

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CONSERVAÇÃO E  
MANEJO DE RECURSOS NATURAIS – NÍVEL MESTRADO

LARISSA DE ASSIS CARRETTTS

**“DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES PARA CONSÓRCIO  
BACTERIANO ENTRE *Azospirillum brasilense* E *Pseudomonas fluorescens* COM  
POTENCIAL USO COMO INOCULANTE BIOLÓGICO”**

CASCADEL-PR

Abril 2024

LARISSA DE ASSIS CARRETTTS

**“DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES PARA CONSÓRCIO  
BACTERIANO ENTRE *Azospirillum brasilense* E *Pseudomonas fluorescens* COM  
POTENCIAL USO COMO INOCULANTE BIOLÓGICO”**

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Conservação e Manejo de Recursos Naturais – Nível Mestrado, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Conservação e Manejo de Recursos Naturais

Área de Concentração: Ciências Ambientais

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Fabiana Gisele da Silva Pinto

Coorientador: Dr. Leopoldo Sussumo Matsumoto

CASCADEL-PR

Abril 2024

## Ficha Catalográfica

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

CARRETTTS, LARISSA DE ASSIS

"DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES PARA CONSÓRCIO BACTERIANO ENTRE *Azospirillum brasilense* E *Pseudomonas fluorescens* COM POTENCIAL USO COMO INOCULANTE BIOLÓGICO" / LARISSA DE ASSIS CARRETTTS; orientadora Fabiana Gisele da Silva Pinto; coorientador Leopoldo Sussumo Matsumoto. -- Cascavel, 2024.  
61 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico Campus de Cascavel) -- Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais, 2024.

1. Desenvolvimento de formulação . 2. Bactérias promotoras de crescimento vegetal . 3. inoculantes biológicos . I. da Silva Pinto, Fabiana Gisele, orient. II. Sussumo Matsumoto, Leopoldo , coorient. III. Título.

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

**LARISSA DE ASSIS CARRETTTS**

**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES PARA CONSÓRCIO  
BACTERIANO  
ENTRE *Azospirillum brasilense* E *Pseudomonas fluorescens* COM POTENCIAL  
USO COMO INOCULANTE BIOLÓGICO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestra em Conservação e Manejo de Recursos Naturais, área de concentração Ciências Ambientais, linha de pesquisa Biodiversidade e valoração dos ambientes naturais, APROVADO(A) pela seguinte banca examinadora;



Documento assinado digitalmente

**FABIANA GISELE DA SILVA PINTO**

Data: 26/04/2024 14:10:49-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Orientador(a) - Fabiana Gisele da Silva Pinto

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)



Documento assinado digitalmente

**LEOPOLDO SUSSUMU MATSUMOTO**

Data: 26/04/2024 22:55:41-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Leopoldo Sussumo Matsumoto

Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP)



Documento assinado digitalmente

**ODAIR ALBERTON**

Data: 26/04/2024 16:55:51-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Odair Alberton

Universidade Paranaense - UNIPAR - Umuarama (UNIPAR)



Documento assinado digitalmente

**LUIS EDUARDO AZEVEDO MARQUES LESCANO**

Data: 29/04/2024 09:30:36-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Luis Eduardo Azevedo Marques Lescano

Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP)

Cascavel, 26 de abril de 2024  
Apresentação realizada de forma remota.

## **DEDICATÓRIA**

Ao meu avô Pedro Marcilio de Assis,  
minha família e amigos, dedico este trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Deus por me conceder o dom da vida, e por me abençoar com sabedoria para lidar com todas as situações que me ocorreram até aqui, boas ou ruins, senti a presença de Deus em casa detalhe.

Agradeço a UNIOESTE – UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ por abrir as portas para que eu pudesse realizar este curso de Pós-Graduação.

Agradeço a Profa. Dr. Fabiana Gisele da Silva Pinto, por toda orientação, conselhos e parceria no desenvolvimento deste trabalho, aproveito para estender os agradecimentos aos colegas de trabalho do LAMIBI - Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia da UNIOESTE, em especial a minha amiga Debora Marina por todo apoio e auxílio na execução deste trabalho.

Agradeço aos membros da banca pelas correções e considerações para com este trabalho. Agradeço meu coorientador Prof. Dr. Leopoldo Sussumo Matsumoto, por toda orientação, que vai além da pesquisa, e sim para a minha vida como um todo.

Agradeço a empresa NITRO1000 Inoculantes Biológicos, pela oportunidade concedida em realizar este curso de Pós-Graduação contando com sua parceria e apoio financeiro, infraestrutural e de recursos humanos para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço a toda a minha família, em especial meu avô Pedro Marcilio de Assis a quem também dedico este trabalho, sem ele com certeza não estaria onde estou hoje.

Agradeço as minhas amigas de trabalho e as de longa data, que participaram diretamente ou indiretamente deste trabalho, sempre me apoiando e me incentivando a doar o que tenho de melhor.

Agradeço ao meu namorado, Pedro Henrique por todo apoio e carinho durante essa trajetória. Muito obrigada!!

## SUMÁRIO

<b>Resumo</b> .....	10
<b>Abstract</b> .....	11
<b>Introdução</b> .....	12
<b>Material e Métodos</b> .....	14
Estirpes bacterianas.....	15
Preparo dos inóculos de <i>A. brasilienses</i> e <i>P. fluorescens</i> .....	15
Compatibilidade entre estirpes <i>A. brasilense</i> e <i>P. fluorescens</i> .....	16
Desenvolvimento de formulações líquidas para <i>A. brasiliensis</i> e <i>P. fluorescens</i> .....	18
Avaliação do crescimento das estirpes nas formulações e meios controles RC e Nfb.....	19
Análise do tempo de viabilidade da F4 com diferentes protetores em escala semi-piloto.....	20
Avaliação da estabilidade e viabilidade celular em função da adição de protetores.....	21
Quantificação de células viáveis por PCR em tempo real qPCR.....	22
<b>Resultados e Discussão</b> .....	22
Compatibilidade entre as estirpes de <i>A. brasilienses</i> e <i>P. fluorescens</i> .....	23
Comparação do crescimento celular de <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5 de forma isolada nas diferentes formulações.....	24
Comparação do crescimento celular de <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V6 de forma isolada nas diferentes formulações.....	26
Avaliação do cultivo de <i>Azospirillum brasilense</i> , estirpe Ab-V5 associada a Ab-V6 em diferentes formulações.....	28
Avaliação do cultivo de <i>P. fluorescens</i> de forma isolada em diferentes formulações.....	30
Avaliação de crescimento bacteriano de forma simultânea entre <i>Azospirillum brasilense</i> , estirpes Ab-V5 e Ab-V6 e <i>P. fluorescens</i> em diferentes formulações.....	32

Avaliação de crescimento celular bacteriano entre <i>Azospirillum brasilense</i> , estirpe Ab-V5 e Ab-V6 e <i>P. fluorescens</i> em diferentes formulações com intervalo no tempo no crescimento entre as estirpes.....	33
Crescimento de <i>A. brasilense</i> e <i>P. fluorescens</i> em formulação controle (F4) com adição dos protetores PVA, PVP, Trealose, Ácido Cítrico e Ácido Málico.....	34
Álcool polivinílico (PVA).....	37
Polivinilpirrolidona (PVP).....	38
Trealose.....	39
Ácido Cítrico.....	41
Ácido Málico.....	42
Comparação entre métodos de avaliação de células viáveis para <i>Azospirillum brasilense</i> e <i>Pseudomonas fluorescens</i> por meio da técnica convencional e por qPCR no período de 90 dias.....	43
<b>Conclusão.....</b>	<b>46</b>
<b>Referências.....</b>	<b>47</b>

## RESUMO

Os inoculantes biológicos representam uma promissora vertente na agricultura contemporânea, desempenhando um papel fundamental na promoção da sustentabilidade agrícola. A crescente demanda por produtos biotecnológicos multifuncionais, caracterizados por uma vida útil (*shelf life*) mais longa e uma relação custo-benefício favorável para os produtores, que ao mesmo tempo priorizam a preservação do ecossistema e a saúde humana, tem se mantido constante em âmbito global. Os inoculantes biológicos emergem como catalisadores altamente eficazes para aumentar a produtividade agrícola, ao mesmo tempo em que mitigam de forma significativa o impacto negativo associado ao uso excessivo de fertilizantes químicos, contribuindo assim para o fomento da agricultura sustentável. Objetivou-se neste trabalho o desenvolvimento de formulações líquidas para consórcio bacteriano entre *Azospirillum brasilense* Ab-V5 e Ab-V6 e *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 que garantam a sobrevivência e viabilidade celular por período comercialmente viável. Para isso, cinco formulações foram desenvolvidas (F1, F2, F3, F4 e F5) e testadas em comparação a duas formulações controle (RC, Nfb). Foi selecionada a melhor formulação (F4) para adição de cinco protetores em diferentes concentrações: PVP (0,10%, 0,5% e 1%), PVA (0,15%, 0,25% e 0,5%), Trealose (5mM, 10mM e 20mM), ácido málico (0,15%, 0,25% e 0,5%), e ácido cítrico (5mM, 10mM e 15mM), visando avaliar a estabilidade celular. Para avaliação das Unidades Formadoras de Colônias (UFC), foi utilizado 1 mL de inóculo ( $1 \times 10^8$  UFC/mL) em 100 mL de meio de cultivo, a incubação ocorreu em 180 rpm à 30 °C por 48 horas. O desempenho das formulações e protetores foi avaliado segundo a metodologia estabelecida pelo MAPA (Instrução Normativa, N°30 de 2010). Em cultivo de forma associada das estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *A. brasilense*, as formulações F2, F3 e F4 se destacaram entre as testadas ao apresentarem crescimento significativo em relação ao controle. Por essa razão, foram selecionadas para cultivo de forma isolada de *P. fluorescens*. Para avaliação do crescimento em consórcio bacteriano as estirpes *A. brasilense* e *P. fluorescens* foram crescidas de duas formas: 1) Cultivo simultâneo das três estirpes. 2) Cultivo com intervalo no tempo de crescimento com associação de *P. fluorescens*, após 24 horas de cultivo prévio de *A. brasilense*. A F4 foi selecionada para ensaio em escala semi-piloto, realizado em balões com volume de 10 L, no qual foram inoculados 1,87% de cada estirpe em 8 L em meio de cultivo (F4), com adição dos protetores em diferentes concentrações e incubados em sala climatizada com temperatura de 30 °C, sob aeração estéril. A inoculação dos balões com as estirpes ocorreu respeitando o intervalo de tempo de 24 horas de crescimento entre *A. brasilense* e *P. fluorescens*. Nenhum dos protetores apresentou diferença significativa superior a F4 sem adição de protetores ao final de 90 dias de avaliação em relação à estabilidade e viabilidade celular. Foi realizada a contagem de células viáveis pelo método convencional e por qPCR, sendo constatado que o método de contagem de viáveis por qPCR foi eficiente e pode otimizar o processo de controle de qualidade dos inoculantes líquidos. Os resultados demonstraram que a formulação F4, com ou sem protetor, apresentou viabilidade e estabilidade microbiana satisfatórias, em conformidade com a legislação vigente. Além disso, a F4 apresenta-se como uma candidata viável para futuros processos de escalonamento industrial.

**PALAVRAS-CHAVE:** Consórcio bacteriano; Viabilidade e estabilidade celular; Desenvolvimento; Formulações; Protetor celular.

## ABSTRACT

Biological inoculants represent a promising aspect in contemporary agriculture, playing a fundamental role in promoting agricultural sustainability. The growing demand for multifunctional biotechnological products, characterized by a longer shelf life and a favorable cost-benefit ratio for producers, which at the same time prioritize the preservation of the ecosystem and human health, has remained constant in the global. Biological inoculants emerge as highly effective catalysts for increasing agricultural productivity, while significantly mitigating the negative impact associated with the excessive use of chemical fertilizers, thus contributing to the promotion of sustainable agriculture. The objective of this work was to develop liquid formulations for bacterial consortium between *Azospirillum brasilense* Ab-V5 and Ab-V6 and *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 that guarantee cell survival and viability for a commercially viable period. For this, five formulations were developed (F1, F2, F3, F4 and F5) and tested in comparison to two control formulations (RC, Nfb). The best formulation (F4) was selected for adding five protectors in different concentrations: PVP (0.10%, 0.5% and 1%), PVA (0.15%, 0.25% and 0.5%), Trehalose (5mM, 10mM and 20mM), malic acid (0.15%, 0.25% and 0.5%), and citric acid (5mM, 10mM and 15mM), aiming to evaluate cell stability. To evaluate the Colony Forming Units (CFU), 1 mL of inoculum ( $1 \times 10^8$  CFU/mL) was used in 100 mL of culture medium, incubation occurred at 180 rpm at 30 °C for 48 hours. The performance of the formulations and protectors was evaluated according to the methodology established by MAPA (Normative Instruction, N°30 of 2010). In associated cultivation of the Ab-V5 and Ab-V6 strains of *A. brasilense*, the formulations F2, F3 and F4 stood out among those tested by showing significant growth in relation to the control. For this reason, *P. fluorescens* isolates were selected for cultivation. To evaluate growth in a bacterial consortium, the *A. brasilense* and *P. fluorescens* strains were grown in two ways: 1) Simultaneous cultivation of the three strains. 2) Cultivation with an interval in growth time with the association of *P. fluorescens*, after 24 hours of previous cultivation of *A. brasilense*. F4 was selected for semi-pilot scale testing, carried out in flasks with a volume of 10 L, in which 1.87% of each strain were inoculated in 8 L of culture medium (F4), with the addition of protectors at different concentrations. and incubated in an air-conditioned room with a temperature of 30 °C, under sterile aeration. The inoculation of the flasks with the strains occurred respecting the time interval of 24 hours of growth between *A. brasilense* and *P. fluorescens*. None of the protectors showed a significant difference greater than F4 without the addition of protectors at the end of 90 days of evaluation in relation to cell stability and viability. Viable cells were counted using the conventional method and qPCR, and it was found that the viable cell counting method using qPCR was efficient and could optimize the quality control process of liquid inoculants. The results demonstrated that the F4 formulation, with or without protector, presented satisfactory viability and microbial stability, in accordance with current legislation. Furthermore, F4 presents itself as a viable candidate for future industrial scaling processes.

**KEY WORDS:** Bacterial Consortium; Cell viability and stability; Development; Formulations; Cell phone protector.

## 1 INTRODUÇÃO

Os inoculantes biológicos têm se tornado uma estratégia promissora para a agricultura sustentável, na tentativa de substituir o uso excessivo de fertilizantes químicos, aumentar a produtividade agrícola e atuar no biocontrole de patógenos (Cesari *et al.*, 2020; Elnahal *et al.*, 2022). Dessa maneira, a qualidade, custo-benefício, aplicação facilitada, multifuncionalidade e, claro, a capacidade de reprodução industrial com garantia de viabilidade dos microrganismos, são promissoras e de grande valia para o mercado de bioinsumos (Nogueira *et al.*, 2022). Apesar da dificuldade em promover longevidade e estabilidade dos microrganismos viáveis após meses de armazenagem a pesquisa com o uso de biopolímeros tem sido efetiva em no cultivo de microrganismos para uso como inoculante (Souza *et al.*, 2022).

Inoculantes a base de microrganismos, como as bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCP) já são relatados comumente na literatura (Pagnussat *et al.*, 2016; Maroniche *et al.*, 2018; Kadmiri *et al.*, 2021). As rizobactérias encontradas na rizosfera de muitas plantas, são capazes de induzir aumento no crescimento vegetal, assim como a absorção de nutrientes, como o fósforo, através da solubilização de fosfatos; a síntese de fito-hormônios; e a fixação de nitrogênio (Contreras-Cornejo *et al.*, 2016). Entre as BPCP, *Azospirillum* e *Pseudomonas* são gêneros amplamente comercializados, e frequentemente encontrados na rizosfera (Maroniche *et al.*, 2018).

O gênero *Azospirillum* é uma bactéria Gram-negativa, microaerófilico, fixador de nitrogênio, com capacidade de produção de fito-hormônios, como o ácido 3-indol-acético (AIA) (Cassán *et al.*, 2020). É uma das BPCP mais estudadas desde sua descoberta, das 22 espécies já encontradas, a espécie *Azospirillum brasilense* é a mais conhecida. É utilizada como modelo para o entendimento das vias metabólicas do nitrogênio, tem um papel crucial na arquitetura radicular das plantas, seu principal resultado na inoculação, é a capacidade de melhorar os efeitos negativos do estresse abiótico sobre culturas, podendo contribuir para o aumento e estabilização da produção agrícola (Okon e Labandera-Gonzalez, 2015; Cassán *et al.*, 2020).

Enquanto, o gênero *Pseudomonas*, também Gram-negativa, destaca-se pela se pela produção de diferentes metabólitos secundários, a exemplo 2,4 – diacetilfloroglucinol (DAPG), de propriedades antagonistas e antimicrobianas, atuando também como um importante agente de biocontrole (Pagnussat *et al.*, 2016). Dentro do gênero *Pseudomonas* a espécie *Pseudomonas fluorescens* é um dos mais efetivos

antagonistas selecionados para a supressão de doenças, possui uma alta capacidade de solubilização de fósforo presente no solo (Galindo *et al.*, 2018; Moazezikho *et al.*, 2020), produz pigmento fluorescentes. Os sideróforos secretados de *P. fluorescens* tem capacidade de facilitar o crescimento de algumas espécies em condições de deficiência de ferro, influencia na expressão de genes relacionados à patogênese e/ou promove o crescimento de plantas, assim como, inibem agentes causadores de podridão de algumas culturas, como por exemplo: *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp. e *Pythium* spp. (Gupta *et al.*, 2002; Sulochana *et al.*, 2014; Trapet *et al.*, 2016; Khan *et al.*, 2022).

A compatibilidade entre os microrganismos em inoculantes pode fornecer excelentes resultados para a agricultura e indústria; no entanto, não é uma tarefa fácil combinar microrganismos com diferentes necessidades fisiológicas e nutricionais, o que requer uma vasta pesquisa e desenvolvimento biotecnológico (Garcia *et al.*, 2021). Além disso, existe uma grande busca por produtos multifuncionais, ou seja, microrganismos com diferentes modos de ação e benéficos às plantas que, além da fixação biológica do nitrogênio e produção de metabólitos (PHB e biofilme), possam realizar também o biocontrole de patógenos (Rezende *et al.*, 2021).

O desenvolvimento da tecnologia de co-inoculação para a soja, por exemplo, teve início no ano de 2013, constituído na combinação de cepas de *Bradyrhizobium* altamente eficiente na fixação de nitrogênio e cepas de *A. brasilense* com elevada capacidade de produção de fito-hormônios (Hungria *et al.*, 2013, 2015). Em cinco anos, a co-inoculação foi adotada em cerca de 25% dos 36 milhões de hectares cultivados com esta leguminosa (Santos *et al.*, 2021). Não há dúvida de que a combinação de inoculantes microbianos pode fornecer excelentes resultados, justificando o seu grande potencial de utilização em todo o mundo (Bashan 2011; Juge *et al.*, 2012; Malusá e Vassilevde 2014; Fukami *et al.*, 2017; Bellabarba *et al.*, 2019; Santos *et al.*, 2019, 2021).

Um levantamento sobre formulações mistas demonstra que associação de *Azospirillum* e *Pseudomonas*, por exemplo, tem sido amplamente estudada (Pagnussat *et al.*, 2016; Prasad; Babu, 2017; Kadmiri *et al.*, 2020; Omer *et al.*, 2022), embora necessitem de atenção, ao passo em que há relatos de inibição no crescimento de cepas de *Azospirillum* quando associadas à *Pseudomonas* (Maroniche *et al.*, 2018). Aumentar a vida útil do agente microbiano, encontrar um material transportador, aditivo adequados e contornar problemas no transporte, armazenamento e aplicação do bioinsumo, são os principais desafios no desenvolvimento de uma formulação eficiente (Bashan *et al.*, 2014; Florencio *et al.*, 2022).

Por conta disso, a escolha de aspectos na produção de inoculantes deve ser bem avaliada, a incluir: a natureza líquida ou sólida da formulação; a escolha de cepas possíveis de crescerem em conjunto; a escolha por protetores que, em condições ideais de concentração, auxiliem na viabilidade das cepas e sua vida de prateleira; além do método de aplicação mais eficiente e prático do inoculante (Lobo *et al.*, 2019).

O desenvolvimento do inoculante envolve uma série de etapas, uma delas é justamente a elaboração da formulação para a fermentação e produção do inoculante, que leva em consideração as necessidades nutricionais dos microrganismos utilizados (Ferreira, 2016). Dentre estas necessidades a presença de fontes como carbono, nitrogênio, fósforo, enxofre e oxigênio, são importantes para o crescimento celular, além de micronutrientes e vitaminas específicas para alguns microrganismos, antiespumante. Além da composição, outro fator de grande importância é o tamponamento do meio ao longo da fermentação (Hungria, 2001; Santos *et al.*, 2021).

Apesar da complexidade em lidar com diversos fatores e detalhes, é difícil manter a concentração celular elevada por longos períodos em inoculantes líquidos devido à morte precoce das células. No entanto, é possível incluir substâncias protetoras nas formulações líquidas dos inoculantes para melhorar o comportamento e a sobrevivência das células microbianas presentes (Bashan *et al.*, 2014; Santos *et al.*, 2021)

Dessa forma, o presente estudo objetivou o desenvolvimento de uma formulação líquida para o consórcio bacteriano de *A. brasilense* (Ab-V5e Ab-V6) e *P. fluorescens* (ATCC 13525), com o intuito de avaliar o desempenho em conjunto dessas estirpes e o uso de diferentes protetores na estabilidade e viabilidade dessas cepas.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

Os experimentos foram conduzidos pelo Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia – LAMIBI da UNIOESTE, campus Cascavel, Paraná, em parceria com a empresa NITRO1000 Inoculantes Biológicos.



**Figura 1** – Fluxograma com etapas do estudo.

## 2.1 Estirpes bacterianas

As bactérias utilizadas para desenvolvimento das formulações líquidas dos inoculantes foram as estirpes comerciais de *A. brasilense* (Ab-V5 e Ab-V6) provenientes da Coleção de Culturas de Bactérias Diazotróficas e Promotoras do Crescimento de Plantas da Embrapa Soja (Coleção WFCC 1213, WDCM 1054), respectivamente, e a estirpe de *P. fluorescens* (ATCC 13525) foi obtida da coleção da Fundação André Tosello. Todas as estirpes constam na lista de microrganismos recomendadas pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) Todas as cepas foram recuperadas conforme as recomendações das coleções, e foram armazenadas em estoque em tubos cônicos tipo Falcon contendo meio sólido inclinado e recobertos com glicerol P.A.

## 2.2 Preparo dos inóculos de *A. brasilienses* e *P. fluorescens*

Em ensaios prévios foram realizadas as curvas de crescimento por 48 horas de *A. brasilienses* e *P. fluorescens* para avaliação dos parâmetros de densidade óptica, pH e UFC/mL, uma vez que estas estirpes apresentam velocidade de crescimento e metabolismos distintos.

Para promover o consórcio bacteriano entre as estirpes, e a padronização nos ensaios, o inóculo foi preparado em frascos de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultura líquido Rojo Congo (RC) (Cassán *et al.*, 2010). Para *P. fluorescens* foi utilizado

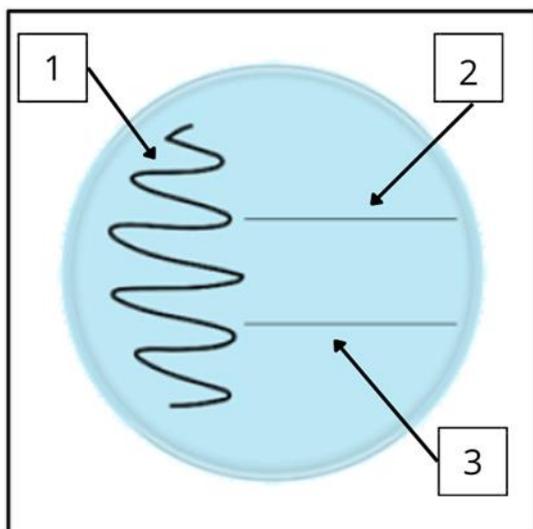
Caldo Nutriente (NB) (Robert Koch, 1881). A incubação foi realizada em incubadora com agitação orbital de 180 rpm à 30 °C por 48 horas para *A. brasilense* e 24 horas para *P. fluorescens*. Os frascos de 250 mL foram inoculados em fluxo laminar com auxílio de alça de inoculação a partir de repiques do estoque (item 2.1). O tempo de cultivo dos inóculos foram determinados por uma curva de crescimento realizada previamente no laboratório, considerando estes resultados foi determinado o tempo de cultivo suficiente para obtenção de UFC/mL satisfatória para padronização do inóculo. Todas as estirpes foram cultivadas de forma isolada e em duplicata.

Todos os ensaios e, após o crescimento foram ajustados a concentração ideal para serem inoculados nas formulações. Diante dos resultados obtidos em ensaios prévios para *A. brasilense* e *P. fluorescens*, foi padronizado  $1,0 \times 10^8$  UFC/mL, esta padronização foi necessária para obtenção de células em fase log ou exponencial. Além disso, foram realizadas avaliações de células viáveis por meio da contagem dos inóculos segundo a metodologia estabelecida pelo MAPA (Instrução Normativa, N°30 de 2010).

### **2.3 Compatibilidade entre estirpes *A. brasilense* e *P. fluorescens***

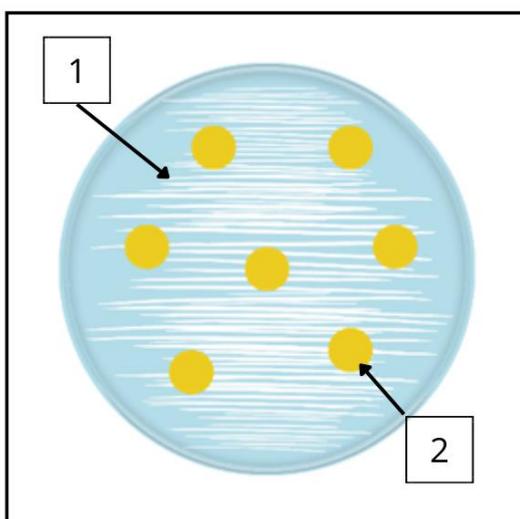
Em placas de Petri contendo RC e AN sólidos foram inoculados tanto *A. brasilense* quanto *P. fluorescens*, para avaliação morfológica das bactérias em ambos os meios de cultura.

O teste de compatibilidade entre os isolados de *A. brasilense* e *P. fluorescens*, foi realizado utilizando o método de antagonismo direto e indireto (Stockwell *et al.*, 1996; Santos, 2014). Para avaliação foi realizada a inoculação em estrias contínuas de *A. brasilense* (Ab-V5) em metade de uma placa contendo meio de cultivo RC (Figura 2). Na outra metade foram realizadas estrias perpendiculares de Ab-V6 e *P. fluorescens*. O inóculo de todas as estirpes foi realizado da extremidade da placa em direção ao centro (06 cm de comprimento) e incubadas de 24h a 72h a 30 °C, respeitando o tempo de crescimento de cada estirpe. O mesmo procedimento foi realizado em meio de cultivo AN e em diferentes ordens de estriamento para que todas as estirpes fossem estriadas e testadas independente da ordem e meio de cultivo.



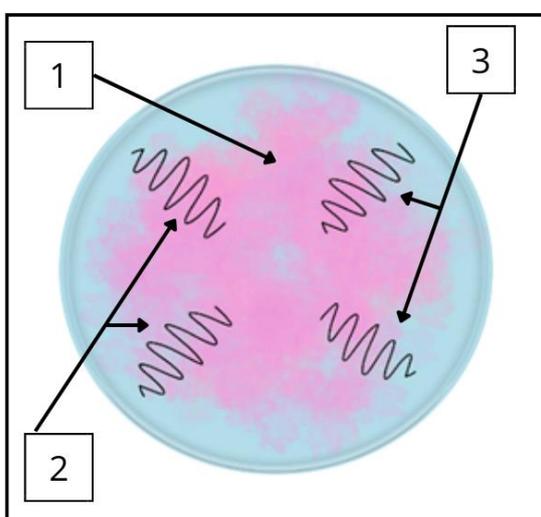
**Figura 2** - Representação esquemática da compatibilidade entre *A. brasilense* e *P. fluorescens* através de da técnica de antagonismo direto, realizado por confronto entre as estirpes (*streak cross*). Indicativo 1 estria descontinua de *A. brasilense* Ab-V5, indicativo 2 estria perpendicular de *A. brasilense* Ab-V6 e indicativo 3 estria perpendicular de *P. fluorescens*.

A segunda metodologia de avaliação de antagonismo direto entre as estirpes foi realizada por meio de disco-difusão, conforme metodologia de Bauer e colaboradores (1966) adaptado por Santos (2014). Foi espalhado 100 $\mu$ L da cultura celular de *A. brasilense* com auxílio de alça de Drigalski em placas de Petri contendo meio sólido RC (1 da Figura 3). Discos estéreis de 06 mm foram embebidos no sobrenadante, obtido pelo cultivo de *P. fluorescens* após a centrifugação à 10.000 rpm por 15 min e filtragem em filtros de 0,2  $\mu$ m. Estes discos foram depositados sobre o meio (2 da Figura 3) contendo o espalhamento da cultura celular de *A. brasilense*. O mesmo foi realizado em meio de cultivo AN e em diferentes ordens para que todas as estirpes fossem testadas.



**Figura 3** - Representação esquemática da compatibilidade entre *A. brasilense* indicativo 1 e *P. fluorescens* indicativo 2 através de da técnica de suscetibilidade.

A terceira metodologia para avaliação do antagonismo foi o teste indireto. As estirpes de *A. brasilense* Ab-V5 / Ab-V6 e *P. fluorescens* foram cultivados em meio líquido seguindo o item 2.2 e após o cultivo, foram centrifugados à 10.000 rpm por 15 min, o sobrenadante foi filtrado em filtros de 0,2 µm. A estirpe Ab-V5 de *A. brasilense* foi espalhada em meio sólido RC (1 da Figura 4), em seguida, foram realizadas estrias descontínuas de *P. fluorescens* (2) e *A. brasilense* Ab-V6 (3). O mesmo foi realizado em meio de cultivo AN em diferentes ordens para que todas as estirpes fossem testadas.



**Figura 4** - Representação esquemática da compatibilidade entre *A. brasilense* Ab-V5 indicativo 1 *P. fluorescens* indicativo 2 e *A. brasilense* Ab-V6 indicativo 3 através da técnica *Spread plate*.

#### 2.4 Desenvolvimento de formulações líquidas para *A. brasiliensis* e *P. fluorescens*

Foram elaboradas cinco formulações líquidas denominadas F1, F2, F3, F4 e F5, testadas associadas a duas formulações controle (F6-RC e F7-Nfb) (Tabela 1). Para todas as formulações foram ajustados pH 6,8 – 7,2. As formulações (F1, F2, F3 e F4) foram suplementadas com 2 mL/L da solução de micronutrientes 1. A F5 foi suplementada com 10 mL/L da solução de micronutrientes 2 (Tabela 2) e as formulações controles não foram suplementadas com soluções de micronutrientes ou vitaminas.

**Tabela 1** - Composição química das formulações e meios utilizados.

Reagentes	Formulações (%)						
	F 1	F2	F3	F4	F5	F6-RC	F7-Nfb
Carbono	0,00%	58,35%	59,94%	44,02%	32,27%	68,35%	51,92%
Nitrogênio	12,98%	15,91%	10,90%	16,77%	9,68%	6,84%	0,00%

Sais	34,80%	7,11%	7,30%	5,62%	4,32%	4,31%	1,25%
Micronutrientes	0,28%	0,06%	0,06%	0,05%	0,15%	0,00%	0,11%
Tampão	25,97%	5,30%	5,45%	20,96%	32,27%	6,84%	5,19%
Quelante	0%	7,96%	10,90%	8,39%	18,07%	0,00%	41,53%
Antiespumante Century®	26%	5,30%	5,45%	4,19%	3,23%	13,67%	0,00%

**Tabela 2** - Composição das soluções de micronutrientes.

Solução de Micronutrientes (Reagentes)	Formulações g/L	
	Solução 1	Solução 2
Molibdato de Sódio - NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	1	1
Sulfato de Manganês - MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	1,8	1,175
Sulfato de Zinco - ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,2	1,2
Sulfato de Cobre - CuSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,004	0,004
Ácido Bórico - H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,4	1,4

#### 2.4.1 Avaliação do crescimento das estirpes nas formulações e meios controles RC e Nfb

Para validação das formulações líquidas foram realizados ensaios em escala laboratorial, em frascos de 250 mL sendo preparado 100 mL de cada formulação (Tabela 1), na qual foram transferidos 0,5% de inóculo bacteriano para cada estirpe. A padronização do inóculo e a avaliação da biomassa celular após 24h e 48h da transferência, foi realizada como descrito no item 2.2. O primeiro ensaio foi realizado com o cultivo de forma separada para Ab-V5 e Ab-V6 nas sete formulações, destes ensaios foram selecionadas três formulações, F2, F3 e F4, que apresentaram maior desempenho. Os ensaios restantes foram conduzidos utilizando *A. brasilense* Ab-V5 associado a Ab-V6, o cultivo isolado de *P. fluorescens* e o consórcio entre as três estirpes, nas três formulações pré-selecionadas.

Os ensaios do consórcio bacteriano entre as três estirpes, foram realizados de duas maneiras: 1) Cultivo simultâneo das três estirpes por 48h e 2) Cultivo com intervalo de tempo de crescimento, sendo cultivo prévio de *A. brasilense* por 24h e em seguida, acrescentado a *P. fluorescense* e em associação foram crescidos por mais 24h, totalizando 48h. A avaliação da concentração celular presente nas amostras coletadas (UFC/mL), foi realizada através da técnica de espalhamento, segundo a metodologia estabelecida pelo MAPA (IN 30-2010). Foram realizados o espalhamento em dois meios de cultivo, AN para quantificação de *P. fluorescens* e RC acrescido de 50 µL a cada 100 mL de meio de cultivo do antibiótico estreptomomicina na concentração de 0,04 mg/mL para a quantificação

de *A. brasilense*. Ambos foram incubados em estufa de crescimento microbiológico à 30°C.

Devido ao tempo de crescimento destas estirpes serem diferentes, a contagem e avaliação de células viáveis de *P. fluorescens* ocorreu logo após 24 horas de incubação, por se tratar de um microrganismo de crescimento rápido e apresentar fluorescência bem característica nas colônias. Para *A. brasilense* por se tratar de um microrganismo de crescimento lento, foi adicionada estreptomicina, em concentração definida por ensaios prévios a esta pesquisa para a inibição de *P. fluorescens* sem prejudicar o crescimento de *A. brasilense*, por sua vez avaliado após 72h.

## **2.5 Análise do tempo de viabilidade da F4 com diferentes protetores em escala semi-piloto**

Foram realizadas a avaliação da viabilidade celular e vida útil dos microrganismos na formulação F4 com a adição de cinco protetores em diferentes concentrações (*shelf-life*).

O ensaio de escala semi-piloto foi dividido em três etapas, ETAPA I, ETAPA II e ETAPA III devido ao número de balões que ultrapassaria a quantidade disponível para execução do experimento. Os experimentos foram conduzidos em duplicata, em balões com volume de 10L contendo 8 litros de F4 acrescido dos protetores; polivinilpirrolidona (PVP), álcool polivinílico (PVA), Trealose, Ácido Málico e Ácido Cítrico, em diferentes concentrações (Tabela 3). A F4 sem adição de protetores foi utilizada como controle. A inoculação dos balões com as estirpes ocorreu respeitando o intervalo de cultivo prévio de *A. brasilense* por 24h, e após este período *P. fluorescens* foi adicionada e cultivada por 24h, totalizando 48h de cultivo de *A. brasiliense* e 24h de cultivo de *P. fluorescens*.

Para a inoculação dos balões, os inóculos foram preparados e analisados como descrito no item 2.2. Cerca de 1,87% de *A. brasilense* foi inoculado nos balões, estes foram incubados em sala climatizada com temperatura de 30 °C, por 24h. Após este período, 1,87% de *P. fluorescens* foi inoculado nos balões e mantidos em sala de crescimento sob os mesmos parâmetros por mais 24h, totalizando 48h de cultivo.

Após o período de cultivo, foi coletada uma amostra de cada balão para análises de pureza e quantificação de células viáveis, conforme descrito no item 2.3. Após as análises de liberação serem realizadas (pureza, coloração de Gram, D.O e pH), os balões foram liberados para envase. Em fluxo laminar, realizou-se a transferência do líquido do cultivo contido no balão para bolsas plásticas “bags” de 1,5L utilizando uma bomba

peristáltica. As bolsas foram dispostas em um suporte de aço inoxidável e pesadas em uma balança analítica, estabelecendo um critério para encerrar o enchimento entre as bolsas à medida que atingiam aproximadamente 1,5 kg. Após o enchimento, as amostras foram acondicionadas em caixas e armazenadas em uma sala com temperatura ambiente.

Após o envase as amostras foram acomodadas em caixas e armazenadas em uma sala com temperatura ambiente.

**Tabela 3** - Formulação 4 (F4) acrescida dos protetores Álcool polivinílico (PVA), Polivinilpirrolidona (PVP) Trealose, Ácido Cítrico e Ácido málico em diferentes concentrações.

F4 + Protetores (mM ou %)	Identificação dos protetores
Álcool polivinílico PVA 0,15% - (C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O) n (g)	P1
Álcool polivinílico PVA 0,25% - (C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O) n (g)	P2
Álcool polivinílico PVA 0,5% - (C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O) n (g)	P3
Polivinilpirrolidona (PVP) 0,10% - (C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> NO) (g)	P4
Polivinilpirrolidona (PVP) PVP 0,5% - (C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> NO) (g)	P5
Polivinilpirrolidona (PVP) PVP 1% - (C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> NO) (g)	P6
Trealose 5mM - C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> (g)	P7
Trealose 10mM - C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> (g)	P8
Trealose 20mM - C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> (g)	P9
Ácido Cítrico 5mM - C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> (g)	P10
Ácido Cítrico 10mM - C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> (g)	P11
Ácido Cítrico 15mM - C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> (g)	P12
Ácido Málico 0,15% - C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub> (g)	P13
Ácido Málico 0,25% - C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub> (g)	P14
Ácido Málico 0,5% - C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub> (g)	P15
F4 - Sem protetor	F4

### 2.5.1 Avaliação da estabilidade e viabilidade celular em função da adição de protetores

Após o envase (AE) foram realizadas análises de controle de qualidade conforme descrito na Instrução Normativa, N°30 de 2010 (MAPA, 2011) com modificações conforme descrito no item 2.5.1. As embalagens plásticas (bags) foram homogeneizadas vigorosamente e coletadas assepticamente uma alíquota de 10 mL sendo transferida para um tubo cônico estéril. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-6</sup>. Foram plaqueados 0,1 mL das diluições 10<sup>-5</sup> e 10<sup>-6</sup> na superfície dos meios de cultura em placas de Petri com auxílio da alça de Drigalski. As placas foram incubadas em estufa à 30 °C por 24h para *P. fluorescens* e 72h para *A. brasilense*.

As avaliações foram realizadas nos tempos 0, 30, 60 e 90 dias após o envase para quantificação de células viáveis (UFC/mL), estabilidade (*shelf-life*) e viabilidade do consórcio bacteriano. Isso se deve ao fato da maioria dos inoculantes comerciais com estas estirpes apresentarem concentração de registro igual ou superior a  $2,0 \times 10^8$  UFC/mL com validade de seis meses a um ano. Em todas as avaliações foram feitas análises de pureza, e para tal detecção foi utilizado a técnica de estria por esgotamento, em meio BDA, TSA e AN para *P. fluorescens* e em RC com antimicrobiano estreptomicina para *A. brasilense*. O objetivo desta avaliação foi verificar a pureza do material e, caso houvesse alguma contaminação, identificá-la. Além disso, para a confirmação de pureza das amostras foi realizada a coloração de Gram.

### 2.5.2 Quantificação de células viáveis por PCR em tempo real qPCR

Após 90 dias de avaliação das células viáveis em F4 com a adição dos protetores pelo método convencional mencionado na seção 2.2, optou-se por selecionar alguns tratamentos (F4 sem adição de protetor, PVA 0,25%, PVP 0,5%, Trealose 5mM, Trealose 20mM, Ácido Cítrico 5mM, Ácido Málico 0,15%, Ácido Málico 0,5%) cuja concentração estivesse acima de  $2,0 \times 10^8$  UFC/mL para serem quantificados por qPCR de células viáveis com kit GoFluorescens e GoAzo, conforme as instruções do fabricante. O objetivo deste ensaio foi avaliar a aplicabilidade da técnica qPCR na quantificação de células viáveis de bioinsumos, especialmente de inoculantes, com o intuito de otimizar as atividades de controle de qualidade e Pesquisa e Desenvolvimento, uma vez que a técnica convencional requer tempo, mão de obra e uso excessivo de materiais, como placas de Petri. Além disso, devido ao custo elevado associado à técnica convencional, selecionamos alguns tratamentos para os quais realizamos apenas a avaliação aos 90 dias, com o objetivo de comparar com a avaliação convencional de 90 dias.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A combinação de microrganismos com diferentes necessidades fisiológicas e nutricionais exige um desenvolvimento biotecnológico específico devido à interação entre esses microrganismos, que frequentemente competem entre si. No decorrer deste estudo, foi elaborada uma formulação capaz de suprir as exigências metabólicas das estirpes de *A. brasiliense* e *P. fluorescens* para que ambas se mantenham estáveis e viáveis até aplicação nas culturas como soja e milho.

A avaliação das formulações indicou diferenças entre as espécies avaliadas. *A. brasiliense* demonstrou um melhor crescimento na presença de ácido málico, e sacarose, enquanto *P. fluorescens*, com sua habilidade de colonizar diferentes ambientes e a versatilidade nutricional, apresentou um elevado crescimento em todas as formulações testada, possibilitando assim o desenvolvimento de uma formulação adequada para a co-cultura, como será demonstrado nos resultados obtidos a seguir.

### 3.1 Compatibilidade entre as estirpes de *A. brasilienses* e *P. fluorescens*

Nos testes de compatibilidade entre as estirpes, observou-se que todas apresentam compatibilidade entre si, sendo verificado crescimento de *A. brasiliense* submetido a diferentes metodologias de confrontos com *P. fluorescens* (Figura 5).



**Figura 5** – Compatibilidade entre as estirpes de *A. brasilienses* e *P. fluorescens* através de ensaios de antagonismo direto (A) e (C), e indireto (B).

Embora a eficácia da associação de bactérias seja amplamente reconhecida, é crucial para a pesquisa garantir a compatibilidade entre microrganismos, para assegurar que não haja incertezas quanto ao comportamento destas cepas quando combinadas. Díaz e colaboradores (2023) destacam esta importância da realização de testes de compatibilidade *in vitro* de estirpes bacterianas antes da co-inoculação. Os mesmos autores, destacaram o papel fundamental dos efeitos benéficos do inoculante nas plantas, como foi o caso bem-sucedido da co-inoculação de *Azospirillum argentinense* (Az39) e *P. fluorescens* (A506), que resultou em no aumento do crescimento da alface.

Em contrapartida, para algumas cepas, efeitos inibitórios de *Pseudomonas* sobre o crescimento de *Azospirillum* também são observados em meios sólidos (AN e King's B), os quais são favoráveis à produção de metabólitos, através de vias regulatórias específicas (Maroniche *et al.*, 2018). Por essa razão, além da compatibilidade bacteriana, a dinâmica de interação *Azospirillum* – *Pseudomonas* também depende de aspectos

fisiológicos, genéticos e ambientais, nos quais esse consórcio será explorado (Díaz *et al.*, 2022).

Em meio RC, por exemplo, já foram relatados menores impactos sobre o crescimento de *A. brasilense*, provavelmente pela baixa produção de metabólitos neste meio (Maroniche *et al.*, 2018), ou ainda, pode-se também considerar que a presença de nitratos no meio, seja capaz de atenuar os efeitos fisiológicos inibitórios de *Pseudomonas* sobre *Azospirillum* (Díaz *et al.*, 2022).

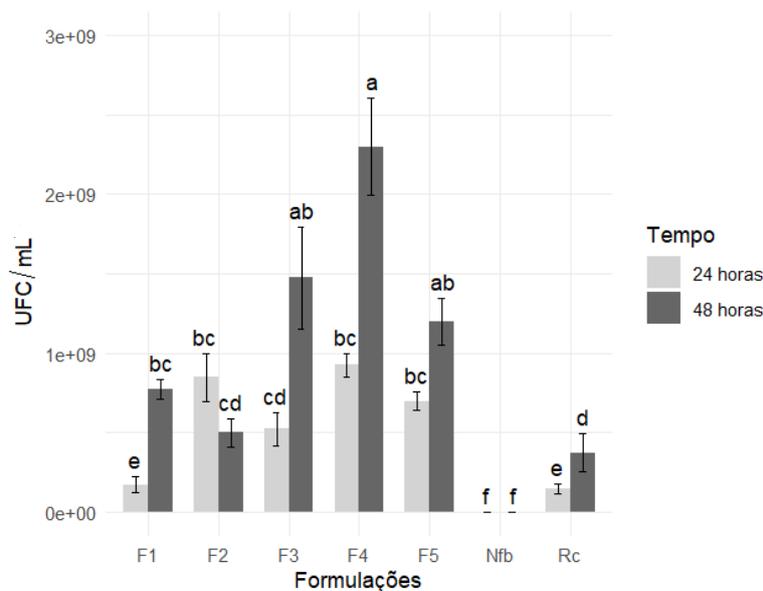
### **3.2 Comparação do crescimento celular de *Azospirillum brasilense* Ab-V5 de forma isolada nas diferentes formulações**

Neste ensaio, foram avaliadas cinco formulações de meio de cultura (F1, F2, F3, F4, F5), incluindo duas formulações de controle (RC e Nfb), com o objetivo de determinar quais delas promovem a maior concentração celular da estirpe *A. brasilense* Ab-V5.

Após 24 horas de cultivo, a formulação F4 resultou na maior concentração celular, com uma média de  $9,25 \times 10^8$  UFC/mL. Esta concentração permaneceu elevada após 48 horas, atingindo uma média de  $2,30 \times 10^9$  UFC/mL. Em contraste, a formulação controle Nfb apresentou a menor concentração celular em ambos os períodos de 24 e 48 horas avaliados, sem nenhuma UFC/mL detectada.

Ao avaliarmos tanto o período de 24 horas quanto o de 48 horas de cultivo, observou-se que a formulação F4 apresentou diferenças estatísticas superiores em comparação com as formulações controle RC e Nfb.

As formulações F3 e F5 após 48 horas de cultivo não apresentaram diferença estatística em relação a F4, por outro lado, apresentaram diferenças estatísticas significativas em comparação com Rc e Nfb (Figura 6).



**Figura 6** - Concentração celular em UFC/mL de *A. brasilense* estirpe Ab-V5 cultivada de forma isolada nas diferentes formulações (F1, F2, F3, F4, F5, Nfb e Rc) em 24 horas e 48 horas de cultivo. Representação da média e erro padrão (barras acima e abaixo da média). Diferentes letras indicam diferenças significativas entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

Uma estratégia utilizada para a otimização da produtividade bacteriana, tanto para cepas isoladas ou associadas é a utilização de diferentes fontes de carbono, micronutrientes, protetores (Carrasco-Espinosa *et al.*, 2015; Garcia *et al.*, 2021). Neste estudo, as formulações F3, F4 e F5 apresentaram crescimento satisfatório em relação as demais, essas formulações continham fontes de carbono como manitol (F3), sacarose (F4), glicerol (F4 e F5) e ácido DL-málico (F4), respectivamente.

Estudos demonstram que o ácido málico é considerado uma das fontes de carbono (C) mais comum no crescimento de *A. brasilense* (Bashan *et al.*, 2011; Garcia *et al.*, 2021). Meios de cultivo contendo manitol e sacarose, favorecem de forma positiva o crescimento de *A. brasilense* Ab-V5 e Ab-V6, mesmo em consórcio com outras bactérias como *Bradyrhizobium*. Este favorecimento pode ser influenciado pela presença da enzima manitol desidrogenase, que converte o manitol em outras formas mais utilizáveis de energia. Em relação a sacarose, o *A. brasilense*, apresenta enzimas como sacarase e invertase, que quebram a sacarose em glicose e frutose que são então utilizados nas vias metabólicas, para obtenção de energia e metabólicos intermediários (Garcia *et al.*, 2021).

O glicerol além de servir como protetor celular (Lobo *et al.*, 2019), também já foi utilizado para substituir as fontes de carbono mais comuns para *Azospirillum* (Bashan *et al.*, 2011). Espécies como *A. brasilense* possuem vias específicas e eficazes na utilização deste composto orgânico (Singh *et al.*, 2017). A associação de diferentes fontes de

carbono, principalmente em F4 (sacarose, glicerol, ácido málico), demonstra a capacidade da estirpe em utilizá-las para promoção de seu crescimento e viabilidade durante 48 horas.

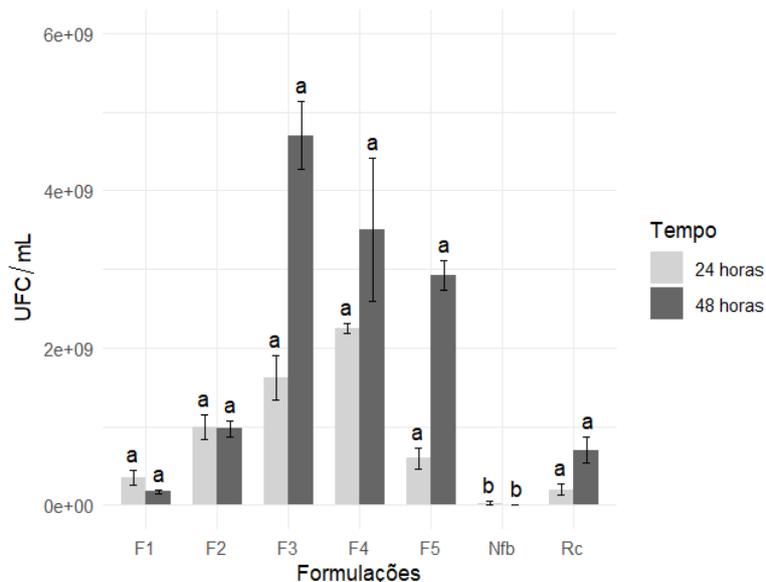
Em relação aos resultados dos parâmetros pH e D.O de *A. brasiliense* Ab-V5, apresentou resultados semelhantes em todas as formulações, exceto na F2, que em 48h observou-se uma D.O menor (0,886) que em 24h (1,012), e F3 que apresentou uma acidificação do pH, de 6,98 (24h) para 5,71 com 48 horas de cultivo (tabela em material suplementar). O que pode ser justificado pelas diferentes fontes de carbono e nitrogênio presentes nas formulações (Tabela 1).

### **3.3 Comparação do crescimento celular de *Azospirillum brasiliense* Ab-V6 de forma isolada nas diferentes formulações**

Após 24 e 48 horas de cultivo, as formulações F1, F2, F3, F4 e F5 apresentaram diferenças estatísticas significativas em relação à formulação controle Nfb. Em contraste, as formulações F1, F2, F3, F4 e F5 não apresentaram diferenças estatísticas quando comparadas ao controle RC no tempo de 24 horas.

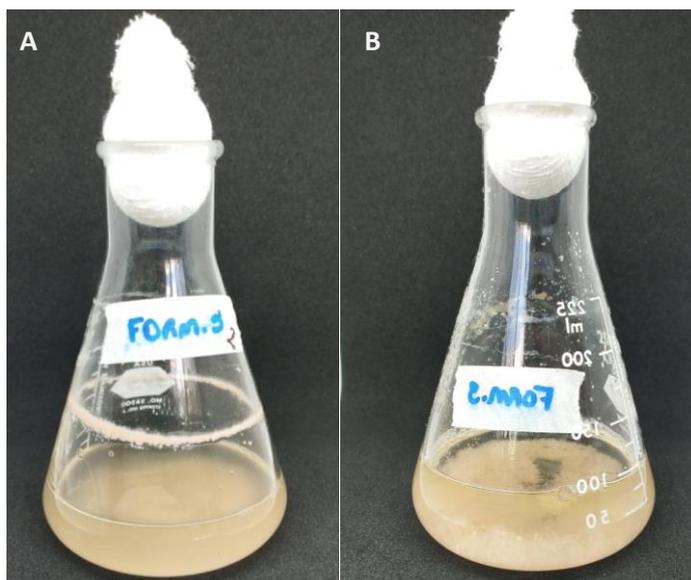
As formulações testadas F1, F2, F3, F4 e F5 não exibiram diferenças estatísticas significativas entre si nos períodos de 24 e 48 horas. Esses resultados estão representados na Figura 7.

Ao longo de 24 horas, a estirpe Ab-V6 atingiu seu pico de crescimento celular na formulação F4, com uma média de  $2,25 \times 10^9$  UFC/mL. No entanto, após 48 horas, a formulação F3 apresentou a maior média entre as formulações avaliadas, alcançando  $4,70 \times 10^9$  UFC/mL, seguida pela F4 com uma média de  $3,50 \times 10^9$  UFC/mL. Em contraste, a formulação Nfb apresentou a menor concentração ao longo do estudo, sem nenhuma UFC/mL detectada após 48 horas.



**Figura 7** - Concentração celular em UFC/mL de *A. brasilense* estirpe Ab-V6 cultivada de forma isolada nas diferentes formulações (F1, F2, F3, F4, F5, Nfb e Rc) em 24 horas e 48 horas de cultivo. Representação da média e erro padrão (barras acima e abaixo da média). Diferentes letras indicam diferenças significativas entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

Uma informação qualitativa importante a ser ressaltada em relação a F3 e F5 contendo Ab-V6, que apesar de não apresentarem diferença estatística em relação as demais formulações, as mesmas apresentaram floculações nas primeiras 24 horas de cultivo (Figura 8). Este fator pode estar relacionado aos altos níveis de glicerol (1%) presentes no meio cultivo, corroborando com os trabalhos de Dias (1988) e Barreto e colaboradores (2009) que obtiveram os mesmos padrões de floculação.



**Figura 8** – Floculação na (A) formulação 5; (B) formulação 3.

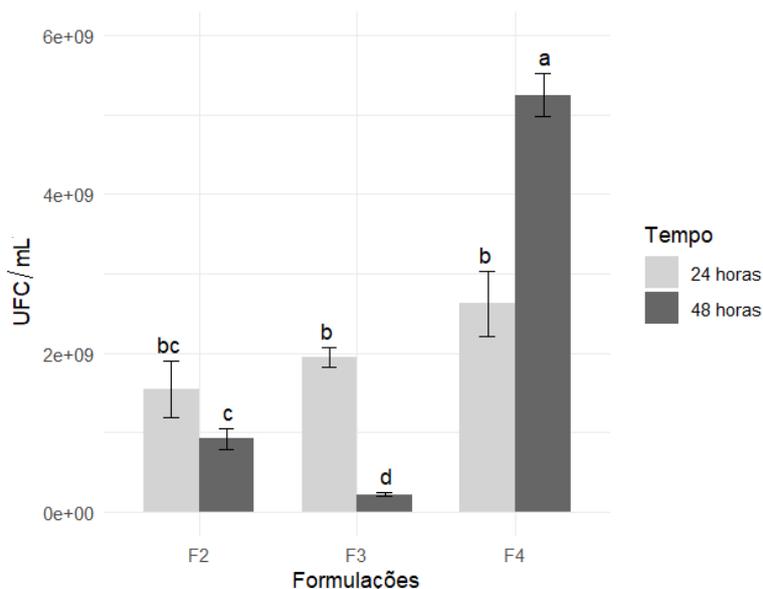
Esse processo de floculação está associado a ambientes nutricionalmente estressantes, como altas taxas de relação carbono e nitrogênio (Souza, 2018), o que pode decorrer da associação de excesso de fontes de nutrientes, como o glicerol, manitol (fonte de carbono) e extrato de levedura (consumo de substâncias nitrogenadas) no meio (Baretto *et al.*, 2009).

A formulação F5 foi excluída dos ensaios subsequentes devido à presença de filamentos que aderiram às paredes, o que se acredita ter causado uma superestimação na quantificação de células viáveis. Além disso, em termos de aplicabilidade e comercialização, a presença de filamentos deve ser considerada devido às possíveis interferências na aplicação do biofertilizante nos sulcos, através de bicos de pulverização. Considerando o potencial biotecnológico, a formulação F3 continuou sendo avaliada nos ensaios subsequentes, uma vez que poderia ser incorporada ao consórcio bacteriano com *Bradyrhizobium japonicum*, devido à afinidade deste último com o manitol presente na F3. Em relação aos resultados dos parâmetros de pH e D.O obtidos em análises realizadas com 24h e 48h de cultivo, apresentaram resultados semelhantes em todas as formulações, exceto em F2, que apresentou pH (8,17) mais básico em 48h de cultivo. O que pode ser justificado pela competição do H<sup>+</sup> com os nutrientes catiônicos da F2 pelos microrganismos. Já em F2 e F4 indicaram que estão bem ajustados promovendo uma maior e melhor aproveitamento dos nutrientes das formulações (Ribeiro *et al.*, 1997) (tabela em material suplementar).

### **3.4 Avaliação do cultivo de *Azospirillum brasilense*, estirpe Ab-V5 associada a Ab-V6 em diferentes formulações**

As formulações F2, F3 e F4 testadas na associação das estirpes Ab-V5 e Ab-V6, após 24 horas de cultivo, não apresentaram diferença estatística significativa. No entanto, após 48 horas, observou-se que F4 apresentou diferença significativa em relação a F2 e F4 (Figura 9).

No cultivo em associação das estirpes Ab-V5 e Ab-V6, observou-se inicialmente que a formulação F4 também se destacou, atingindo uma média de  $2,63 \times 10^9$  UFC/mL após 24 horas, e aumentando para  $5,25 \times 10^9$  UFC/mL após 48 horas. Em contraste, a menor média foi observada na formulação F3 ( $2,25 \times 10^8$  UFC/mL), seguida por F2 ( $9,25 \times 10^8$  UFC/mL) após 48 horas (Figura 9).



**Figura 9** - Concentração celular em UFC/mL do cultivo associado de *A. brasilense*, estirpe Ab-V5 e Ab-V6 nas diferentes formulações (F2, F3 e F4) em intervalos de 24 horas e 48 horas de cultivo. Representação da média e erro padrão (barras acima e abaixo da média). Diferentes letras indicam diferenças significativas entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

Na literatura já foi demonstrado que espécies de *Azospirillum* são favorecidas na presença de ácido málico (Dôbereiner; Baldani; Baldani, 1995). Porém, estudos realizados por Marcelino (2012) e Garcia e colaboradores (2021) demonstraram a habilidade das estirpes *A. brasilense* em metabolizar sacarose. Nesse estudo a interação da sacarose com ácido málico contribui significativamente para o aumento do crescimento celular. Além da sacarose, a formulação de cultivo utilizado por Marcelino (2012) também possuía glicerol como fonte de carbono. O glicerol é um dos poucos substratos capazes de atravessar a membrana celular de procariotos por difusão facilitada (Santos *et al.*, 2021). Após a passagem do glicerol através da membrana, *Azospirillum* é capaz de catabolizá-lo e utilizá-lo como fonte de carbono (Silva, 2006; Fernandes, 2013; Santos *et al.*, 2021). O glicerol estava presente na composição das formulações F3 e F4, sacarose em F2 e F4, demonstrando a capacidade das estirpes em utilizar essas fontes de carbono em seu metabolismo energético (Figura 8).

A maior concentração celular obtida na formulação F4, em comparação as demais formulações, pode estar relacionada pelo equilíbrio das fontes de carbono, sacarose, glicerol e ácido málico (Tabela 1).

Nota-se que na F3, (Tabela 4) o pH acidificou em relação ao pH inicial do meio de cultura, evidenciando uma grande produção de ácidos orgânicos como por exemplo: ácido acético, lático, glioxálico (Goebel; Krieg, 1984), compostos estes resultantes do metabolismo, decorrentes da hidrólise do glicerol. As formulações F2 e F4 apresentaram

elevação do pH nas primeiras 24h de cultivo, F2 manteve a elevação, enquanto F4 apresentou uma boa capacidade de tamponamento. E com base nesses resultados obtidos, a F4 foi escolhida para o cultivo simultâneo das estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *Azospirillum brasilense*.

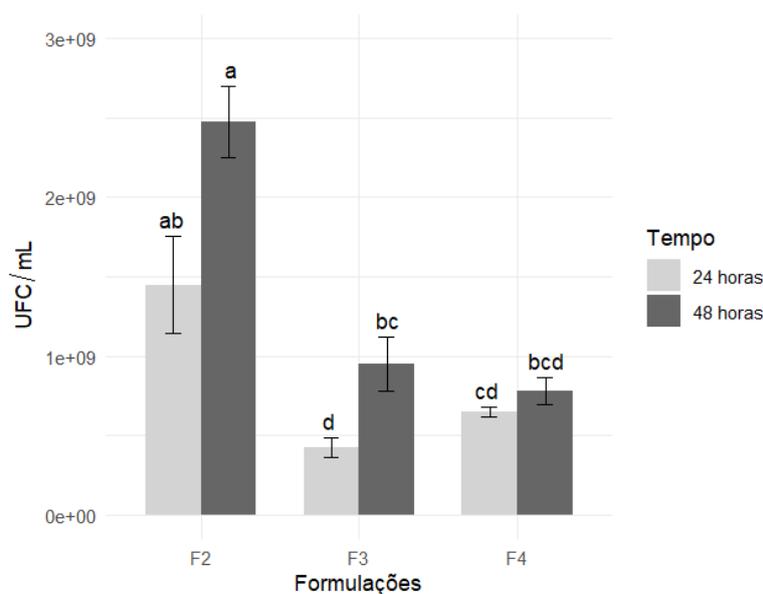
**Tabela 4** - Análise de pH e D.O durante o cultivo associado de *A. brasilense*, estirpe Ab-V5 e Ab-V6 em (F2, F3, F4) em 24 horas e 48 horas.

Formulações <i>A. brasilense</i> Ab-V5 – Ab-V6	D.O	pH	D.O	pH
	(24h)	(24h)	(48h)	(48h)
F2	1,1485	7,55	1,097	7,85
F3	1,332	6,97	0,95	5,86
F4	1,3775	7,16	1,609	6,87

### 3.5 Avaliação do cultivo de *P. fluorescens* de forma isolada em diferentes formulações

Para o cultivo de *P. fluorescens*, observou-se que a formulação F2 apresentou diferenças estatísticas significativas em relação a F3 e F4 em 24 horas. Por outro lado, F3 e F4, em 24 horas, foram estatisticamente similares. Ao analisar o período de 48 horas, F2 se manteve estatisticamente significativa em relação a F3 e F4.

Na análise do cultivo isolado de *P. fluorescens* inferiu-se que F2 apresentou as maiores concentrações celulares de UFC/mL em 24 horas e em 48 horas de cultivo ( $1,45 \times 10^9$  e  $2,48 \times 10^9$  UFC/mL, respectivamente), quando comparadas a F3 e F4 em ambos os períodos (Figura 10).



**Figura 10** - Concentração celular em UFC/mL do cultivo isolado de *P. fluorescens* nas diferentes formulações (F2, F3 e F4) em intervalos de 24 horas e 48 horas de cultivo. Representação da média e erro padrão (barras acima e abaixo da média). Diferentes letras indicam diferenças significativas entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

O crescimento significativo de *Pseudomonas* em F2 parece estar diretamente correlacionado à presença de sacarose (1%) no meio, visto que apenas essa formulação continha o dissacarídeo nessa quantidade (Tabela 1). Ao que parece *P. fluorescens* utilizou de forma satisfatória esta fonte de carbono (sacarose) que já é reconhecida para rizobactérias, incluindo *Azospirillum* e *Bradyrhizobium*, como demonstrado em estudo realizado por Garcia e colaboradores (2021). Hipóteses a respeito da hidrólise de sacarose por íons hidrogênio liberados durante processos de autoclavagem de meio de cultivo ou até mesmo a capacidade desses dissacarídeos em oferecer proteção as células já foram verificadas em outras pesquisas (Garcia *et al.*, 2021).

Para o cultivo de *P. fluorescens* de forma isolada, os valores de pH e D.O obtidos em análises realizadas com 24 e 48 horas foram semelhantes, com D.O proporcional e pH estável em todas as formulações, ao final das 48 horas de cultivo (Tabela 5). Isto pode estar relacionado a quantidade semelhante da combinação de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (Tabela 1), que auxiliaram durante o período de incubação em manter o sistema tampão nas formulações.

**Tabela 5** - Análise de pH e D.O durante o cultivo de forma isolada de *P. fluorescens* em (F2, F3, F4) em 24 horas e 48 horas.

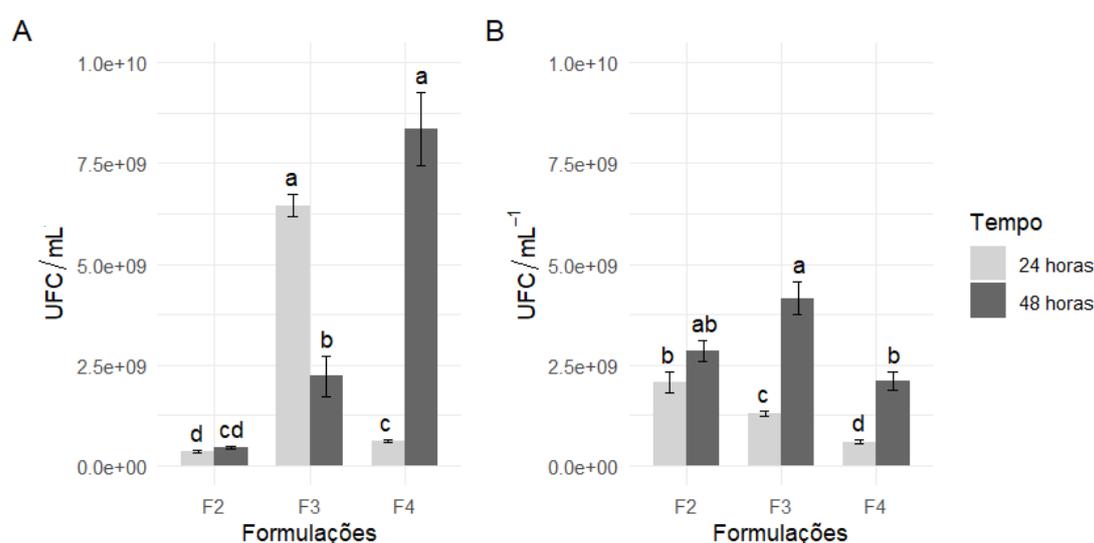
Formulações <i>P. fluorescens</i>	D.O (24h)	pH (24h)	D.O (48h)	pH (48h)
-----------------------------------	--------------	-------------	--------------	-------------

<b>F2</b>	1,431	7,00	1,451	7,42
<b>F3</b>	1,3085	6,32	1,5325	6,35
<b>F4</b>	1,379	6,88	1,5405	6,95

### 3.6 Avaliação de crescimento bacteriano de forma simultânea entre *Azospirillum brasilense*, estirpes Ab-V5 e Ab-V6 e *P. fluorescens* em diferentes formulações

Na avaliação de crescimento bacteriano das três cepas de forma simultânea, os resultados apresentaram que para cada bactéria avaliada, uma formulação obteve maior desempenho. No período de 24 horas, o cultivo de *A. brasilense* evidenciou a maior concentração celular em F3, com uma média de  $6,45 \times 10^9$  UFC/mL. Após 48 horas, a formulação F4 destacou-se com a maior concentração celular, atingindo uma média de  $8,35 \times 10^9$  UFC/mL (Figura 11 A).

Durante a análise do crescimento bacteriano de *P. fluorescens* em 24 horas, podemos observar que a maior concentração celular ocorreu na formulação F2, que exibiu uma média de  $2,08 \times 10^9$  UFC/mL. Esta medida é coerente com os valores obtidos quando *P. fluorescens* é cultivado isoladamente. Para o período de 48 horas, a formulação F3 se sobressaiu, apresentando a maior concentração celular com uma média de  $4,15 \times 10^9$  UFC/mL, apesar de não apresentar diferença estatística com F2 (Figura 11 B).



**Figura 11** - Concentração celular em UFC/mL do cultivo simultâneo entre *Azospirillum brasilense* estirpe (A) Ab-V5 e Ab-V6 e (B) *P. fluorescens* nas diferentes formulações em intervalos de 24 e 48 horas de

cultivo. Representação da média e erro padrão (barras acima e abaixo da média). Diferentes letras indicam diferenças significativas entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

Embora a F3 tenha se destacado, observou-se floculação no meio, com demonstrado na Figura 8, e conseqüentemente a acidificação de F3 após 48h (pH 5,95), a desqualificou para o cultivo das estirpes. De acordo com Bahat-Samet, Castro-Sowinski e Okon (2004), a agregação bacteriana e a floculação são de grande interesse na produção, armazenamento e sobrevivência bacteriana de inoculantes. *Azospirillum brasilense* apresenta a capacidade de agregação e floculação, e essas propriedades podem impactar significativamente sua sobrevivência no solo, tornando seus inoculantes adequados para aplicação na agricultura (Burdman; Okon; Jurkevitch, 2000). Embora a floculação seja uma propriedade benéfica dos inoculantes, favorecendo o sucesso das culturas, como por exemplo, através da simbiose com outros microrganismos no solo, ela pode apresentar desafios na contagem precisa das células. Quando as células se aglomeram, a separação torna-se difícil, levando a contagens imprecisas de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL). Além disso, a comercialização de inoculantes floculados pode apresentar obstáculos devido às suas características. Visualmente, eles podem parecer inadequados para os agricultores, muitos dos quais têm conhecimento técnico limitado. Ademais, a floculação pode resultar em obstruções nos bicos de pulverização durante a aplicação no sulco ou foliar.

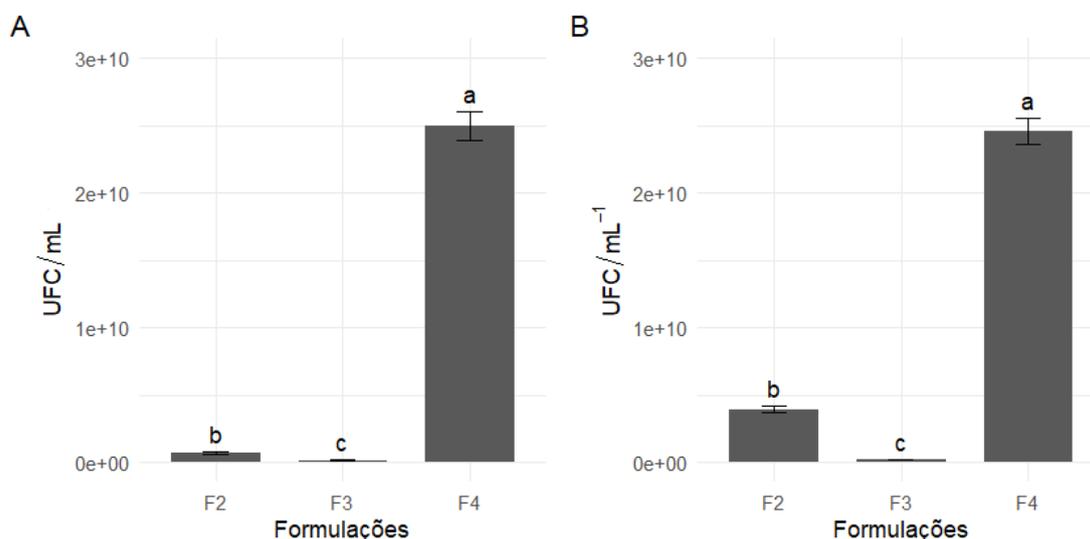
### **3.7 Avaliação de crescimento celular bacteriano entre *Azospirillum brasilense*, estirpe Ab-V5 e Ab-V6 e *P. fluorescens* em diferentes formulações com intervalo no tempo no crescimento entre as estirpes**

Com o intuito de priorizar o crescimento e a sobrevivência do *A. brasilense* no consórcio, pelo fato de apresentar um crescimento mais lento em relação a *P. fluorescens* (Maroniche *et al.*, 2018), optou-se por realizar adaptações nos tempos de cultivo, priorizando seu crescimento de forma isolada por 24 horas, e após este período adicionar *P. fluorescens* e em consórcio serem cultivados por mais 24 horas.

Ao analisar o crescimento isolado de *A. brasilense*, estirpes Ab-V5 e Ab-V6, em 48 horas (tempo total de cultivo para *A. brasilense*) constatou-se que F4 se sobressaiu, com uma concentração celular média de  $2,50 \times 10^{10}$  UFC/mL (Figura 12 A).

Na avaliação de *Pseudomonas fluorescens* adicionado ao meio previamente inoculado com ambas as estirpes de *A. brasilense* por 24 horas, observou-se que a formulação F4 alcançou a maior concentração celular. Esta concentração atingiu uma

média de  $2,46 \times 10^{10}$  UFC/mL conforme observado na Figura 12 (B). Sob essas condições, constatou-se que tanto o crescimento de *A. brasilense* quanto de *P. fluorescens* foi significativamente maior na formulação F4, conforme ilustrado abaixo na Figura 12.



**Figura 11** - Avaliação da concentração celular em UFC/mL do cultivo em consórcio bacteriano com intervalo no tempo de crescimento, e associação de *P. fluorescens* após 24 horas de cultivo prévio de *A. brasilense*. (A) *A. brasilense* e (B) *P. fluorescens*. Representação da média e erro padrão (barras acima e abaixo da média). Diferentes letras indicam diferenças significativas entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

A combinação de *Azospirillum* com *Pseudomonas*, agentes de biocontrole antagonistas, requerem atenção especial quanto aos potenciais efeitos inibitórios de metabólitos antimicrobianos produzidos principalmente pela *Pseudomonas*, como por exemplo, o 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG), contra *Azospirillum* (Couillerot *et al.*, 2011). A versatilidade catabólica do gênero *Pseudomonas*, a possibilita utilizar de uma faixa muito ampla de substratos como fonte de carbono (Pedrinho, 2009), o que justifica a necessidade do intervalo de crescimento (24h) de *Azospirillum* e *Pseudomonas*, amenizando assim, os possíveis efeitos antagonistas das estirpes.

#### 4.0 Crescimento de *A. brasilense* e *P. fluorescens* em formulação controle (F4) com adição dos protetores PVA, PVP, Trealose, Ácido Cítrico e Ácido Málico

Nos ensaios anteriores, F4 se mostrou a formulação mais estável no quesito D.O e pH, obteve um crescimento satisfatório em UFC/mL, sem a formação de grumos ou filamentos. Assim, esta formulação foi escolhida para condução das três etapas de adição de protetores (Tabela 3). Vale ressaltar que as etapas foram realizadas utilizando o

consórcio bacteriano com intervalo no tempo de crescimento, com associação de *P. fluorescens*, após 24 horas de cultivo prévio das estirpes de *A. brasilense*.

Para todos os protetores foram selecionadas três concentrações distintas para PVA 0,15%, 0,25% e 0,5%, PVP 0,1%, 0,5% e 1%, Trealose 5mM, 10mM e 20mM, Ácido Cítrico 5mM, 10mM e 15mM e Ácido Málico 0,15%, 0,25% e 0,5% e as análises de estabilidade celular foram avaliadas em 0, 30, 60 e 90 dias.

Para ambos os microrganismos *A. brasilense* e *P. fluorescens* no período de 90 dias avaliados, a formulação F4 sem a adição de protetores (controle) exibiu o maior crescimento médio. Portanto, não houve nenhum protetor específico que superou a formulação F4 em termos de crescimento bacteriano no período de 90 dias (Tabelas 6 e 7).

Entretanto, a concentração recomendada pelo MAPA, para registro de produtos com estas estirpes deve ser igual ou superior a  $2,0 \times 10^8$  UFC/ mL e apesar de F4 sem adição de protetor apresentar o maior crescimento médio entre todos os protetores testados, *A. brasilense* não atingiu a concentração recomendada, apresentando uma média de crescimento de  $4,52 \times 10^7$  UFC/mL.

**Tabela 6** – Quantificação do número de colônias de *A. brasilense* em formulação F4 com adição de PVA, PVP, Trealose, Ácido Cítrico e Ácido Málico e F4 (sem protetor).

<i>A. brasilense</i>	UFC/mL			
	0 DIAS	30 DIAS	60 DIAS	90 DIAS
	Média±Desvio padrão	Média±Desvio padrão	Média±Desvio padrão	Média±Desvio padrão
F4	7,90x10 <sup>8</sup> ± 2,57x10 <sup>7</sup> a	1,83x10 <sup>8</sup> ± 9,69x10 <sup>6</sup> a	7,35x10 <sup>7</sup> ± 2,13x10 <sup>7</sup> a	4,52x10 <sup>7</sup> ± 1,01x10 <sup>7</sup> a
PVA 0,15%	7,80x10 <sup>8</sup> ± 2,98x10 <sup>7</sup> a	2,80x10 <sup>8</sup> ± 4,85x10 <sup>7</sup> a	1,05x10 <sup>8</sup> ± 4,16x10 <sup>7</sup> a	3,08x10 <sup>7</sup> ± 1,03x10 <sup>7</sup> a
PVA 0,25%	1,08x10 <sup>9</sup> ± 6,59x10 <sup>7</sup> a	3,68x10 <sup>8</sup> ± 1,10x10 <sup>8</sup> a	3,11x10 <sup>8</sup> ± 1,51x10 <sup>8</sup> a	6,33x10 <sup>7</sup> ± 8,17x10 <sup>6</sup> a
PVA 0,5%	1,10x10 <sup>9</sup> ± 1,35x10 <sup>8</sup> a	2,28x10 <sup>8</sup> ± 7,97x10 <sup>7</sup> a	1,09x10 <sup>8</sup> ± 2,32x10 <sup>7</sup> a	4,70x10 <sup>7</sup> ± 9,01x10 <sup>6</sup> a
PVP 0,10 %	7,13x10 <sup>8</sup> ± 1,01x10 <sup>8</sup> a	1,75x10 <sup>8</sup> ± 2,96x10 <sup>7</sup> a	4,30x10 <sup>7</sup> ± 1,74x10 <sup>7</sup> a	2,83x10 <sup>7</sup> ± 8,37x10 <sup>6</sup> a
PVP 0,50 %	9,35x10 <sup>8</sup> ± 2,68x10 <sup>8</sup> a	2,15x10 <sup>8</sup> ± 3,80x10 <sup>7</sup> a	6,18x10 <sup>7</sup> ± 1,60x10 <sup>7</sup> a	3,70x10 <sup>7</sup> ± 1,58x10 <sup>7</sup> a
PVP 1%	1,41x10 <sup>9</sup> ± 2,02x10 <sup>8</sup> a	3,85x10 <sup>8</sup> ± 2,20x10 <sup>8</sup> a	1,73x10 <sup>8</sup> ± 1,97x10 <sup>7</sup> a	4,83x10 <sup>7</sup> ± 5,82x10 <sup>6</sup> a
Trealose 5mM	1,49x10 <sup>9</sup> ± 4,06x10 <sup>8</sup> a	5,55x10 <sup>7</sup> ± 2,19x10 <sup>7</sup> a	4,45x10 <sup>7</sup> ± 5,33x10 <sup>6</sup> a	1,40x10 <sup>7</sup> ± 8,08x10 <sup>6</sup> b
Trealose 10mM	4,15x10 <sup>8</sup> ± 1,25x10 <sup>8</sup> a	3,35x10 <sup>8</sup> ± 3,88x10 <sup>7</sup> a	6,00x10 <sup>7</sup> ± 3,49x10 <sup>7</sup> b	6,10x10 <sup>7</sup> ± 9,43x10 <sup>6</sup> a
Trealose 20mM	3,75x10 <sup>7</sup> ± 2,39x10 <sup>7</sup> b	5,50x10 <sup>8</sup> ± 1,05x10 <sup>8</sup> a	1,93x10 <sup>8</sup> ± 5,38x10 <sup>7</sup> a	3,65x10 <sup>7</sup> ± 1,01x10 <sup>7</sup> a
Ácido Cítrico 5mM	1,47x10 <sup>9</sup> ± 2,44x10 <sup>8</sup> a	5,20x10 <sup>7</sup> ± 1,80x10 <sup>7</sup> a	2,48x10 <sup>8</sup> ± 1,09x10 <sup>8</sup> a	1,43x10 <sup>7</sup> ± 7,72x10 <sup>6</sup> a

Ácido Cítrico 10mM	1,36x10 <sup>9</sup> ± 1,89x10 <sup>8</sup> a	3,53x10 <sup>7</sup> ± 9,99x10 <sup>6</sup> a	3,88x10 <sup>7</sup> ± 6,22x10 <sup>6</sup> a	5,75x10 <sup>6</sup> ± 1,38x10 <sup>6</sup> a
Ácido Cítrico 15mM	1,37x10 <sup>9</sup> ± 9,29x10 <sup>7</sup> a	1,30x10 <sup>7</sup> ± 9,19x10 <sup>6</sup> b	3,40x10 <sup>7</sup> ± 1,05x10 <sup>7</sup> a	5,75x10 <sup>6</sup> ± 8,54x10 <sup>5</sup> a
Ácido Málico 0,15%	3,20x10 <sup>8</sup> ± 1,08x10 <sup>7</sup> a	3,03x10 <sup>8</sup> ± 3,68x10 <sup>7</sup> a	2,05x10 <sup>8</sup> ± 3,62x10 <sup>7</sup> a	4,10x10 <sup>7</sup> ± 5,85x10 <sup>6</sup> a
Ácido Málico 0,25%	1,22x10 <sup>9</sup> ± 2,58x10 <sup>8</sup> a	9,25x10 <sup>6</sup> ± 5,34x10 <sup>6</sup> b	3,00x10 <sup>7</sup> ± 6,61x10 <sup>6</sup> a	2,50x10 <sup>6</sup> ± 1,50x10 <sup>6</sup> b
Ácido Málico 0,5%	3,28x10 <sup>8</sup> ± 1,89x10 <sup>7</sup> a	3,38x10 <sup>8</sup> ± 1,60x10 <sup>7</sup> a	1,65x10 <sup>7</sup> ± 6,58x10 <sup>7</sup> a	1,73x10 <sup>7</sup> ± 1,31x10 <sup>6</sup> a

Médias seguidas por letras iguais, indicam não haver diferença significativa entre os grupos ao nível de 5% de significância.

**Tabela 7** – Quantificação do número de colônias de *P. fluorescens* em formulação F4 com adição de PVA, PVP, Trealose, Ácido Cítrico e Ácido Málico e F4 (sem protetor).

<i>P. fluorescens</i>	UFC/mL			
	0 DIAS Média±Desvio padrão	30 DIAS Média±Desvio padrão	60 DIAS Média±Desvio padrão	90 DIAS Média±Desvio padrão
F4	9,83x10 <sup>8</sup> ± 1,72x10 <sup>8</sup> a	2,75x10 <sup>8</sup> ± 1,82x10 <sup>7</sup> a	1,20x10 <sup>8</sup> ± 3,66x10 <sup>7</sup> abc	6,62x10 <sup>8</sup> ± 8,22x10 <sup>7</sup> a
PVA 0,15%	6,53x10 <sup>8</sup> ± 1,72x10 <sup>8</sup> a	3,70x10 <sup>8</sup> ± 8,63x10 <sup>7</sup> a	5,23x10 <sup>7</sup> ± 1,90x10 <sup>7</sup> abcdefgh	2,23x10 <sup>7</sup> ± 1,65x10 <sup>6</sup> abcdefgh
PVA 0,25%	9,20x10 <sup>8</sup> ± 9,35x10 <sup>7</sup> a	3,23x10 <sup>8</sup> ± 7,97x10 <sup>7</sup> a	2,81x10 <sup>8</sup> ± 1,00x10 <sup>8</sup> a	3,18x10 <sup>7</sup> ± 3,68x10 <sup>6</sup> abcdefgh
PVA 0,5%	4,40x10 <sup>8</sup> ± 7,01x10 <sup>7</sup> a	4,00x10 <sup>8</sup> ± 1,33x10 <sup>8</sup> a	7,55x10 <sup>7</sup> ± 1,47x10 <sup>7</sup> abcdef	2,38x10 <sup>7</sup> ± 1,89x10 <sup>6</sup> abcdefg
PVP 0,10 %	6,13x10 <sup>8</sup> ± 9,41x10 <sup>7</sup> a	2,09x10 <sup>8</sup> ± 1,05x10 <sup>8</sup> abc	8,50x10 <sup>7</sup> ± 4,97x10 <sup>7</sup> cdefgh	1,28x10 <sup>8</sup> ± 4,34x10 <sup>7</sup> abcdefgh
PVP 0,50 %	7,80x10 <sup>8</sup> ± 1,79x10 <sup>8</sup> a	3,50x10 <sup>8</sup> ± 5,58x10 <sup>7</sup> a	8,50x10 <sup>7</sup> ± 1,85x10 <sup>7</sup> abcdef	2,18x10 <sup>8</sup> ± 9,72x10 <sup>7</sup> ab
PVP 1%	4,98x10 <sup>8</sup> ± 2,03x10 <sup>8</sup> a	3,56x10 <sup>8</sup> ± 1,91x10 <sup>8</sup> ab	8,18x10 <sup>8</sup> ± 1,01x10 <sup>8</sup> a	1,63x10 <sup>8</sup> ± 7,67x10 <sup>7</sup> abcdefgh
Trealose 5mM	9,88x10 <sup>8</sup> ± 6,60x10 <sup>7</sup> a	4,80x10 <sup>8</sup> ± 1,78x10 <sup>8</sup> a	6,95x10 <sup>7</sup> ± 2,28x10 <sup>7</sup> abcdefgh	5,75x10 <sup>7</sup> ± 3,57x10 <sup>6</sup> abcdefg
Trealose 10mM	1,00x10 <sup>9</sup> ± 1,10x10 <sup>8</sup> a	2,48x10 <sup>8</sup> ± 3,20x10 <sup>7</sup> a	6,00x10 <sup>7</sup> ± 3,49x10 <sup>7</sup> fgh	2,23x10 <sup>8</sup> ± 8,54x10 <sup>6</sup> a
Trealose 20mM	8,10x10 <sup>8</sup> ± 2,61x10 <sup>8</sup> a	4,85x10 <sup>8</sup> ± 1,17x10 <sup>8</sup> a	1,93x10 <sup>8</sup> ± 5,38x10 <sup>7</sup> ab	1,53x10 <sup>8</sup> ± 1,44x10 <sup>7</sup> ab
Ácido Cítrico 5mM	1,02x10 <sup>9</sup> ± 1,89x10 <sup>8</sup> a	2,63x10 <sup>8</sup> ± 3,59x10 <sup>7</sup> a	1,06x10 <sup>8</sup> ± 2,41x10 <sup>7</sup> abcd	6,68x10 <sup>7</sup> ± 4,87x10 <sup>6</sup> abcdef
Ácido Cítrico 10mM	9,73x10 <sup>8</sup> ± 2,02x10 <sup>8</sup> a	1,95x10 <sup>8</sup> ± 4,73x10 <sup>7</sup> ab	1,10x10 <sup>8</sup> ± 3,15x10 <sup>7</sup> abcde	3,62x10 <sup>8</sup> ± 1,67x10 <sup>8</sup> a
Ácido Cítrico 15mM	6,48x10 <sup>8</sup> ± 9,54x10 <sup>7</sup> a	8,00x10 <sup>7</sup> ± 5,05x10 <sup>7</sup> defgh	8,43x10 <sup>7</sup> ± 2,35x10 <sup>7</sup> abcdef	2,28x10 <sup>7</sup> ± 1,31x10 <sup>7</sup> h
Ácido Málico 0,15%	1,13x10 <sup>9</sup> ± 7,53x10 <sup>7</sup> a	3,10x10 <sup>8</sup> ± 4,08x10 <sup>7</sup> a	2,05x10 <sup>8</sup> ± 3,62x10 <sup>7</sup> a	1,11x10 <sup>8</sup> ± 2,90x10 <sup>7</sup> abcde
Ácido Málico 0,25%	8,28x10 <sup>8</sup> ± 1,45x10 <sup>8</sup> a	7,75x10 <sup>7</sup> ± 5,01x10 <sup>7</sup> efgh	3,38x10 <sup>7</sup> ± 1,89x10 <sup>7</sup> abcdefgh	2,68x10 <sup>7</sup> ± 1,55x10 <sup>7</sup> gh
Ácido Málico 0,5%	1,03x10 <sup>9</sup> ± 2,50x10 <sup>7</sup> a	1,90x10 <sup>8</sup> ± 7,45x10 <sup>7</sup> ab	2,73x10 <sup>8</sup> ± 1,78x10 <sup>8</sup> bcdefgh	5,75x10 <sup>7</sup> ± 3,38x10 <sup>7</sup> fgh

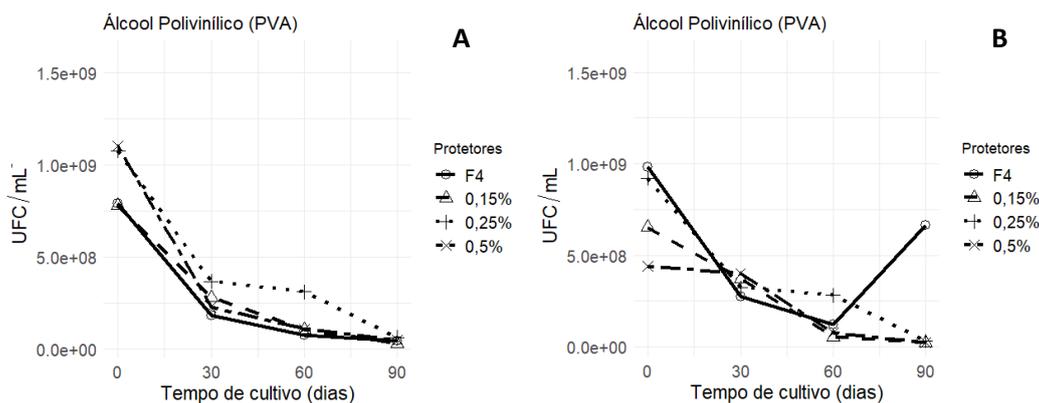
Médias seguidas por letras minúsculas iguais, indicam não haver diferença significativa entre os grupos ao nível de 5% de significância.

#### 4.1 Álcool polivinílico (PVA)

Três concentrações distintas do protetor PVA, e F4 sem adição de protetor (controle), foram utilizadas para a análise da estabilidade de *A. brasilense* e *P. fluorescens*.

Ao avaliar *A. brasilense* no tempo 0, 30 60 e 90 dias, as três concentrações de PVA não apresentaram diferenças estatísticas significativas em relação ao controle (F4 sem protetor).

Considerando a concentração recomendada pelo MAPA (IN 30, 2010), em 30 dias de avaliação, todas as concentrações de PVA se mantiveram acima de  $2,0 \times 10^8$  UFC/mL. Aos 60 dias, apenas PVA 0,25% se manteve acima da concentração recomendada. E em 90 dias, nenhuma das concentrações e controle testados apresentaram concentração  $10^8$ , sendo PVA 0,15% a menor média de crescimento  $3,08 \times 10^7$  UFC/mL. Na análise dos intervalos de tempo do crescimento celular de *A. brasilense* em F4, observou-se um declínio significativo em comparação ao tempo inicial (Figura 12 A).



**Figura 12** - Avaliação da concentração celular em UFC/mL de (A) *Azospirillum brasilenses* estirpes Ab-V5 e Ab-V6 e (B) *Pseudomonas fluorescens*, sob diferentes concentrações de PVA (0,15%, 0,25% e 0,5%) e F4 sem adição de protetor, medidas em intervalos de 0, 30, 60 e 90 dias após o envase.

Para *P. fluorescens* as concentrações de PVA 0,15%, 0,25% e 0,5% não apresentaram diferenças estatísticas significativas em comparação ao controle no tempo inicial, após 30 e 60 dias. Porém, no período de 90 dias, as concentrações apresentaram uma redução significativa na contagem de células viáveis, em relação ao controle, indicando uma redução na eficácia protetora do PVA ao longo do tempo, independentemente da concentração, resultando em uma viabilidade celular comprometida em comparação com a formulação sem protetor.

Quando analisado em relação a UFC/mL, no tempo inicial e 30 dias de envase, as concentrações se mantiveram dentro de  $10^8$ , em 60 dias apenas a concentração de PVA

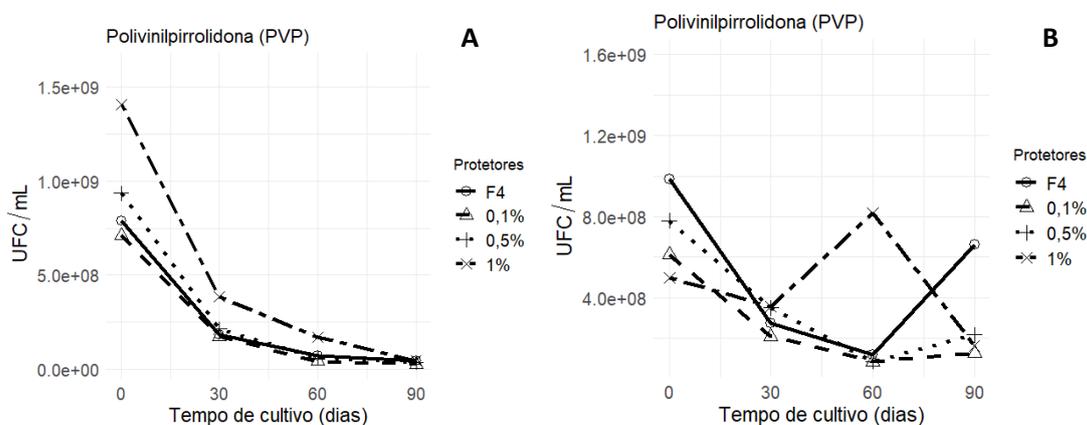
0,25% com  $2,81 \times 10^8$  UFC/mL e em 90 dias apenas o controle F4 com a concentração de  $6,62 \times 10^8$  UFC/mL (Figura 12 B).

Esse resultado abre precedentes para a investigação do uso do PVA, isolado em uma formulação como a F4, ou em combinação a outros protetores, em diferentes concentrações. Estudos, como o realizado por Schuh e Sa (2005) com *Bradyrhizobium*, demonstraram que a combinação de diferentes protetores, como gomas (xantana, jataí, guar, arábica), CMC, PVP e PVA, resultou em um aumento no tempo de vida dos inoculantes. Essa combinação manteve as características de viabilidade e efetividade, proporcionando proteção contra altas temperaturas e dessecação celular. Portanto, ao ser considerado outros parâmetros, os resultados podem variar; contudo, neste ensaio, o uso de F4 sem a adição de nenhum protetor demonstrou ser a opção mais viável em termos de custo-benefício

#### 4.2 Polivinilpirrolidona (PVP)

*A. brasilense* quando exposto as três diferentes concentrações do agente protetor PVP em comparação ao controle F4, não apresentou diferenças estatísticas significativas nos períodos de 30, 60 e 90 dias em comparação ao tempo inicial (dados em material suplementar).

Considerando UFC/mL, as concentrações de PVP se mantiveram acima de  $10^8$  no tempo 0 e aos primeiros 30 dias de avaliação, apenas PVP 0,50% e 1% se mantiveram acima da dose recomendada,  $2,15 \times 10^8$  UFC/mL e  $3,85 \times 10^8$  UFC/mL respectivamente. Aos 60 e 90 dias foi observado uma queda considerável nas análises de estabilidade celular (Figura 13 A).



**Figura 13** - Avaliação da concentração celular em UFC/mL da estirpe (A) *Azospirillum brasilense* Ab-V5 e Ab-V6 e (B) *Pseudomonas fluorescens* sob diferentes concentrações de PVP (0,1%, 0,5% e 1%) e F4 sem adição de protetor, medidas em intervalos de 0, 30, 60 e 90 dias após o envase.

Para o desenvolvimento de *P. fluorescens*, observou-se que a concentração de PVP 0,1% apresentou diferença estatística aos 60 dias em relação ao controle. Aos 90 dias as três concentrações de PVP (0,1%, 0,5% e 1%) apresentaram diferença estatística em relação ao controle F4 no tempo 0, mas não diferiram estatisticamente entre si no mesmo período. Importante ressaltar que após 90 dias, a formulação controle F4 sem protetor obteve a maior média em comparação com as demais formulações.

Em relação a recomendação do MAPA, as concentrações de PVP se mantiveram acima de  $10^8$  aos primeiros 30 dias de avaliação, aos 60 dias apenas a concentração de PVP 1% se manteve da dose recomendada ( $8,18 \times 10^8$  UFC/mL). Aos 90 dias o controle F4 e PVP 0,50% apresentaram uma contagem superior a  $2,0 \times 10^8$  UFC/mL ( $6,62 \times 10^8$  UFC/mL e  $2,18 \times 10^8$  UFC/mL respectivamente) (Figura 13 A).

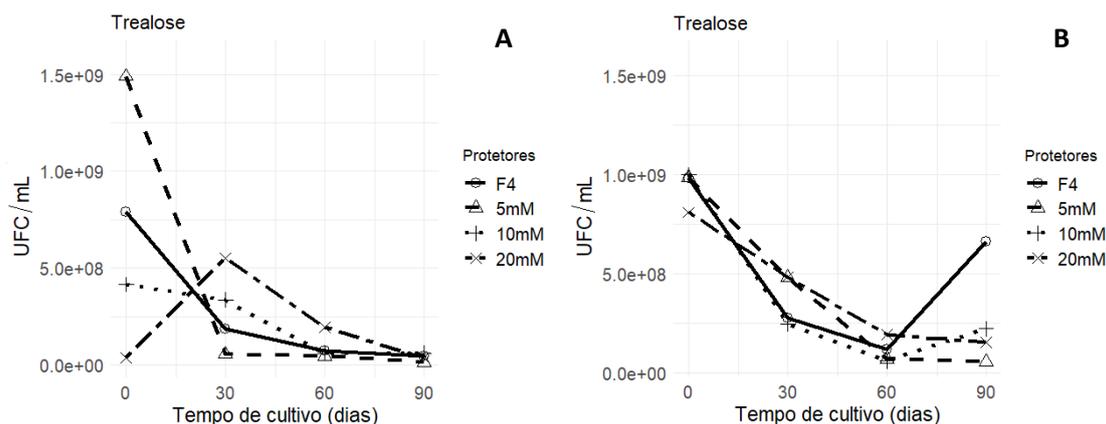
O Polivinilpirrolidona (PVP) é um polímero de amplo interesse e utilização em diversas áreas, dentre elas a área biomédica, farmacêutica, e até mesmo agrícola (Deaker *et al.*, 2004; Teodorescu *et al.*, 2019). A sua ampla aplicação se deve, em grande parte, por oferecer biocompatibilidade e solubilidade em água (Teodorescu e Barcea, 2015). Na área agrícola, por exemplo, o PVP é conhecido por servir como um agente adesivo, capaz de formar um filme protetor sobre as células, evitando a perda de água e garantindo a viabilidade celular (Deaker *et al.*, 2004); além de neutralizar compostos danosos produzidos na rizosfera (Oliveira *et al.*, 2014). Utilizado também como estratégia de encapsulamento ou recobrimento para sementes a base do polímero (Vercelheze *et al.*, 2019). Estudos utilizando este polímero em inoculantes líquidos, já foram conduzidos e, de forma isolada ou em combinação a outros protetores, por exemplo PVA, demonstraram resultados promissores na vida útil de rizobactérias, incluindo *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Bradyrhizobium* e *Bacillus* (Schuh; Sa, 2005; Manikandan *et al.*, 2010; Leo Daniel *et al.*, 2013; Santos, 2017).

### 4.3 Trealose

No estudo da estabilidade celular de *A. brasilense*, exposto a três diferentes concentrações de Trealose, ao analisarmos os grupos por período de cultivo, notou-se que a formulação F4 não exibiu variações significativas ao longo dos três intervalos de tempo (30,60 e 90 dias) avaliados em relação ao tempo inicial. No entanto, no período de 90 dias, a Trealose na concentração de 5mM (P7), demonstrou diferença estatística

significativa em relação ao período inicial, evidenciando uma diminuição no número de células viáveis (Figura 14 A).

Em contagem de UFC/mL apenas em 30 as concentrações de Trealose de 10mM ( $3,35 \times 10^8$  UFC/mL) e 20mM ( $5,50 \times 10^8$  UFC/mL) mantiveram-se acima de  $2,0 \times 10^8$  UFC/mL.



**Figura 14** - Avaliação da concentração celular em UFC/mL da estirpe (A) *Azospirillum brasilense* Ab-V5 e Ab-V6, (B) *Pseudomonas fluorescens* sob diferentes concentrações de Trealose (5mM, 10mM e 20mM) e F4 sem adição de protetor, medidas em intervalos de 0, 30, 60 e 90 dias após o envase.

Durante a avaliação da estabilidade celular de *P. fluorescens*, foi observado concentração mais elevada em 10mM (P8), atingindo um valor médio de  $1,0 \times 10^9$  UFC/mL no tempo inicial. Em contraste, a menor média de crescimento foi registrada na concentração de 5mM (P7) de Trealose, alcançando  $6,0 \times 10^7$  UFC/mL ao final de 90 dias. As outras associações entre grupos e períodos não apresentaram diferenças estatísticas significativas. É importante destacar, contudo, que a formulação sem protetor registrou uma média de crescimento superior ao final do período de 90 dias na avaliação do crescimento de *P. fluorescens*. (Figura 14 B).

Apesar dos resultados de 90 dias não diferirem estatisticamente da F4, a Trealose é um dissacarídeo não redutor, composto por duas moléculas de glicose que interagem por uma ligação glicosídica do tipo  $\alpha$ - $\alpha$  (Portugal, 2019). Devido à estabilidade da ligação e à sua natureza não redutora, a Trealose é capaz de estar presente em processos de estresse abiótico, como a exposição de plantas a períodos de seca (Zhao et al., 2019). Além de servir como fonte energética, a Trealose pode desempenhar papéis importantes como agente osmoprotetor e estabilizador de membrana (Abdelgawad et al., 2014;

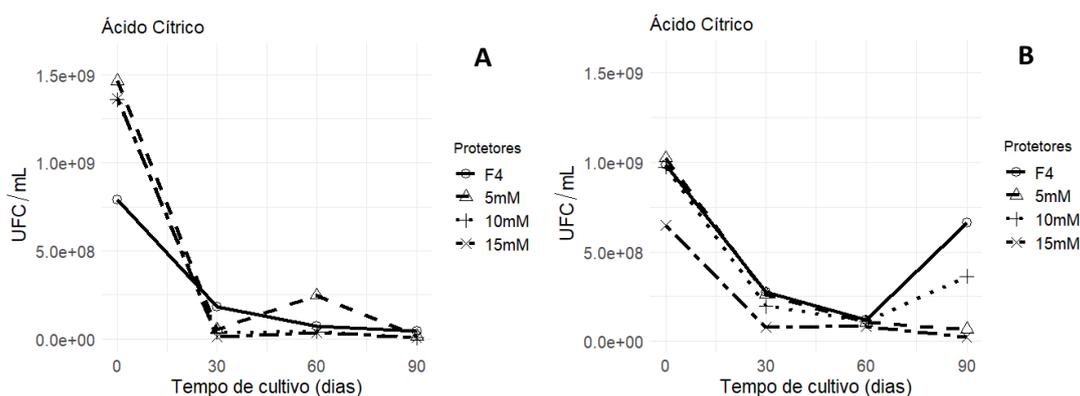
Acosta-Pérez et al., 2020). Assim, é sugerido que a Trealose atue principalmente durante o período inicial, servindo como uma excelente fonte de carbono.

#### 4.4 Ácido Cítrico

Ao analisar as concentrações de Ácido Cítrico foi observado os mesmos padrões de crescimento para *A. brasilense* e *P. fluorescens*, onde foi possível notar que a concentração celular mais alta ocorreu em 5mM no tempo inicial para ambas, e as menores médias de crescimento foram registradas na concentração de 15 mM, atingindo  $5,75 \times 10^6$  UFC/mL e  $2,28 \times 10^7$  UFC/mL respectivamente.

Ao decorrer do tempo as concentrações de Ácido Cítrico apresentaram algumas diferenças estatísticas, como por exemplo, Ácido Cítrico 15mM diferiu estatisticamente de F4 em 30 dias para ambas as estirpes. Porém, aos 90 dias não diferiu de F4 em nenhuma das concentrações testadas (dados suplementares).

Para a concentração de células viáveis, em 60 dias apenas a concentração de 5mM se manteve na concentração de  $10^8$  para *A. brasilense* ( $2,48 \times 10^8$  UFC/mL). Já para *P. fluorescens* em 30 dias F4 e a concentração de 5mM se mantiveram acima da concentração recomendada ( $2,75 \times 10^8$  UFC/mL e  $2,63 \times 10^8$  UFC/mL, respectivamente). Em 90 dias de análise F4 e Ácido Cítrico 10mM apresentaram concentração acima de  $10^8$  (Figura 14 A e B).



**Figura 14** - Avaliação da concentração celular em UFC/mL da estirpe (A) *Azospirillum brasilense* Ab-V5 e Ab-V6, (B) *Pseudomonas fluorescens* sob diferentes concentrações de Ácido Cítrico (5mM, 10mM e 15mM) e F4 sem adição de protetor, medidas em intervalos de 0, 30, 60 e 90 dias após o envase.

O Ácido Cítrico é amplamente utilizado pela indústria, principalmente de alimentos, como conservante e prolongando a vida útil de produtos (Al-Nabulsi *et al.*, 2014), tornando ele uma excelente alternativa para o uso como protetor celular, devido

seu baixo custo como matéria prima. Porém, o ácido cítrico é um ácido tricarboxílico, e já se tem relatos do uso desse ácido por estirpes de *Pseudomonas* (Moura *et al.*, 2015).

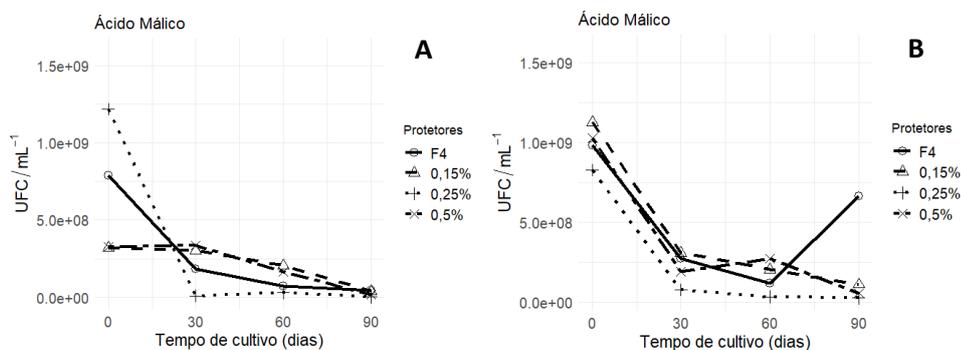
O gênero *Azospirillum* é conhecido, por utilizar este tipo de ácido tricarboxílico como única fonte de carbono (Reis; Pedraza; Teixeira, 2010), o que pode justificar a apresentação do maior declínio de concentrações de células viáveis entre todos os protetores testados, decaindo de  $10^9$  em tempo zero, para  $10^6$  em 90 dias.

Apesar do ácido cítrico ser uma matéria-prima de baixo custo, o melhor custo benefício é a utilização da F4 sem adição dos protetores.

#### 4.5 Ácido Málico

Na análise em relação ao crescimento de *A. brasilense*, submetido a três diferentes concentrações de Ácido Málico (Tabela 3) comparado ao controle sem adição de protetor, ao longo de 30, 60 e 90 dias, observou-se que não houve diferença estatística significativas ao tempo inicial.

Em relação a UFC/mL recomendada pelo MAPA, em 30 dias de avaliação as concentrações de Ácido Málico 0,15% e 05% mantiveram a concentração acima de  $2,0 \times 10^8$  UFC/mL ( $3,03 \times 10^8$  UFC/mL e  $3,38 \times 10^8$  UFC/mL respectivamente) (Figura 15 A).



Ao avaliar o crescimento de *P. fluorescens* no início do estudo, verificou-se que as concentrações de 0,15% e 0,5% Ácido Málico apresentaram diferença estatística significativa em comparação com a concentração de 0,25% observada aos 90 dias. Para as demais concentrações analisadas, não foram identificadas diferenças estatísticas significativas ao comparar os grupos avaliados, tanto dentro de cada período específico quanto entre os diferentes períodos.

O Ácido Málico é um ácido orgânico fraco, pertencente ao grupo dos alfa-hidroxiácidos (AHA), e que se apresenta de duas formas: a forma natural, DL-málico; e a forma sintética, DL-málico (Tang; Yang, 2018). Atualmente, sua forma sintética tem alcançado ampla utilização nas indústrias de cosméticos, alimentícia, química, farmacêutica e na medicina (Calazans, 2021). Relatos na literatura já registraram crescimento de *A. brasilense* na presença de Ácido Málico (Dôbereiner *et al.*, 1995), assim como a utilização do Ácido Málico, em suas duas formas, por algumas estirpes de *Pseudomonas* (Moura *et al.*, 2015).

De modo geral, o ácido málico foi bem aceito pelo consórcio bacteriano, porém as variações no crescimento de células viáveis nos intervalos de 0, 30, 60 e 90 dias de cultivo não apresentaram diferença significativa com relação ao controle F4 sem adição protetor. Destaca-se que F4 já apresentava Ácido Málico em sua composição, o que pode justificar os resultados por uma superdose de matéria-prima.

Todos os protetores utilizados com objetivo de prolongar a vida útil de *Azospirillum* e *Pseudomonas*, cultivados em consórcio ao final de 90 dias não apresentaram diferenças estatísticas superiores a F4 sem adição de protetor. Os protetores que apresentaram diferença estatística ao longo do período avaliado como: Ácido Cítrico 15mM para *Pseudomonas*. Trealose 5mM e Ácido Málico 0,25% para *Azospirillum*, apresentaram UFC/mL estatisticamente menor que o controle F4. Por isso, considera-se que F4 é economicamente viável para o escalonamento industrial, Porém deve-se levar em consideração a adição de algum dos protetores em baixas concentrações, pensando nos efeitos adversos que o meio ambiente possui, como calor, chuvas, seca entre outros fatores que não temos controle nos campos.

## **5.0 Comparação entre métodos de avaliação de células viáveis para *Azospirillum brasilense* e *Pseudomonas fluorescens* por meio da técnica convencional e por qPCR no período de 90 dias**

Após um período de 90 dias de análise da estabilidade celular, foram selecionados sete tratamentos distintos (PVA 0,25%, PVP 0,5%, Trealose 5 mM, Trealose 20 mM, Ácido Cítrico 5 mM, Ácido Málico 0,15% e Ácido Málico 0,5%) além do grupo controle F4, desprovido de qualquer agente protetor. Esses tratamentos foram escolhidos com base em critérios que garantiram a proximidade ou superação da concentração celular recomendada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que é de  $2,0 \times 10^8$  UFC/mL. Essa seleção permitiu a realização de uma análise quantitativa por

PCR em tempo real (qPCR) com o objetivo de determinar e comparar as concentrações de células viáveis das estirpes de *A. brasilense* e *P. fluorescens* em relação ao método tradicional de plaqueamento.

Para as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *A. brasilense*, ao analisar os dados obtidos por qPCR, não foram observadas diferenças significativas entre os sete tratamentos e o grupo controle F4, quando utilizou o mesmo método de avaliação (Tabela 8). Mas quando se comparou o método convencional ao método qPCR para todos os protetores, observou-se diferença significativa entre os métodos.

**Tabela 8** – Quantificação do número de colônias de *A. brasilense* em formulação F4 com adição de PVA, PVP, Trealose, Ácido Cítrico e Ácido Máfico utilizando os métodos Convencional e qPCR.

<i>A. brasilense</i>	UFC/mL	
	Convencional	qPCR
F4	$4,52 \times 10^7 \pm 1,01 \times 10^7$ cd	$4,26 \times 10^{10} \pm 2,69 \times 10^9$ a
PVA 0,25%	$6,33 \times 10^7 \pm 8,17 \times 10^6$ bcd	$7,23 \times 10^9 \pm 1,09 \times 10^9$ ab
PVP 0,5%	$3,70 \times 10^7 \pm 1,58 \times 10^7$ d	$4,79 \times 10^9 \pm 2,07 \times 10^8$ abc
Trealose 5mM	$1,40 \times 10^7 \pm 8,08 \times 10^6$ e	$4,42 \times 10^{10} \pm 5,81 \times 10^9$ a
Trealose 20mM	$3,65 \times 10^7 \pm 1,01 \times 10^7$ cd	$1,52 \times 10^{10} \pm 1,87 \times 10^9$ a
Ácido Cítrico 5mM	$1,43 \times 10^7 \pm 7,72 \times 10^6$ d	$2,73 \times 10^{10} \pm 3,49 \times 10^9$ a
Ácido Máfico 0,15%	$4,10 \times 10^7 \pm 5,85 \times 10^6$ cd	$3,08 \times 10^{10} \pm 8,97 \times 10^9$ a
Ácido Máfico 0,5%	$1,73 \times 10^7 \pm 1,31 \times 10^6$ d	$2,02 \times 10^{10} \pm 5,13 \times 10^8$ a

Médias seguidas por letras minúsculas iguais, indicam não haver diferença significativa entre os grupos ao nível de 5% de significância.

Em relação a contagem de células viáveis, pelo método qPCR, o protetor Trealose 5mM apresentou a maior média para *A. brasilense* com  $4,42 \times 10^{10}$  UFC/mL, enquanto o mesmo protetor no método convencional, apresentou a menor média de células viáveis com  $1,40 \times 10^7$  UFC/mL. De maneira geral, para a bactéria *Azospirillum brasilense*, o método qPCR foi estatisticamente superior ao método convencional. Este fato pode estar relacionado a capacidade da técnica qPCR em detectar células não cultiváveis em meio sólido, mas viáveis na formulação (Cattani, 2012; Sampaio, 2017).

Um número significativamente maior de bactérias (entre  $10^5$  e  $10^7$ ) foi observado ao se compararem os métodos de qPCR com o método convencional, após a inoculação de *A. brasilense* no milho, conforme descrito por Couillerot et al. (2010a). Esses resultados estão em consonância com as descobertas deste estudo ao comparar os diferentes métodos de avaliação de células viáveis.

Para a estirpe de *P. fluorescens* foram identificadas diferenças significativas apenas no tratamento com Ácido Málico 0,5% em comparação ao controle F4, no método convencional. As médias observadas em F4, PVA 0,25%, PVP 0,5%, Trealose 20mM (P9), Ácido Cítrico 5mM (P10) e Ácido Málico 0,15% (P13) pelo método qPCR foram equivalentes às médias encontradas no método convencional. Por outro lado, as médias de Ácido Málico 0,5% (P15) obtidas pelo método qPCR também se mostraram distintas em comparação ao método convencional (Tabela 9).

**Tabela 9** – Quantificação do número de colônias de *P. fluorescens* em formulação F4 com adição de PVA, PVP, Trealose, Ácido Cítrico e Ácido Málico utilizando os métodos Convencional e qPCR.

<i>P. fluorescens</i>	UFC/mL	
	Convencional	qPCR
F4	$6,62 \times 10^8 \pm 8,22 \times 10^7$ a	$2,87 \times 10^9 \pm 1,15 \times 10^8$ a
PVA 0,25%	$3,18 \times 10^7 \pm 3,68 \times 10^6$ a	$1,63 \times 10^9 \pm 5,39 \times 10^7$ a
PVP 0,5%	$2,18 \times 10^8 \pm 9,72 \times 10^7$ a	$3,22 \times 10^9 \pm 1,51 \times 10^8$ a
Trealose 5mM	$5,75 \times 10^7 \pm 3,57 \times 10^6$ a	$1,63 \times 10^9 \pm 1,99 \times 10^8$ a
Trealose 20mM	$1,53 \times 10^8 \pm 1,44 \times 10^7$ a	$2,15 \times 10^9 \pm 4,68 \times 10^8$ a
Ácido Cítrico 5mM	$6,68 \times 10^7 \pm 4,87 \times 10^6$ a	$3,74 \times 10^9 \pm 3,06 \times 10^8$ a
Ácido Málico 0,15%	$1,11 \times 10^8 \pm 2,90 \times 10^7$ a	$4,13 \times 10^9 \pm 4,99 \times 10^8$ a
Ácido Málico 0,5%	$5,75 \times 10^7 \pm 3,38 \times 10^7$ b	$5,05 \times 10^9 \pm 6,80 \times 10^8$ a

Médias seguidas por letras minúsculas iguais, indicam não haver diferença significativa entre os grupos ao nível de 5% de significância.

Quanto a contagem de células viáveis da *Pseudomonas fluorescens*, no período de 90 dias, observou-se que o protetor contendo Ácido Málico 0,5% apresentou as maiores médias, alcançando  $5,05 \times 10^9$  UFC/mL., enquanto as formulações contendo PVA 0,25% e Trealose 5mM registraram as médias mais baixas do método (qPCR), ambas com  $1,63 \times 10^9$  UFC/mL. Já para o método convencional o controle F4 obteve a maior média, com  $6,62 \times 10^8$  UFC/mL, enquanto a menor média foi observada no protetor PVA 0,25%, com  $3,18 \times 10^7$  UFC/mL, mantendo-se este protetor com a menor quantidade de células viáveis em ambos os métodos avaliados.

Considerando as normas exigidas, a menor média encontrada pelo método qPCR para *A. brasilense*, se manteve dentro da mínimo exigido pelo MAPA ( $2,0 \times 10^8$  UFC/mL), que foi no valor de  $4,79 \times 10^9$  UFC/mL, no protetor PVP 0,5%. Assim como, todos os tratamentos para *P. fluorescens*, que se mantiveram na concentração de  $10^9$ , tendo a menor média na concentração de  $1,63 \times 10^9$  UFC/mL. Estes resultados corroboram com a

sensibilidade verificada pelo método de qPCR em relação ao método convencional, o que pode estar relacionando a capacidade da qPCR amplificar o DNA de células viáveis, porém não cultiváveis. Já na técnica convencional, apenas são quantificadas as células presentes na amostra (Mendis *et al.*, 2018).

De forma semelhante aos resultados observados para *A. brasilense*, o método qPCR empregado para a quantificação de *P. fluorescens* foi estatisticamente superior ao método convencional.

Diversos estudos vêm demonstrando a maior eficiência da qPCR na quantificação de bactérias em relação a contagem em placa. Mendis *et al.* (2018) quantificaram uma população bacteriana de *Bacillus firmus* (I-1582) maior, que a determinada pela contagem em diluição em placa, em raiz de milho inoculadas com a estirpe, em diferentes coletas. Da Silva (2017) comparou as técnicas de quantificação estirpe-específica por qPCR e contagem por microgota das bactérias diazotróficas constituintes do inoculante de cana-de-açúcar a base de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* HCC103, *Herbaspirillum seropedicae* HRC54, *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5, *Nitrospirillum amazonense* CbAmc e *Paraburkholderia tropica* Ppe8. Foi observado um maior número de bactérias das estirpes de *H. rubrisubalbicans* HCC103 e *H. seropedicae* HRC54 pela técnica de qPCR. Ilha *et al.* (2016), relataram maior sensibilidade da técnica de qPCR na quantificação de *Lactobacillus paracasei* em amostras de iogurte após 28 dias de fabricação, apresentando diferença significativa comparada a contagem em placa. Outros autores também evidenciam a eficácia do qPCR como uma ferramenta precisa e eficiente na quantificação de genes alvo. Isso o torna adequado para o monitoramento rápido e confiável de microrganismos tanto em ambientes controlados quanto em ambientes naturais (Sorenses *et al.*, 2009, Couillerot *et al.*, 2010b; Felten; Défago; Maurhofer, 2010).

A utilização do qPCR para a quantificação absoluta apesar de ser simples, econômico e altamente sensível (Ahn *et al.*, 2020) até o momento, não é aceita como método de controle de qualidade pelos órgãos reguladores dos bioinsumos/inoculantes biológicos. Porém, vem ganhando espaço em diversas áreas do conhecimento tais como: segurança alimentar (Rodríguez-Lázaro *et al.*, 2013), saneamento básico (Monllor, 2013), laticínios (Ilha *et al.*, 2016), fitopatologia (Luchi *et al.*, 2016), controle de qualidade de biofertilizantes (Stropa, 2009) dentre outras.

No levantamento bibliográfico realizado, constata-se uma escassez de estudos relacionados à utilização da técnica de qPCR para a avaliação da estabilidade de inoculantes líquidos, especificamente em relação às estirpes de *Azospirillum brasilense* e *Pseudomonas fluorescens*.

No entanto, como já demonstrado acima, um amplo número de estudos demonstra a eficácia da técnica de qPCR na quantificação de organismos que interagem de forma patogênica ou benéfica com as plantas. Alguns outros exemplos são: Couillerot e colaboradores (2010a) empregaram a qPCR para quantificar a bactéria *Azospirillum lipoferum* (estirpe CRT1) na rizosfera de plantas jovens de milho. Da mesma forma, a espécie bacteriana *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5<sup>T</sup> foi quantificada por qPCR em amostras de DNA extraídas de tecidos de cana-de-açúcar (Boa Sorte, 2013; Boa Sorte *et al.*, 2014). Stets e colaboradores (2015) realizaram a quantificação da população da bactéria *Azospirillum brasilense* (estirpe FP2) em tecidos de trigo utilizando a qPCR, a qual demonstrou maior sensibilidade em comparação com a técnica de contagem em placas. Esses resultados corroboram com o presente estudo, evidenciando que a qPCR é uma ferramenta precisa e sensível para a quantificação de microrganismos específicos.

Para o método convencional foi necessário a utilização do antimicrobiano estreptomicina para a inibição do crescimento de *P. fluorescens*, em meio RC, devido a diferença de tempo crescimento das estirpes, o que pode ter interferido de forma indireta no crescimento das estirpes de *A. brasilense* em placa. Uma vez que, *Azospirillum* apresenta alto grau de pleomorfismo das células e variações nas colônias dentro da espécie, dependendo da cepa, composição do meio e condições de cultura (Becking, 1985), reforçando o desafio encontrado na quantificação de células viáveis, utilizando o método convencional.

Outro fato sobre o gênero *Azospirillum* é a capacidade floclulação durante seu cultivo. Na floclulação células vegetativas desenvolvem uma camada externa de polissacarídeos, perdem a motilidade, assumem uma forma esférica aumentada, se acumulam e formam grânulos abundantes de poli- $\beta$ -hidroxibutirato (Sadasivan; Neyra 1985, 1987), dificultando a capacidade de contagem.

Segundo a metodologia de qPCR do fabricante os *kits* de extração têm o objetivo de detectar seletivamente o DNA de células viáveis através de agentes intercalante e feixes de luz. No levantamento bibliográfico, agentes intercalantes de DNA etídio monoazida (EMA) (Rudi; Dromtorp; Holck, 2005) e propídio moazida (PMA), tem sido

associado à técnica de qPCR com o objetivo de detectar seletivamente o DNA de células viáveis (Nocker; Cheung; Camper, 2006, Taskin; Gozen; Duran, 2011).

EMA e PMA possuem a capacidade de penetrar na membrana celular comprometida de células mortas e se ligar covalentemente ao DNA após foto-indução do grupo azida, inibindo a sua amplificação através da qPCR. Por outro lado, o DNA de célula viável não sofre ação do agente intercalante, uma vez que a célula possui membrana intacta (Nocker; Cheung; Camper, 2007, Yanez *et al.*, 2011). Estes dois intercalantes têm-se mostrado úteis para diferenciação de células viáveis e mortas, tanto de bactérias Gram-positivas quanto de Gram-negativas (Nocker; Cheung; Camper, 2006). No entanto, estudos demonstraram que o EMA é um indicador limitado de viabilidade celular, pois é incorporado também em células viáveis, levando à perda substancial de detecção de DNA oriundo de célula viável (Cawthorn; Witthun, 2008, Flekna *et al.*, 2007).

Portanto, a presença de bactérias cultiváveis e de bactérias que estejam no estado viável, mas não cultivável, pode ser detectada pela qPCR associada ao tratamento com EMA/PMA, inibindo a detecção de DNA proveniente de células mortas. Desta forma, o tratamento com EMA/PMA, tem o potencial de limitar a análise do DNA originário somente de células bacterianas com membrana celular intacta.

## CONCLUSÃO

A partir dos testes de formulações concluiu-se que a F4 foi a formulação mais estável para consórcio bacteriano entre as estirpes de *A. brasilense* e *P. fluorescens*.

Não foram identificadas diferenças significativas nos parâmetros avaliados entre o grupo controle F4 sem protetor e o grupo F4 adicionado dos diferentes protetores em nenhuma das concentrações testadas durante o período de 90 dias. Isso sugere a possibilidade de considerar o uso de F4 com a adição do protetor de menor custo e em baixas concentrações. Essa consideração leva em conta os potenciais efeitos adversos do armazenamento e das condições ambientais, tais como calor, chuva, seca, entre outros fatores que não são controláveis no campo.

A comparação entre as técnicas de quantificação convencional e de qPCR permitiu concluir que a utilização de técnicas de biologia molecular, incluindo a seleção de primers específicos para microrganismos-alvo e a construção de uma curva padrão, é viável para o controle de qualidade de inoculantes comerciais e em desenvolvimento. A técnica de qPCR demonstrou alta sensibilidade na contagem de células viáveis nos

inoculantes, bem como na detecção rigorosa de contaminações, sendo requisitos cruciais para assegurar a eficácia do produto.

## REFERÊNCIAS

ABDELGAWAD, Z. *et al.* Accumulation of Trehalose Mediates Salt Adaptation in Rice Seedlings. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, v. 14, p. 1450-1463, 2014. Doi: 10.5829/idosi.aejaes.2014.14.12.12492

ACOSTA- PÉREZ, P. *et al.* Characterization of Trehalose-6-phosphate Synthase and Trehalose-6-phosphate Phosphatase Genes and Analysis of its Differential Expression in Maize (*Zea mays*) Seedlings under Drought Stress. *Plants (Basel)*, v. 3, p. 313- 315, 2020. Doi: 10.3390/plants9030315

AL-NABULSI, A.A.; OLAIMAT, A.N.; OSAILI, T.M.; SHAKER, R.R.; ELABEDEEN, N.Z.; JARADAT, Z.W.; ABUSHELAIBI, A.; HOLLEY, R.A. Use of acetic and citric acids to control *Salmonella* Typhimurium in tahini (sesame paste). *Food Microbiology*, v. 42, p. 102-108, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2014.02.020>

AHN, Y.; GIBSON, B.; WILLIAMS, A.; ALUSTA, P.; BUZATU, D. A.; LEE, Y. -J.; LIPUMA, J. J.; HUSSONG, D.; MARASA, B.; CERNIGLIA, C. E. Comparison of culture methods, real-time PCR, droplet digital PCR and flow cytometry for the detection of the Burkholderia cepacia complex in nuclease- and antiseptic-free water. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. v. 47, p.475–484, 2020. <http://dx.doi.org/10.1007/s10295-020-02287-3>.

BAHAT-SAMET, E.; CASTRO-SOWINSKI, S.; OKON, Y. Arabinose content of extracellular polysaccharide plays a role in cell aggregation of *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 273, n.2, p. 195-203, 2004.

BARRETO, Maíra Mercês. **Formação de biofilme por rizobactérias isoladas de plantas do semi-árido baiano**. 2009. 107 f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2009.

BASHAN, Y.; TREEJO, A.; de-BASHAN, L. E. Development of two culture media for mass cultivation of *Azospirillum* spp. and for production of inoculants to enhance plant growth. *Biology Fertility of Soils*, v.47, p.963–969, 2011. Doi: 10.1007/s00374-011-0555-3

BASHAN, Y.; de-BASHAN, L. E.; PRABHU, S. R.; HERNANDEZ, J. P. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998-2013). *Plant and Soil*, v. 378, n. 1/2, p. 1-33.

BAUER, A. W. *et al.* Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method *American Journal of Clinical Pathology*, v. 45, n. 4, abr, 1966.

BECKING, J.H. Pleomorphism in *Azospirillum* IN: Klingmuller W (ed) *Azospirillum* III: genetics, physiology, ecology. Springer, Berlin, pp. 243-263, 1985.

BELLABARBA, A.; FAGORZI, C.; di CENZO, G. C.; PINI, F.; VITI, C.; CHECCUCCI, A. Deciphering the Symbiotic Plant Microbiome: Translating the Most Recent Discoveries on Rhizobia for the Improvement of Agricultural Practices in Metal-Contaminated and High Saline Lands. **Agronomy**, v. 9, p. 529, 2019. Doi: 10.3390/agronomy9090529

BOA SORTE, P. M. F. Estabelecimento de bactérias diazotróficas endofíticas inoculadas em cana-de-açúcar cultivada em duas regiões do Brasil. **Instituto de Agronomia, Departamento de Solos**, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. p. 106. 2013.

BOA SORTE, P. M. F.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; MELO, L. H. V.; GALISA, P. S.; LEAL, L.; BALDANI, J. I. & BALDANI, V. L. D. Development of a real-time PCR assay for the detection and quantification of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane grown under field conditions. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, n.31, 2014. Doi: 10.5897/AJMR2014.6779. pp. 2937-2946.

BURDMAN, S.; OKON, Y.; JURKEVITCH, E. Surface characteristics of *Azospirillum brasilense* in relation to cell aggregation and attachment to plant roots. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 91–110, 2000.

CALAZANS, Marla Oliveira. **Efeito antinociceptivo do extrato de *Cissus gongylodes* (baker) planch., da substância isolada (ácido málico) e a participação do sistema canabinoide e da via NO/GMPc/Katp**. 2021.122 f. Dissertação (Mestrado) Curso Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2021.

CARRASCO-ESPINOSA, K. *et al.* Positive effect of reduced aeration rate on growth and stereospecificity of dl-malic acid consumption by *Azospirillum brasilense*: Improving the shelf life of a liquid inoculant formulation, **Journal of Biotechnology**, v.195, p.74-81, feb, 2015. doi: 10.1016/j.jbiotec.2014.12.020

CASSÁN, F. *et al.* Everything you must know about *Azospirillum* and its impact on agriculture and beyond. **Biology and Fertility Soils**, v. 56, p.461–479, 2020. Doi:<https://doi.org/10.1007/s00374-020-01463-y>

CATTANI, Fernanda. **Detecção e quantificação de células de *Bacillus sporothermodurans* e de *Bacillus cereus* em leite através de PCR convencional e de PCR em tempo real associadas ao propídio monoazida**. 2012. 139 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular). Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2012.

CESARI, A. B. *et al.* Immobilization of *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* in alginate matrix for long time of storage maintains cell viability and interaction with peanut. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.104, p.10145–10164, 2020. Doi:10.1007/s00253-020-10910-7

CONTRERAS-CORNEJO, H. A. *et al.* Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: interactions with plants. **FEMS Microbiology Ecology**, v.92, n.4, p. fiw036, 2016. Doi:10.1093/femsec/fiw036

DEAKER, R.; ROUGHLEY, R. J., KENNEDY, I. R. Legume seed inoculation technology - a review. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, p. 1275-1288, 2004. Doi: 10.1016/j.soilbio.2004.04.009

CAWTHORN, D. M., WITTHUHN, R. C. Selective PCR detection of viable *Enterobacter sakazakii* cells utilizing propidium monoazide or ethidium bromide monoazide. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, p. 1178-1185, 2008.

COUILLEROT, O.; BOUFFAUD, M.L.; MULLER, D.; CABALLERO-MELLADO, J.; MOËNNE-LOCCOZ, Y. Development of a real-time PCR method to quantify the PGPR strain *Azospirillum lipoferum* CRT1 on maize seedlings. **Soil Biology and Biochemistry**. v.42, p.2298–2305, 2010a.

COUILLEROT, O. *et al.* Assessment of SCAR markers to design real-time PCR primers for rhizosphere quantification of *Azospirillum brasilense* phytostimulatory inoculants of maize. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 2, p. 528–538, 2010b.

COUILLEROT, O.; COMBES-MEYNET, E.; POTHIER, J. F.; BELLVERT, F.; CHALLITA, E.; POIRIER, M. A.; ROHR, R.; COMTE, G.; MOËNNE-LOCCOZ, Y.; PRIGENT-COMBARET, Y. O papel do composto antimicrobiano 2,4-diacetilfloroglucinol no impacto do biocontrole de *Pseudomonas fluorescens* F113 em fitoestimuladores de *Azospirillum brasilense*. **Microbiologia**. v.157, p.1694–1705, 2011.

DA SILVA, C. G. **Uso da Técnica de PCR em Tempo Real para Quantificação de Bactérias Diazotróficas Endofíticas em Tecidos de Cana-de-açúcar**. UFRRJ, 2017.

DIAS, Jose Manuel Cabral de Sousa. **Cultivo de *Azospirillum brasilense* sp 245 em frutose ou glicerol como fontes de carbono para produção de inoculantes agrícolas**. 1988. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1988. Acesso em: 03 out. 2023.

DÍAZ, Pablo R. *et al.* Lettuce growth improvement by *Azospirillum argentinense* and fluorescent *Pseudomonas* co-inoculation depends on strain compatibility. **Applied Soil Ecology**, v.189, p. 104969, 2023. Doi: 10.1016/j.apsoil.2023.104969

DÍAZ, Pablo R. *et al.* *Azospirillum baldaniorum* Sp245 exploits *Pseudomonas fluorescens* A506 biofilm to overgrow in dual species macrocolonies. **Environmental Microbiology**, v. 24, p.5707-5720, 2022. Doi: 10.1111/1462-2920.16195

DÔBEREINER, Johanna; BALDANI, Vera Lúcia D.; BALDANI, José I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília, DF: EMBRAPA- SPI, 1995. 60p.

ELNAHAL, A. S. M. *et al.* The use of microbial inoculants for biological control, plant growth promotion, and sustainable agriculture: A review. **European Journal of Plant Pathology**, v.162, p.759–792, 2022. Doi: 10.1007/s10658-021-02393-7

FELTEN, A. VON; DÉFAGO, G.; MAURHOFER, M. Quantification of *Pseudomonas fluorescens* strains F113, CHA0 and Pf153 in the rhizosphere of maize by strain-specific real-time PCR unaffected by the variability of DNA extraction efficiency. **Journal of Microbiological Methods**, v. 81, n. 2, p. 108–115, 2010.

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

FLEKNA, G., STEFANIC, P., WAGNER, M., SMULDERS, F. J., MOZINA, S. S., HEIN, I. Insufficient differentiation of live and dead *Campylobacter jejuni* and *Listeria monocytogenes* cells by ethidium monoazide (EMA) compromises EMA/real-time PCR. **Research Microbiology**, v.158, p. 405-412, 2007.

FLORENCIO, C.; BORTOLETTO-SANTOS, R.; FAVARO, C. P. *et al.* Avanços na produção e formulação de inoculantes microbianos visando uma agricultura mais sustentável. **Química Nova**, v. 45, n. 9, 2022. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170909>

FUKAMI, J.; OLLERO, F. J.; MEGÍAS, M.; HUNGRIA, M. Phytohormones and induction of plant-stress tolerance and defense genes by seed and foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* cells and metabolites promote maize growth. **AMB Express**. v.7, p.153, 2017.

GALINDO, F. S.; TEIXEIRA, M. C. M.; BUZETTI, S.; LUDKIEWICZ, M. G. Z.; ROSA, P. A. L.; TRITAPEPE, C. A. Technical and economic viability of co-inoculation with *Azospirillum brasilense* in soybean cultivars in the Cerrado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola Ambiental**. v. 22, p. 51-56.

GARCIA, M. V. C.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Combining microorganisms in inoculants is agronomically important but industrially challenging: case study of a composite inoculant containing *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* for the soybean crop. **AMB Express**, v.11, n.71, 2021. Doi: 10.1186/s13568-021-01230-8

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

GUPTA, C. P.; DUBEY, R. C.; MAHESHWARI, D. K. Aumento do crescimento vegetal e supressão de *Macrophomina phaseolina* causando podridão do carvão de amendoim por *Pseudomonas* fluorescentes. **Biologia e Fertilidade dos Solos**, v. 35, p. 399–405.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: Strategies to improve sustainability. **Biology and Fertility of Soils**, v. 49, p. 791–801, 2013.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Soybean Seed Co-Inoculation with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense*: A New Biotechnological Tool to Improve Yield and Sustainability. **American Journal of Plant Sciences**, v. 6, p. 811–817, 2015.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2001. p. 48 (Embrapa Soja. Circular Técnica, n.35; Embrapa Cerrados. Circular Técnica, n. 13).

ILHA, E. C.; SCARIOT, M. C. TREML, D.; PEREIRA, T. P. SANT'ANNA, E. S.; PRUDÊNCIO, E. S.; ARISI, A. C. M. Comparison of real-time PCR assay and plate count for *Lactobacillus paracasei* enumeration in yoghurt. **Annals of Microbiology**, v. 66, p. 597–606, 2016. doi: 10.1007/s13213-015-1137-7.

JUGE, C.; PRÉVOST, D.; BIPFUBUSA, M.; CHALIFOUR, F. P. Growth and biochemical responses of soybean to double and triple microbial associations with *Bradyrhizobium*, *Azospirillum* and arbuscular mycorrhizae. **Applied Soil Ecology**. v. 61, p. 147-157, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil2012.05.006>

KADMIRI, I. M. *et al.* Bioformulation of Microbial Fertilizer Based on Clay and Alginate Encapsulation. **Current Microbiology**, v.78, p.86–94, out, 2021. Doi:10.1007/s00284-020-02262-2

KHAN, F.; TABASSUM, N.; BAMUNUARACHCHI, N. I.; KIM, Y-M. Phloroglucinol and its derivatives: antimicrobial properties toward microbial pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.70, n.16, p.4817–4838, 2022. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c00532>

LEO DANIELA E. *et al.* Effect of polymeric aditives, adjuvants, surfactants on survival, stability and plant growth promoting ability of liquid bioinoculants. **Journal of Plant Physiology & Pathology**, v.1, p. 1-5, mai, 2013. Doi: 10.4172/jppp.1000105

LOBO, C. B. *et al.* Development of low-cost formulations of plant growth-promoting bacteria to be used as inoculants in beneficial agricultural technologies. **Microbiological Research**, v.219, p.12-25, fev, 2019. Doi: 10.1016/j.micres.2018.10.012

LUCHI, N.; CAPRETTI, P.; PAZZAGLI, M.; PINZANI, P. Powerful qPCR assays for the early detection of latent invaders: interdisciplinary approaches in clinical cancer research and plant pathology. **Applied Microbiology Biotechnology**. v.100, p.5189–5204. Doi: 10.1007/s00253-016-7541-5. 2016.

MAPA (2011) **Instrução Normativa N° 13, de 24 de março de 2011**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <[https:// www. gov. br/ agricultura/ pt- br/ assun tos/ insum os- agrop ecuar ios/ insum os- agric olas/ fertilizantes/ legis lacao/ in- sda- 13- de- 24- 03- 2011- inocu lantes. pdf/ view](https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/fertilizantes/legislacao/in-sda-13-de-24-03-2011-inoculantes.pdf/view)>. Acesso em: 13 Mai 2023.

MANIKANDAN, R. *et al.* Standardization of liquid formulation of *Pseudomonas fluorescens* Pfl for its efficacy against *Fusarium* wilt of tomato. **Biological Control**, v. 54, p. 83-89, ago, 2010. Doi: 10.1016/j.biocontrol.2010.04.004

MARCELINO, P. R. F. **Desenvolvimento de meios de cultivo e formulações inoculantes para *Azospirillum brasilense* AbV5**. 2012. 116 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

MARONICHE G. A. *et al.* Friends or foes in the rhizosphere: traits of fluorescent *Pseudomonas* that hinder *Azospirillum brasilense* growth and root colonization. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 94, p.1-10, dez, 2018. Doi:10.1093/femsec/fiy202

MALUSÁ, E.; VASSILEV, N. A contribution to set a legal framework for biofertilisers. **Applied Microbiology and Biotechnology**, V. 98, p. 6599-6607, 2014. Doi: 10.1007/s00253-014-5828-y

MENDIS, H. C. *et al.* Strain-specific quantification of root colonization by plant growth promoting rhizobacteria *Bacillus firmus* I-1582 and *Bacillus amyloliquefaciens* QST713 in non-sterile soil and field conditions. **PLoS ONE**, v. 13, n. 2, p. 1–19, 2018.

MOAZEZIKHO, A.; CHAREHGANI, H.; ABDOLLAHI, M. *et al.* Evidências do efeito inibitório de *Pseudomonas fluorescens* CHA0 e extratos aquosos em tomateiro infectado com *Meloidogyne javanica* (Tylenchida: Heteroderidae). **Egito Journal Biological Controle de Pragas**. v.30, n. 15, 2020. <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00217-0>

MONLLOR, N. F. **Desarrollo y validación de un nuevo sistema de detección molecular basado en qPCR de *Legionella* spp. en muestras ambientales**. 2013. 63 f. Máster. Instituto Universitario del Agua y de las Ciéncias Ambientales. Universidad de Alicante. 2013.

MOURA Luísa *et al.* Identificação e caracterização de *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) na Região do Entre Douro e Minho (Portugal). **Revista de Ciências Agrárias**, v. 38, n. 2, p.196-205, 2015. Doi: <https://doi.org/10.19084/rca.16915>

NOCKER, A.; SOSSA, P.; BURR, M.; CAMPER, A. K. Use of propidium monoazide for live–dead distinction in microbial ecology. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 5111-5117, 2007.

NOCKER, A.; CHEUNG, C.Y.; CAMPER, A.K. Comparison of propidium monoazide and ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. **Journal of Microbiology Methods**, v. 67, p.310-320, 2006.

NOGUEIRA, Antonio E. P. **Bioindicadores da qualidade do solo em cultivo de milho sob déficit hídrico e Bioinoculantes**. 2022. 41 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Agronomia) - Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar, Universidade Federal de Campina Grande, Pombal, Paraíba, Brasil, 2022.

OLIVEIRA, A. L. M. *et al.* Biodiversity of soil bacteria and its applications for a sustainable agriculture. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 3, p. 56-77, 2014. Doi: 10.5433/2316-5200.2014v3n1p56

OKON, Y. C.; LABANDERA-GONZALES, C.; LAGE, M.; LAGE, P. Aplicações agrônômicas de *Azospirillum* e outros PGPR. In: de Bruijn FJ (ed) *Fixação biológica de*

nitrogênio, **John Wiley & Sons Inc**, Nova Iorque, v.2, p. 925–936. <https://doi.org/10.1002/9781119053095>

OMER, A. M.; OSMAN, M. S.; BADAWY, A. A. Inoculation with *Azospirillum brasilense* and/or *Pseudomonas geniculata* reinforces flax (*Linum usitatissimum*) growth by improving physiological activities under saline soil conditions. **Botanical Studies**, v.19, p.63:15, 2022. Doi: 10.1186/s40529-022-00345-w

PAGNUSSAT, L. A. *et al.* Interspecific cooperation: enhanced growth, attachment and strain-specific distribution in biofilms through *Azospirillum brasilense*-*Pseudomonas protegens* co-cultivation. **FEMS Microbiology Letters**, v.363, p.1-9, 2016. Doi:10.1093/femsle/fnw238

PEDRINHO, Eliamar Aparecida Nascimbem. 2009. 74 f. **Isolamento e caracterização de bactérias promotoras de crescimento em milho (*Zea mays*)**. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias e Veterinárias). Universidade Estadual Paulista. 2009.

PORTUGAL, Joice Aparecida de Novais. **Derivados de trealose no sistema antioxidante e fotossintético de plantas de milho expostas ao déficit hídrico**. 2019. 55 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2019.

PRASAD, A. A.; BABU, S. Compatibility of *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* in growth promotion of groundnut (*Arachis hypogea* L.). **Biological Sciences**, n.89, p.1028-1040, 2017. Doi: 10.1590/0001-3765201720160617

REIS, V. M.; PEDRAZA, R. O.; TEIXEIRA, K. R. dos S. Diversidade e relação filogenética de espécies do gênero *Azospirillum*. Embrapa Agrobiologia. p. 1-24, 2010.

REZENDE, Cássia C. *et al.* Microrganismos multifuncionais: utilização na agricultura. **Research, Society and Development**, v.10, n.2, e50810212725, 2021. Doi: 10.33448/rsd-v10i2.12725

RIBEIRO, V. G. *et al.* Influência do pH e do ágar sobre o cultivo *in vitro* de embriões de laranja Pêra, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 32, p. 1147-1152, nov. 1997.

R Core Team (2023). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

RUDI, K.; MOEN, B.; DROMTORP, S. M.; HOLCK, A. L. Use of ethidium monoazide and PCR in combination for quantification of viable and dead cells in complex samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p.1018-1024, 2005.

SADASIVAN, L.; NEYRA, C. A. Cysts of *Azospirilla* under various cultural conditions. **In: Klingmüller W (ed) *Azospirillum* III: genetics, physiology, ecology**. Springer, Berlin, pp 230–242, 1985.

SADASIVAN, L.; NEYRA, C. A. Cyst production and brown pigment formation in aging cultures of *Azospirillum brasilense* ATCC 29145. **Journal of Bacteriology**, v. 169, p.1670–1677, 1987.

SAMPAIO, Igor Carvalho Fontes. **Desenvolvimento de um método molecular rápida para avaliação da viabilidade de bactérias redutoras de sulfato e sua utilização na seleção de biocidas**. 2017. 97 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2017.

SANTOS, Deise dos S. **Isolamento e seleção de bactérias antagonistas e fitopatógenos e detecção de genes associados à produção de compostos bioativos**. 2014. 58 f. Dissertação (Mestrado) Curso de Agricultura e Biodiversidade. Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, Sergipe, 2014.

SANTOS, Mariana Sanches. **Desenvolvimento de novas formulações líquidas de inoculantes para *Azospirillum brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6**. 2017. 85 f. Dissertação (Mestrado) Curso Biotecnologia Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

SANTOS, M. S.; HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A. Production of polyhydroxybutyrate (PHB) and biofilm by *Azospirillum brasilense* aiming at the development of liquid inoculants with high performance. **African Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 37, p. 1855-1862, set, 2017.

SANTOS, M. S.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. **AMB Express**, v. 9, p.205, 2019. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0932-0>

SANTOS, M. S.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Outstanding impact of *Azospirillum brasilense* strains Ab-V5 and Ab-V6 on the Brazilian agriculture: lessons that farmers are receptive to adopt new microbial inoculants. **Revista Brasileira Ciência do Solo**. v. 45, p. 200128, 2021. <https://doi.org/10.36783/18069657rbc20200128>

SCHUH, Carlos A.; SÁ, Enilson Luiz S. **Biopolímeros como suporte para inoculantes**. 2005. 92 f. Dissertação (Mestrado) Microbiologia Agrícola, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2005.

SILVA, L. R. **Produção experimental de inoculantes agrícolas a base de *Azospirillum spp.* para fixação biológica de nitrogênio em gramíneas e forrageiras**. 2006. 137 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade de São Paulo, 2006.

SINGH, Vijay S. *et al.* Regulation of a Glycerol-Induced Quinoprotein Alcohol Dehydrogenase by  $\sigma^{54}$  and a LuxR-Type Regulator in *Azospirillum brasilense* Sp7. **Journal Bacteriology**, v.199, p.e00035-17, 2017. Doi: 10.1128/JB.00035-17.

SORENSEN, J. *et al.* Molecular tools in rhizosphere microbiology-from single-cell to whole-community analysis. **Plant and Soil**, v. 321, n. 1–2, p. 483–512, 2009.

SOUZA, M. C. *et al.* Biopolímeros na conservação de células de rizobactérias em meios de cultura alternativos. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 4, p. e35911427490-e35911427490, 2022.

SOUZA, Mayaraa Silva Torres. **Obtenção e caracterização de mutante de *Azospirillum brasilense* excretor de amônio e caracterização dos genes ipdc, flca e narI-like envolvidos na interação com gramíneas.** 2018. Tese (Dotourado) Ciências Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, 2018.

STETS, M. I.; ALQUERES, S. M. C.; SOUZA, E. M.; DE OLIVEIRA, P. F.; SCHMID, M.; HARTMANN, A.; CRUZ, L. M. Quantification of *Azospirillum brasilense* FP2 bacteria in wheat roots by strain-specific quantitative PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, p.6700– 6709, 2015.

STOCKWELL, V. *et al.* Compatibilidade de antagonistas bacterianos de *Erwinia amylovora* com antibióticos usados para controlar a queima do fogo. **Fitopatologia**, v. 86, n. 8, p. 834-840, 1996.

STROPA, K. C. **Enumeração Celular pela Quantificação Absoluta por PCR em Tempo Real de Culturas de Bradirrizóbios.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal. Jaboticabal – São Paulo. F.il.: 108. 2009.

SULOCHANA, M. B.; JAYACHANDRA, S. Y.; KUMAR, S. A.; PARAMESHWAR, A. B.; REDDY, K. M.; DAYANAND, A. Sideróforo como potencial agente promotor do crescimento vegetal produzido por *Pseudomonas aeruginosa* JAS-25. **Bioquímica Aplicada e Biotecnologia**, v.174, p. 297–308, 2014.

TANG, S.C.; YANG, J. H. Dual Effects of Alpha-Hydroxy Acids on the Skin. **Molecules**, v.23, p. 863, 2018. Doi: 10.3390/molecules23040863

TASKIN B, GOZEN, A. G., DURAN, M. Selective quantification of viable *Escherichia coli* in biosolids by quantitative PCR with propidium monoazide modification. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, p. 4329-4335, 2011.

TEODORESCU, M.; BERCEA, M. Poly(vinylpyrrolidone) – A Versatile Polymer for Biomedical and Beyond Medical Applications. **Polymer-Plastics Technology and Engineering**, v. 54, p. 923-943, 2015. Doi: 10.1080/03602559.2014.979506

TEODORESCU, M.; BERCEA, M.; MORARIU, S. Biomaterials of PVA and PVP in medical and pharmaceutical applications: Perspectives and challenges. **Biotechnology Advances**, v. 37, p. 109-131, 2019. Doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.11.008

TRAPET, P.; AVOSCAN, L.; KLINGUER, A.; PATEYRON, S.; CITERNE, S.; CHERVIN, C. *et al.* A pioverdina sideróforo de *Pseudomonas fluorescens* enfraquece a defesa de *Arabidopsis thaliana* em favor do crescimento em condições deficientes de ferro. **Fisiologia Vegetal**, v.171, p. 675–693, 2016.

VERCELHEZE, A. E. S. *et al.* Development of biodegradable coatings for maize seeds and their application for *Azospirillum brasilense* immobilization. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, p. 2193–2203, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09646-w>

XLSTAT (2023). Addinsoft. <https://www.xlstat.com>

YANEZ, M. A., NOCKER, A., SORIA-SORIA, E., MÚRTULA, R., MARTÍNEZ, L., CATALÁN, V. Quantification of viable *Legionella pneumophila* cells using propidium monoazide combined with quantitative PCR. **Journal of Microbiology Methods**, v. 85, p.124–130, 2011.

ZHAO, Mei-Li *et al.* Ectopic Expression of *Jatropha curcas* *TREHALOSE-6-PHOSPHATE PHOSPHATASE J* Causes Late-Flowering and Heterostylous Phenotypes in *Arabidopsis* but not in *Jatropha*. **International Journal of Molecular Sciences**, v.20, p. 2165, 2019. Doi: 10.3390/ijms20092165

## MATERIAL SUPLEMENTAR

Determinação de pH e D.O de *A. brasilienses*, estirpe Ab-V5 nas diferentes formulações, após o cultivo em 24h e 48 horas.

<b>Formulações A. <i>brasiliense</i>Ab-V5</b>	<b>D.O (24h)</b>	<b>pH (24h)</b>	<b>D.O (48h)</b>	<b>pH (48h)</b>
<b>F1</b>	0,284	6,995	0,4185	6,925
<b>F 2</b>	1,012	7,51	0,886	8,295
<b>F3</b>	1,1565	6,98	1,556	5,71
<b>F4</b>	1,2735	7,025	1,5975	7,01
<b>F5</b>	1,2045	7,18	1,5505	7,145
<b>F6-RC</b>	1,056	8,16	1,296	8,835
<b>F7-NFb</b>	0,091	7,68	0,2205	8,18

Análise de pH e D.O durante o cultivo isolado de *A. brasiliense*, estirpe Ab-V6 em diferentes formulações, em 24 horas e 48 horas.

<b>Formulações A. <i>brasiliense</i>Ab-V6</b>	<b>D.O (24h)</b>	<b>pH (24h)</b>	<b>D.O (48h)</b>	<b>pH (48h)</b>
<b>F1</b>	0,642	6,93	0,631	6,94
<b>F2</b>	1,2035	7,72	1,0695	8,17
<b>F3</b>	1,3815	7,58	1,634	6,50
<b>F4</b>	1,429	7,00	1,6225	6,64
<b>F5</b>	1,3285	7,04	1,615	6,86
<b>F6-RC</b>	1,0005	8,25	1,13	8,60
<b>F7-NFb</b>	0,095	7,77	0,068	8,12

Análise de pH e D.O durante o cultivo associado de *A. brasilense*, estirpe Ab-V5 e Ab-V6 em (F2, F3, F4) em 24 horas e 48 horas.

Formulações <i>A. brasilense</i> Ab-V5 – Ab-V6	D.O	pH	D.O	pH
	(24h)	(24h)	(48h)	(48h)
<b>F2</b>	1,1485	7,55	1,097	7,85
<b>F3</b>	1,332	6,97	0,95	5,86
<b>F4</b>	1,3775	7,16	1,609	6,87

Análise de pH e D.O durante o cultivo de forma isolada de *P. fluorescens* em (F2, F3, F4) em 24 horas e 48 horas.

Formulações <i>P. fluorescens</i>	D.O	pH	D.O	pH
	(24h)	(24h)	(48h)	(48h)
<b>F2</b>	1,431	7,00	1,451	7,42
<b>F3</b>	1,3085	6,32	1,5325	6,35
<b>F4</b>	1,379	6,88	1,5405	6,95

Análise de pH e D.O do cultivo em consórcio bacteriano simultâneo entre *A. brasilenses*, estirpe Ab-V5 e Ab-V6 e *P. fluorescens* (ATCC 13525) (F2, F3, F4) em 24 e 48 horas.

Formulações <i>A. brasilense</i> Ab-V5 – Ab-V6 – <i>P. fluorescens</i>	D.O	pH	D.O	pH
	(24h)	(24h)	(48h)	(48h)
<b>F2</b>	1,481	7,12	1,474	7,45
<b>F3</b>	1,437	6,61	1,594	5,95
<b>F4</b>	1,486	7,08	1,592	7,13

Análise de pH e D.O Consórcio bacteriano entre *Azospirillum brasilense*, estirpe Ab-V5 e Ab-V6 e *P. fluorescens*, em diferentes formulações. (F2, F3, F4,) com intervalo no tempo no crescimento entre as estirpes.

Formulações <i>A. brasilense</i> Ab-V5 – Ab-V6 – <i>P. fluorescens</i>	D.O	pH
	(48h)	(48h)

<b>F2</b>	1,4635	7,395
-----------	--------	-------

---

<b>F3</b>	0,8045	5,745
-----------	--------	-------

---

<b>F4</b>	1,606	6,95
-----------	-------	------

---

**FI**