microrganismo.

Tabela 2 - Influência da utilização de carboximetilcelulose (CMC) e goma xantana (GX) na preservação de células de *Bradyrhizobium elkanii* durante 210 dias de armazenamento a 5 °C ⁽¹⁾.

Unidades Formadora de Colônias (UFC mL ⁻¹)						
Meio de cultura						
MS1			MS2			
Tratamentos						
Tempo (dias)	testemunha	CMC	GX	testemunha	CMC	GX
0	$1,0 \times 10^{10}$ a	$1,0 \times 10^{10}$ a	$1,0 \times 10^{10}$ a	$4,5 \times 10^{10}$ a	$4,5 \times 10^{10}$ a	$4,5 \times 10^{10}$ a
7	$2,5 \times 10^9$ b	$7,0 \times 10^9$ a	$8,0 \times 10^9$ a	$2,3 \times 10^{10}$ a	$3,6 \times 10^{10}$ a	$3,7 \times 10^{10}$ a
15	$1,5 \times 10^9$ b	$3,0 \times 10^9$ a	$2,0 \times 10^9$ ab	$1,6 \times 10^{10}$ b	$1,9 \times 10^{10}$ ab	$2,5 \times 10^{10}$ a
30	$1,3 \times 10^8$ c	$2,6 \times 10^8$ b	$7,0 \times 10^8$ a	$7,0 \times 10^9$ b	$8,0 \times 10^9$ b	$2,5 \times 10^{10}$ a
45	$3,0 \times 10^7$ c	$2,4 \times 10^8$ b	$7,0 \times 10^8$ a	$1,8 \times 10^9$ c	$3,5 \times 10^9$ b	$1,4 \times 10^{10}$ a
60	$2,3 \times 10^7$ b	$1,6 \times 10^8$ a	$3,2 \times 10^8$ a	$5,3 \times 10^8$ b	$8,7 \times 10^8$ b	$1,2 \times 10^{10}$ a
90	$5,2 \times 10^6$ b	$1,6 \times 10^8$ a	$2,9 \times 10^8$ a	$2,7 \times 10^8$ b	$8,0 \times 10^8$ a	$1,0 \times 10^9$ a
120	$4,7 \times 10^6$ c	$5,0 \times 10^7$ b	$1,3 \times 10^8$ a	$2,1 \times 10^8$ b	$5,2 \times 10^8$ a	$8,4 \times 10^8$ a
150	$3,6 \times 10^6$ c	$4,0 \times 10^7$ b	$1,0 \times 10^8$ a	$1,7 \times 10^8$ b	$4,6 \times 10^8$ a	$5,5 \times 10^8$ a
180	$1,0 \times 10^6$ b	$3,0 \times 10^7$ a	$3,0 \times 10^7$ a	$1,5 \times 10^8$ b	$3,7 \times 10^8$ a	$2,0 \times 10^8$ ab
210	$0,0 \times 10^9$ b	$2,0 \times 10^5$ a	$2,0 \times 10^5$ a	$3,0 \times 10^7$ c	$3,0 \times 10^8$ a	$1,4 \times 10^8$ b
CV(%) ⁽²⁾		2,45			1,53	

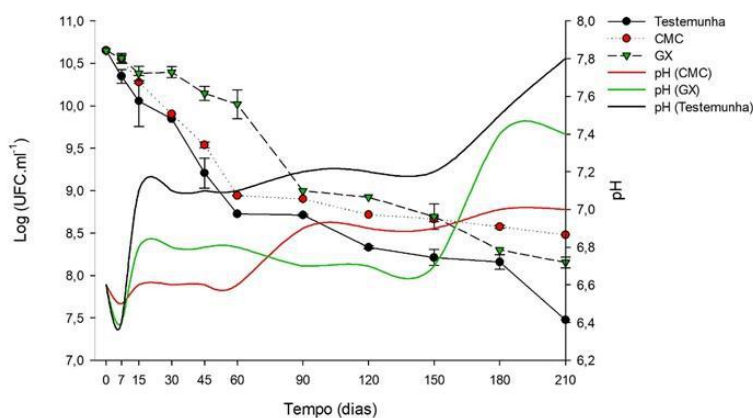
⁽¹⁾ Médias seguidas de mesma letra minúscula, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. ⁽²⁾ CV: Coeficiente de Variação. Fonte: Autores.

Figura 1 - Relação da sobrevivência (UFC mL⁻¹) e o potencial hidrogeniônico (pH) de *Bradyrhizobium elkanii*, no meio MS1 durante 210 dias de conservação a 5 °C.



Fontes: Autores.

Figura 2 - Relação da sobrevivência (UFC mL⁻¹) e o potencial hidrogeniônico (pH) de *Bradyrhizobium elkanii*, no meio MS2 durante 210 dias de conservação a 5 °C.



Fontes: Autores.

Bradyrhizobium diazoefficiens

Para a fermentação com *B. diazoefficiens* foi possível observar que o microrganismo se adaptou bem nos dois meios de cultura, visto que ambos apresentaram 1,0x10¹⁰ UFC mL⁻¹ inicialmente (Tabela 3), diferindo pouco o valor do pH inicial, que para o meio MS1 foi de 7,0 e 7,3 para o MS2.

Tabela 3 - Influência da utilização de carboximetilcelulose (CMC) e goma xantana (GX) na preservação de células de *Bradyrhizobium diazoefficiens* durante 210 dias de armazenamento a 5 °C ⁽¹⁾

Unidades Formadora de Colônias (UFC mL ⁻¹)						
Meio de cultura						
MS1			MS2			
Tratamentos						
Tempo (dias)	testemunha	CMC	GX	testemunha	CMC	GX
0	1,0x10 ¹⁰ a	1,0x10 ¹⁰ a	1,0x10 ¹⁰ a	1,0x10 ¹⁰ a	1,0x10 ¹⁰ a	1,0x10 ¹⁰ a
7	2,0x10 ⁹ a	3,5x10 ⁹ a	3,5x10 ⁹ a	6,0x10 ⁹ a	7,5x10 ⁹ a	8,0x10 ⁹ a
15	1,0x10 ⁹ b	2,5x10 ⁹ ab	3,0x10 ⁹ a	2,5x10 ⁹ b	5,0x10 ⁹ ab	6,5x10 ⁹ a
30	2,9x10 ⁸ b	1,0x10 ⁹ a	1,0x10 ⁹ a	5,9x10 ⁸ b	1,1x10 ⁹ b	5,5x10 ⁹ a
45	2,5x10 ⁸ b	5,8x10 ⁸ ab	1,1x10 ⁹ a	2,2x10 ⁸ b	3,5x10 ⁸ b	1,0x10 ⁹ a
60	6,0x10 ⁷ b	2,1x10 ⁸ a	3,9x10 ⁸ a	2,0x10 ⁸ a	2,5x10 ⁸ a	4,0x10 ⁸ a
90	2,5x10 ⁷ b	1,2x10 ⁸ a	1,5x10 ⁸ a	1,0x10 ⁸ b	2,3x10 ⁸ a	2,4x10 ⁸ a
120	9,8x10 ⁶ b	7,0x10 ⁷ a	1,5x10 ⁸ a	5,0x10 ⁷ b	2,0x10 ⁸ a	2,0x10 ⁸ a
150	7,0x10 ⁶ a	9,3x10 ⁶ a	1,5x10 ⁷ a	4,0x10 ⁷ a	6,5x10 ⁷ a	7,0x10 ⁷ a
180	9,0x10 ⁵ c	3,4x10 ⁶ b	1,0x10 ⁷ a	1,0x10 ⁷ a	1,5x10 ⁷ a	1,5x10 ⁷ a
210	6,0x10 ⁵ c	7,0x10 ⁵ b	1,4x10 ⁶ a	2,3x10 ⁶ c	1,3x10 ⁷ a	6,0x10 ⁶ b
CV (%) ⁽²⁾	2,07			1,84		

⁽¹⁾ Médias seguidas de mesma letra minúscula, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. ⁽²⁾ CV: Coeficiente de Variação. Fonte: Autores

Nas figuras 3 e 4 é possível observar o comportamento do microrganismo em relação ao pH do meio de cultura e ao tempo, que diminui a quantidade de células ao longo dos 210 dias, porém os resultados dos tratamentos com conservantes foram superiores à testemunha sem conservante.

Figura 3 - Relação da sobrevivência (UFC mL⁻¹) e o potencial hidrogeniônico (pH) de *Bradyrhizobium diazoefficiens*, no meio MS1 durante 210 dias de conservação a 5 °C.

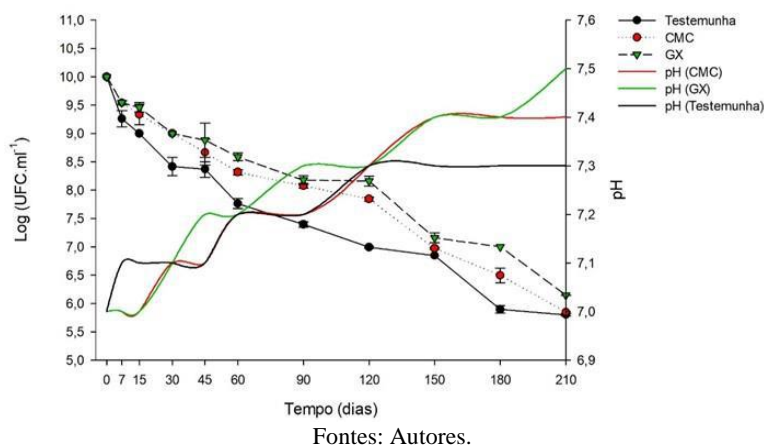
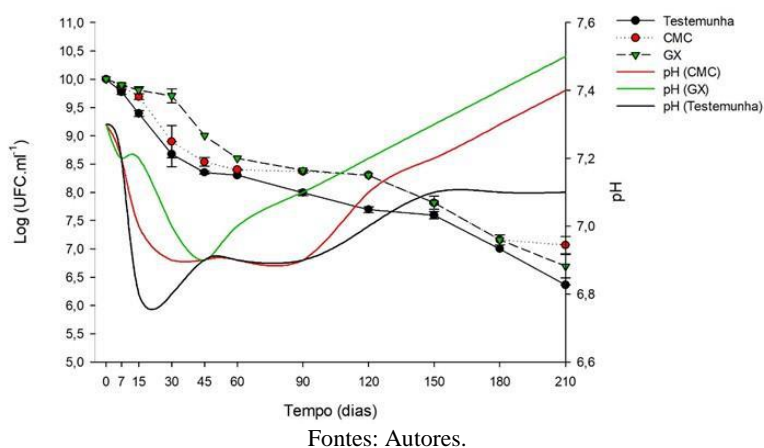


Figura 4 - Relação da sobrevivência (UFC mL⁻¹) e o potencial hidrogeniônico (pH) de *Bradyrhizobium diazoefficiens*, no meio MS2 durante 210 dias de conservação a 5 °C.



***Azospirillum* sp.**

A fermentação com *Azospirillum* sp. foi realizada utilizando os meios de cultura MS1 e MS2, porém o microrganismo não se adaptou bem ao meio MS1 e foi constatado a morte celular 24 horas após o início do cultivo, mas já em relação ao meio MS2, este foi eficaz no processo fermentativo, visto que alcançou $1,1 \times 10^{10}$ em 96 horas de fermentação, com pH em torno de 6,5, muito próximo do pH ideal para este microrganismo, que seria de 6,8 (Romero-Perdomo et al., 2015).

Na tabela 4, é possível observar comportamento do *Azospirillum* sp. durante o período de prateleira com a adição dos biopolímeros, e perceber a influência destes na manutenção das células viáveis.

Conforme visto na tabela, a partir de 15 dias de armazenamento houve diferença estatística entre os tratamentos, e a UFC mL⁻¹ apresentou melhores valores com a presença dos biopolímeros, dando destaque para a goma xantana, a qual obteve melhor resultado tanto ao longo do período de armazenamento como com 210 dias.

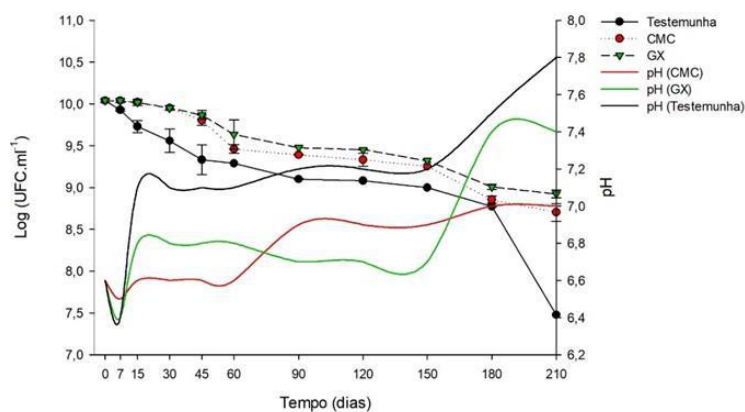
Na figura 5 está representado o comportamento do inoculante a base de *Azospirillum* armazenado durante 210 dias e sua relação com o pH do meio, podendo afirmar que entre 15 e 150 dias o pH se manteve dentro da faixa ideal para o microrganismo, que deve estar ajustado em torno de 7 (Contreras-Angulo et al., 2019).

Tabela 4 - Influência da utilização de carboximetilcelulose (CMC) e goma xantana (GX) na preservação de células de *Azospirillum* sp. durante 210 dias de armazenamento a 5 °C ⁽¹⁾ no meio de cultura MS1.

Unidades Formadora de Colônias (UFC mL ⁻¹)			
Tratamentos			
Tempo (dias)	testemunha	CMC	GX
0	1,1x10 ¹⁰ a	1,1x10 ¹⁰ a	1,1x10 ¹⁰ a
7	8,5x10 ⁹ a	1,1x10 ¹⁰ a	1,1x10 ¹⁰ a
15	5,5x10 ⁹ b	1,0x10 ¹⁰ a	1,0x10 ¹⁰ a
30	4,0x10 ⁹ b	9,0x10 ⁹ a	9,0x10 ⁹ a
45	2,5x10 ⁹ b	6,5x10 ⁹ a	7,5x10 ⁹ a
60	1,0x10 ⁹ c	2,5x10 ⁹ b	5,0x10 ⁹ a
90	1,9x10 ⁹ a	2,9x10 ⁹ a	3,0x10 ⁹ a
120	1,2x10 ⁹ b	2,2x10 ⁹ a	2,8x10 ⁹ a
150	1,0x10 ⁹ b	1,8x10 ⁹ a	2,1x10 ⁹ a
180	5,9x10 ⁸ b	7,2x10 ⁸ ab	1,0x10 ⁹ a
210	3,0x10 ⁷ c	5,3x10 ⁸ b	8,5x10 ⁸ a
CV (%) ⁽²⁾		1,12	

⁽¹⁾ Médias seguidas de mesma letra minúscula, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. ⁽²⁾ CV: Coeficiente de Variação. Fonte: Autores.

Figura 5 - Relação da sobrevivência (UFC mL⁻¹) e o potencial hidrogeniônico (pH) de *Azospirillum* sp., no meio MS2 durante 210 dias de conservação a 5 °C.



Fontes: Autores.

Um método de preservação ideal deve ser simples, barato, e não demandar equipamento sofisticado, complementando o que diz alguns autores (Souza et al., 2016), que cada microrganismo deveria ter seu próprio método de conservação já que cada um se comporta de uma determinada maneira quando exposto a diferentes condições.

Para que ocorra a multiplicação de um microrganismo para a produção de inoculante é necessário realizar processos fermentativos utilizando um meio de cultura adequado para o metabolismo do microrganismo de interesse (Voss, 2013). Com isso, a utilização do melão de soja é uma alternativa devido à redução de custos com matéria prima já que este composto é rico em açúcares, nitrogênio e outros macronutrientes (Woiciechowski et al., 2013).

De acordo com análise realizada, o melão de soja utilizado é composto por diversos nutrientes nas seguintes proporções: 50 g kg⁻¹ de proteína bruta, 26 g kg⁻¹ de frutose, 199 g kg⁻¹ de sacarose, 50 g kg⁻¹ de rafinose, 119 g kg⁻¹ de estaquiase, 6 g kg⁻¹ de glicose, 100 mg kg⁻¹ de cálcio, 4150 mg kg⁻¹ de fósforo, 400 mg kg⁻¹ de sódio, 1300 mg kg⁻¹ de

magnésio, 25400 mg kg⁻¹ de potássio e 500 mg kg⁻¹ de enxofre, e esta composição foi o que garantiu a multiplicação dos microrganismos no meio de cultura, que juntamente com o extrato de levedura, o qual é composto de vitaminas, especialmente complexos B, e aminoácidos, supriu todas as necessidades metabólicas do *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*, os quais conseguem metabolizar diversas fontes de carbono, que ocorre através das vias metabólicas do ciclo do ácido cítrico (Sousa, 2011).

Na fermentação do *B. elkanii* a utilização dos biopolímeros carboximetilcelulose (CMC) e goma xantana (GX) garantiram maior número de UFC mL⁻¹ durante os 210 dias de armazenamento em relação ao tratamento sem conservante, para os dois meios de cultura testados.

Na tabela 2 é possível observar que a partir do sétimo dia de conservação as médias dos tratamentos com conservante foram superiores nas avaliações no meio MS1. Para a fermentação no meio MS2, houve diferença estatística a partir dos 15 dias de armazenamento, sendo que desta data até 60 dias, os tratamentos com GX apresentaram maior número de unidades formadoras de colônias, e a partir dos 90 dias até o último dia de avaliação, os tratamentos com GX e CMC foram estatisticamente iguais, e superiores à testemunha.

De acordo com o Ministério da Agricultura, a concentração mínima em inoculantes deve ser de 10⁸ unidades formadoras de colônia, entretanto, conforme a “INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 13”, de 24 de março de 2011, os inoculantes para leguminosas devem conter pelo menos 1,0x10⁹ UFC por grama ou mililitro (Mapa, 2011), tornando o meio MS2 com adição de conservante a melhor opção, visto que alcançou valores mais próximos ao recomendado.

Goma xantana já foi testada por alguns pesquisadores com o objetivo de avaliar preservação das bactérias *Ralstonia solanacearum* e *Pectobacterium atrosepticum* por um longo período em diferentes formas de armazenamento, sendo em temperatura ambiente, refrigerador e freezer, e em todas as condições houve decréscimo na concentração de células viáveis (Tumelero e Denardin, 2011).

A fonte de açúcar empregada no processo fermentativo pode interferir na variação de pH, e pelo que foi observado nas figuras 1 e 2, a utilização do melão como fonte de açúcar pode ter causado um tamponamento do meio, o que garantiu que o pH ficasse dentro da faixa ideal para o crescimento do *B. elkanii* até por volta de 170 dias. Segundo Lima et al. (2012) espécies de *Azorhizobium* e *Bradyrhizobium* tem a tendência de alcalinizar o meio de cultura, enquanto *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium* tendem a acidificar o meio. A diferença da UFC inicial do meio MS1 pode ser devido ao pH do meio ter iniciado um pouco mais ácido, e segundo alguns autores, os microrganismos simbióticos fixadores de nitrogênio são sensíveis à pH ácido, o que pode limitar o crescimento (Perez-Galdonaf e Kahn, 1994).

Dentre os polímeros analisados por Denardin e Freire (2000) está a goma xantana, que foi empregada no intuito de acondicionar células de *B. elkanii* durante oito meses, porém também se constatou o decréscimo da concentração de células viáveis. A preservação de *B. elkanii* e *B. diazoefficiens* foi avaliada também por outro autor, o qual alega que biopolímeros como goma xantana, goma jataí e goma guar, podem ser empregados como base para formulação de inoculantes (Schuh, 2005). Para a produção do inoculante a base de *B. diazoefficiens*, a utilização dos biopolímeros carboximetilcelulose (CMC) e goma xantana (GX) garantiram maior número de UFC mL⁻¹ durante os 210 dias de armazenamento em relação ao tratamento sem conservante, para os dois meios de cultura testados.

Observando a tabela 3, é possível concluir que para o meio MS1, os tratamentos com conservantes garantiram maior número de colônias a partir do décimo quinto dia de armazenamento, e nas duas últimas avaliações, 180 e 210 dias, os valores de UFC mL⁻¹ foram respectivamente melhores no tratamento com goma xantana. Já para a fermentação no meio MS2, apesar de ter apresentado diferença estatística entre quinze e quarenta e cinco dias, onde o tratamento com goma xantana foi melhor, nas avaliações de 60, 150 e 180 dias, não diferiram estatisticamente, porém com 210 dias o tratamento com carboximetilcelulose foi o melhor, seguido do tratamento com goma xantana que também foi superior à testemunha.

De acordo com alguns pesquisadores, inoculantes líquidos com aditivos poliméricos foram capazes de colaborar na sobrevivência de inoculantes rizobiais por até sessenta dias em temperatura ambiente e a 4 °C, enfatizando que a sobrevivência celular depende tanto do tipo de aditivo quanto do microrganismo utilizado (Mohamed et al., 2019). Para sobrevivência de *Rhizobium leguminosarum* em diferentes materiais transportadores testados numa pesquisa, foi constatado que a população diminuiu gradativamente em todos os testes nos 180 dias de armazenamento (Argal et al., 2015).

Na figura 3 é possível observar que entre trinta e sessenta dias a quantidade de UFC mL⁻¹ teve redução no declínio de células, e pode ser relacionado com os valores de pH, que ficaram 6,8 e 7,1, e segundo alguns autores, estirpes de *Bradyrhizobium* spp. têm crescimento melhor em pH mais básico a neutro do que ácido, explicando a manutenção da viabilidade das colônias no meio MS2 com CMC e GX (Oliveira e Magalhães, 1999). Num estudo a respeito da sobrevivência de células de *B. japonicum*, armazenado por três meses a temperatura ambiente, adicionadas a misturas poliméricas de carboximetilcelulose e amido, em diferentes proporções, e concluiu-se que a utilização destes polímeros contribuiu para a sobrevivência do microrganismo apresentando excelentes resultados, alcançando 8,64 log de células mL⁻¹ utilizando a proporção 50/50 g L⁻¹ de cada biopolímero (Rohr, 2007).

Nas figuras 1, 2, 3, e 4 é possível observar a relação de aumento do pH em todos os tratamentos, com a queda no número de colônias, e como o pH ótimo para *Bradyrhizobium* é 6,8 ± 02 (Somasegaran e Hoben, 1994) em pH de valores superiores a 7 ocorre a diminuição da taxa de crescimento bacteriano, que se deve ao fato da presença de produtos de degradação de proteínas alcalinas durante o metabolismo, que modificam o estado de ionização das moléculas de nutrientes, diminuindo a disponibilidade para o microrganismo (Prescott et al., 2002). Já para a produção do inoculante com *Azospirillum* sp., apesar de existirem muitos meios de cultura para este microrganismo, a maioria deles não é considerada vantajosa devido a baixa quantidade de células e aos altos custos de produção, sendo então vantajoso a produção com meio de cultura MS2 (Bashan e De-Bashan, 2015).

Alguns autores sugerem que um bom inoculante deva conter entre 10⁸ e 10⁹ UFC mL⁻¹, enquanto outros afirmam ser necessário apenas valores entre 10⁶ e 10⁷ UFC mL⁻¹, e com isso pode ser considerado que o inoculante produzido com meio de cultura MS2 adicionado de carboximetilcelulose ou goma xantana seja um produto eficiente para ser comercializado, visto que a matéria prima utilizada para a formulação do meio de cultura não é onerosa e os resultados de UFC mL⁻¹ conseguiram alcançar 10⁸ mesmo após 210 dias de armazenamento (García-Fraile et al., 2015).

Já foi verificado por alguns autores a sobrevivência de *Azospirillum lipoferum* utilizando o encapsulamento de células com alginato de sódio aditivado com ácido húmico, porém esta é uma alternativa dispendiosa em relação à adição dos biopolímeros diretamente no inoculante (Reetha et al., 2014). Outro fator relacionado ao período de armazenamento é a baixa oxigenação, uma vez que o recipiente fica fechado durante todo o período, e isso pode não ter prejudicado o *Azospirillum* sp., pois são microrganismos microaerófilos, e a concentração ideal de oxigênio para o *A. brasiliense* é em torno de 4 µM (Alexandre et al., 2000).

Logo, com os dados apresentados, é possível afirmar que a utilização de biopolímeros como goma xantana (GX) e carboximetilcelulose (CMC) foi eficiente na conservação e viabilidade de células de *B. elkanii*, *B. diazoefficiens* e *Azospirillum* sp. durante 210 dias de armazenamento a 5 °C, e que o meio de cultura MS2 composto por melaço de soja e extrato de levedura foi mais eficiente do que o meio MS1 na manutenção de UFC mL⁻¹.

4. Conclusão

A utilização de biopolímeros como goma xantana (GX) e carboximetilcelulose (CMC) foi eficiente na conservação e viabilidade de células de *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium diazoefficiens* e *Azospirillum* sp. durante 210 dias de armazenamento a 5 °C.

Trabalhos futuros são necessários para avaliação de destes conservantes para produtos biológicos conservados em ambientes não refrigerados.

Referências

- Abbas, A. A., Planchon, S., Jobin, M. & Schmitt, P. (2014). A new chemically defined medium for the growth and sporulation of *Bacillus cereus* strains in anaerobiosis. *J. Microbiol. Methods.*, 105 (1), 54-58. doi: 10.1016/j.mimet.2014.07.006
- Alexandre G, Greer S. E. & Zhulin, I. B. (2000). Energy taxis is the dominant behavior in *Azospirillum brasilense*. *J. Bacteriol.*, 182 (1), 6042-6048. doi: 10.1128/jb.182.21.6042-6048.2000
- Argal, M. S., Rawat, A. K., Aher, S. B. & Rajput, P. S. (2015). Bioefficacy and shelf life of *Rhizobium leguminosarum* loaded on different carriers. *Appl. Biol. Res.*, 17 (2), 1-7. doi: 10.5958/0974-4517.2015.00017.8
- Barreto, M. C. S. (2008). *Inovação tecnológica baseada na produção de biopolímero com viabilidade para inoculanterizobiano*. Recife (PE): Universidade Federal de Pernambuco.
- Bashan, Y., Bashan, L. E., Prabhu, S. R. & Hernandez, J. P. (2014). Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998-2013). *Plant soil*, 378, 1-33. doi: 10.1007/s11104-013-1956-x
- Bashan, Y. & De-Bashan, L. E. (2015). Inoculant Preparation and Formulations for *Azospirillum* spp. In: Cassán F, Okon Y, Creus C, ed. *Handbook for Azospirillum*. 1st ed. Switzerland: Springer. 469-485.
- Castro, J. R. P. & Araujo, S. (2018). Evolução tecnológica da indústria de inoculantes. <http://bibliotecadigital.fgv.br/ojs/index.php/agroanalysis/issue/view/4303>
- Contreras-Ângulo, J. R., Mata, T. M., Cuellar-Bermudez, S. P., Caetano, N. S., Chandra, R. & Garcia-Perez, J. S. (2019). Symbiotic co-culture of *Scenedesmus* sp. and *Azospirillum brasilense* on N-deficient media with biomass production for biofuels. *Sustainability*, 11 (3), 707. doi: 10.3390/su11030707
- Denardin, N. D. & Freire, J. R. J. (2000). Assessment of polymers for the formulation of legume inoculants. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 16 (3), 215-217. doi: 10.1023/A:1008914223467
- Fachinelli R. (2018). Influência da inoculação com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* na cultura da soja. Universidade Federal da Grande Dourados.
- Fernandes Júnior, P. I., Rohr, T. G., Oliveira, P. J. D., Xavier, G. R. & Rumjanek, N. G. (2009). Polymers as carriers for rhizobial inoculant formulations. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 44 (9), 1184-1190. doi: 10.1590/S0100-204X2009000900017
- García-Fraile, P., Menéndez, E. & Rivas, R. (2015). Role of bacterial biofertilizers in agriculture and forestry. *AIMS Bioeng.*, 2 (3), 183-205. doi: 10.3934/bioeng.2015.3.183
- Lima, A. A., Fernandes Júnior, P. I., Passos, S. R., Paulo, F. S., Nosoline, S. M. & Faria, S. M. (2012). Diversidade e capacidade simbiótica de rizóbios isolados de nódulos de *Mucuna-Cinza* e *Mucuna-Anã*. *Rev. Bras. Cienc. Solo*, 36 (2), 337-348. doi: 10.1590/S0100-06832012000200003
- Mapa. (2011). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 13, de 24 de março de 2011. Diário Oficial da União 25 mar 2011; Seção 1.
- Mohamed, S. S., Hassan, M. A. & Abdelgani, M. E. (2019). The shelf life of Rhizobial liquid inoculants amended with different polymeric additives. *Aust. J. Basic & Appl. Sci.*, 13 (11), 28-36. doi: 10.22587/ajbas.2019.13.11.4
- Moncada, A., Miceli, A. & Vetrano, F. (2021). Use of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and organic fertilization for soilless cultivation of basil. *Sci. Hortic.*, 275 (1), 109733. doi: 10.1016/j.scienta.2020.109733
- Oliveira, L. A. & Magalhães HP. (1999). Quantitative evaluation of acidity tolerance of root nodule bacteria. *Rev. Microbiol.*, 30(1), 203-208. doi: 10.1590/S0001-37141999000300004
- Perez-Galdonaf, R. & Kahn, M. L. (1994). Effects of organic acids and low pH on *Rhizobium meliloti* 104A14. *Microbiol.*, 140 (5), 1231-1235.
- Prescott, L. M., Harley, J. P. & Klein, D. A. (2002). *Microbiology: Food and Industrial Microbiology*. Boston: McGraw-Hill, 2002.
- Ramongolalaina, C. (2020). Dual-luciferase assay and siRNA silencing for nodD1 to study the competitiveness of *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110 in soybean nodulation. *Microbiol Res.*, 237 (1), 126488. doi: 10.1016/j.micres.2020.126488
- Rohr, T. G. (2007). Estudo reológico da mistura carboximetilcelulose/amido e sua utilização como veículo de inoculação bacteriano. Seropédica (RJ): Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- Silva, C. R. R., Junior, M. A. L., Figueiredo, M. V.B., Stamford, N. P. & Alves, G. (2013). Feasibility of rhizobia conservation by liquid conditioners. *Rev Ciênc Agron.*, 44 (4), 661-668.
- Tittabutr, P., Payakapong, W., Teaumroong, N., Singleton, P. W. & Boonkerd, N. (2007). Growth, survival and field Performance of Bradyrhizobial liquid inoculant formulations with polymeric additives. *Sci. Asia.*, 33 (1), 69-77. doi: 10.2306/scienceasia1513-1874.2007.33.069
- Silva, M. F., Oliveira, P. J., Xavier, G. R., Rumjanek, N.G. & Reis, V. M. (2009). Inoculantes formulados com polímeros e bactérias endofíticas para a cultura da cana-de-açúcar. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 44 (1), 1437-1443. doi: 10.1590/S0100-204X2009001100010

- Sanz, T., Fernández, M. A., Salvador, A., Munoz, J. & Fiszman, S. M. (2005). Thermogelation properties of methylcellulose (MC) and their effect on a batter formula. *Food Hydrocoll.*, 19 (1), 141-147. doi: 10.1016/j.foodhyd.2004.04.023
- Reis, V. M. & Alves, G. C. (2015). Inoculantes contendo bactérias fixadoras de nitrogênio para aplicação na cultura do milho. In: Kuhn, O. J. et al, editores. Ciências Agrárias: Tecnologias e Perspectivas. Marechal Cândido Rondon: Unioeste. p. 82-97.
- Reetha, D., Kumaresan, G. & John Milton, D. (2014). Studies to improve the shelf life of *Azospirillum lipoferum* immobilized in alginate beads. *Int. J. Recent Sci. Res.*, 5 (12), 2178-2182.
- Romero-Perdomo, F., Camelo-Rusique, M., Criollo-Campos, P. & Bonilla-Buitrago, R. Efecto de la temperatura y el pH en la producción de biomasa de *Azospirillum brasilense* C16 aislada de pasto guinea. *Pastos y Forrajes*, 38 (3), 171-175.
- Schuh, A. C. (2005). Biopolímeros como suporte para inoculantes. Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Somasegaran, P. & Hoben, H. J. (1994). Handbook for rhizobia: methods in legume-Rhizobium technology. New York: Springer Science & Business Media.
- Souza, E. B., Mariano, R. L. R., Felix, K. C. S., Lima, N. B. & Silva, J. R. (2016). Preservação de bactérias fitopatogênicas In: Mariano, R. L. R. & Souza, E. B. Manual de Práticas em Fitobacteriologia. 3ª ed. Recife: EDUFRPE. p. 35-45.
- Sousa, P. M. (2011). Otimização do processo de produção de células das estirpes de *Bradyrhizobium* INPA 3-11B e UFLA 3-84, inoculantes do feijão-caupi. Lavras (MG): Universidade Federal de Lavras.
- Taylor, R. H., Allen, M. J. & Geldreich, E. E. (1993). Standard plate count: A comparison of pour plate and spread plate methods. *J. Am. Water Works Assoc.*, 75 (1), 35-37. doi:10.1002/j.1551-8833.1983.tb05055.x
- Tumelero, A. I. & Denardin, N. D. (2008). Uso de polímeros em formulações para preservação de *Pectobacterium atrosepticum* e *Ralstonia solanacearum*. *Summa phytopathol.*, 34 (1), 58-61. doi: 10.1590/S0100-54052008000100011
- Voss, G. B. (2013). Produção de *Bacillus subtilis* em biorreator airlift e sua aplicação no controle de nematoide de galhas do tomateiro. Florianópolis (SC): Universidade Federal de Santa Catarina.
- Woiciechowski, A. L., Carvalho, J. C., Spier, M. R., Habu, S., Yamaguishi, C. T., & Ghiggi, V. (2013). Emprego de resíduos agroindustriais em bioprocessos alimentares. In: Pastore, G. M., Bicas, J. L., Junior, M. R. M. ed. Biotecnologia de alimentos. São Paulo: Atheneu. p. 143-172.