

ALEXANDRA DE ANDRADE SANTOS

**PRODUÇÃO DE POLISSACARÍDEOS VISANDO OBTER  
INSUMOS BIOLÓGICOS DE INTERESSE PARA A  
AGRICULTURA**

Recife – PE  
Dezembro de 2010

ALEXANDRA DE ANDRADE SANTOS

**PRODUÇÃO DE POLISSACARÍDEOS VISANDO OBTER  
INSUMOS BIOLÓGICOS DE INTERESSE PARA A  
AGRICULTURA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós- Graduação em Agronomia Ciência do Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências do solo.

Orientadora: Márcia do Vale Barreto Figueiredo, D.Sc.

Co-orientadores: Maria Alice Gomes de Andrade Lima, D.Sc.

Mario de Andrade Lira Junior, PhD.

Recife – PE  
Dezembro de 2010

Ficha Catalográfica

S237p Santos, Alexandra de Andrade  
Produção de polissacarídeos visando obter insumos biológicos de interesse para a agricultura / Alexandra de Andrade Santos. – 2011.  
Xii, 58 f. : il.

Orientadora: Márcia do Vale Barreto Figueiredo.  
Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo) –  
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Recife, 2010.  
Referências.

1. *Rhizobium* sp. 2. Reologia 3. Substrato 4. *Vigna unguiculata* [L] Walp. 5. Simbiose 6. Exopolissacarídeos  
I. Figueiredo, Márcia do Vale Barreto, Orientadora II. Título

CDD 631.46

# **PRODUÇÃO DE POLISSACARÍDEOS VISANDO OBTER INSUMOS BIOLÓGICOS DE INTERESSE PARA A AGRICULTURA**

ALEXANDRA DE ANDRADE SANTOS

Dissertação defendida e aprovada pela banca examinadora em 16 de Dezembro de 2010

## **Orientadora:**

---

Márcia do Vale Barreto Figueiredo, D.Sc.

## **Examinadores:**

---

Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos, D.Sc.

---

Maria Alice Gomes de Andrade Lima, D.Sc.

---

Maria Luiza Ribeiro Bastos da Silva, D.Sc.

A meus pais Graça e Mario que dedicaram a vida a seus filhos e sempre me apoiaram e incentivaram a lutar pelos meus sonhos, a meu irmão Mario Filho a minha avó Luiza pelos ensinamentos.

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus que sempre me guiou e protegeu mesmo quando não notava, por me mostrar a luz nos momentos difíceis da minha vida e por colocar no meu caminho pessoas especiais.

Aos meus pais Graça e Mario e minha avó Luiza, pelo exemplo de dignidade, perseverança e amor e por tudo que fizeram por mim.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e ao programa de Pós-graduação em Agronomia – Ciência do Solo pelos conhecimentos passados.

Ao Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), em especial ao Laboratório de Biologia do Solo, pela oportunidade de realizar este trabalho.

À FACEPE pela concessão da bolsa de estudo durante o curso.

A minha orientadora Dra. Márcia do Vale Barreto Figueiredo pela orientação, apoio e estímulo durante estes dois anos de trabalho.

Aos meus co-orientadores Dra. Maria Alice Gomes de Andrade Lima pela ajuda prestada neste trabalho e ao PhD. Mario de Andrade Lira Junior por tudo que me ensinou pela paciência e apoio a este trabalho.

Ao Dr. José de Paula Oliveira por nunca ter medido esforços para ajudar que este trabalho fosse realizado.

À amiga e colega de trabalho Maria Vanilda dos Santos Santana por ser meu braço direito na fase final deste trabalho e por todas as palavras de carinho nos momentos difíceis.

Aos colegas do Laboratório de Biologia do Solo do IPA, Maria do Carmo Barreto, Raissa Rattes, Marília Matos, Claudia Lima, Juliana Marques, Jadson Antunes, Rogério Portela e Carolina Kropniczki pelo convívio, ajuda prestada, carinho e convívio.

Aos funcionários do IPA Rosa Moraes, Almira Galdino, Sonia Formiga e Mario Leandro da Silva pelo carinho e apoio e a Maria do Carmo Santana, pelo carinho e palavras de conforto.

Aos professores Clístenes Nascimento, Izabel Galindo, Maria Betânia Freire, Brivaldo Almeida, pelos ensinamentos prestados.

Aos funcionários da UFRPE Josué e Socorro pela ajuda a mim prestada.

Aos Amigos de faculdade Emmanuella Vila Nova, Patricia Andrade, Priscila Pessoa, Suzana Mendonça, Fernando Oliveira, Artenisa Cerqueira e Clayton de Souza pelos anos de convívio e apoio.

As amigas Katia Regina e Beatriz Moyle pelo incentivo de sempre.

As minhas primas Wellicandida Rodrigues e Angelica Lima pelo apoio, carinho e amizade.

A minha sobrinha Maria Luisa e meu afilhado Luis Henrique pelo carinho e brincadeiras que me fortaleceram.

E, finalmente, a todos aqueles que ajudaram direta ou indiretamente, na realização deste trabalho.

*Deus jamais abandona seus filhos -  
mas seus desígnios são insondáveis,  
e Ele constrói nossa estrada usando  
nossos próprios passos.*

**Paulo Coelho**

SUMÁRIO -----	Pag.
LISTA DE TABELAS -----	x
LISTA DE FIGURAS -----	xi
RESUMO GERAL -----	xii
ABSTRACT-----	xiii
INTRODUÇÃO GERAL -----	1
REVISÃO DE LITERATURA -----	2
Caupi ( <i>Vigna unguiculata</i> [L.] Walp.) -----	2
Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) em Leguminosas -----	4
Biopolímeros-----	5
Produção de inoculante -----	6
REFERÊNCIAS -----	7
<b>CAPITULO 1 - EXOPOLISSACARÍDEOS RIZOBIAL: AVALIAÇÃO DO TEMPO DE CULTIVO E TEMPERATURA NA PRODUÇÃO E COMPORTAMENTO REOLÓGICO -----</b>	<b>15</b>
RESUMO -----	16
SUMMARY -----	18
INTRODUÇÃO -----	19
MATERIAL E MÉTODOS -----	21
RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	23
CONCLUSÕES -----	29
REFERÊNCIAS -----	30
<b>CAPITULO 2 - SOBREVIVÊNCIA DE RIZÓBIO EM BIOPOLÍMEROS COMO VEÍCULO PARA INOCULANTE MICROBIANO E EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA NO CAUPI -----</b>	<b>34</b>
RESUMO -----	35
-----	36
SUMMARY -----	37
INTRODUÇÃO -----	39
MATERIAL E MÉTODOS -----	41
RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	45
CONCLUSÕES -----	53
REFERÊNCIAS -----	54
CONCLUSÕES GERAIS -----	58

## LISTA DE TABELAS

CAPITULO 1 - EXOPOLISSACARÍDEOS RIZOBIAL: AVALIAÇÃO DO TEMPO DE CULTIVO E TEMPERATURA NA PRODUÇÃO E COMPORTAMENTO REOLÓGICO	Pág.
<b>Tabela 1:</b> Produção ( $\text{g.L}^{-1}$ ) de Exopolissacarídeos (EPSs) sintetizados por rizóbios: EI6 e o isolado ISOL-14 em diferentes temperaturas (28, 33 e 38° C) e tempos de cultivo (48, 96 e 144 horas).	26
<b>Tabela 2:</b> pH do caldo bacteriano da estirpe EI-6 e do isolado ISOL-14 cultivados em diferentes temperaturas (28, 33 e 38° C) e tempos de cultivo (48, 96 e 144 horas).	27
<b>Tabela 3:</b> Produtividade de EPS $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ sintetizados pela estirpe EI-6 e o isolado ISOL-14 cultivados em diferentes temperaturas (28, 33 e 38° C).	28
<b>Tabela 4:</b> Produtividade de EPS $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ sintetizados por rizóbios em diferentes temperaturas (28, 33 e 38° C) e tempos de cultivo (48, 96 e 144 horas).	29
CAPITULO 2 - SOBREVIVÊNCIA DE RIZÓBIO EM BIOPOLÍMEROS COMO VEÍCULOS PARA INOCULANTE MICROBIANO E EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA NO CAUPI	
<b>Tabela 1:</b> Análise dos constituintes físico e químico presentes nos biopolímeros (EI- 6 e xantana) utilizados com veículo de inoculação.	42
<b>Tabela 2:</b> Características física e química da turfa como veículos de inoculação.	43
<b>Tabela 3:</b> Sobrevivência da estirpe BR3267 em veículos alternativos para inoculantes microbianos (biopolímeros) comparados a turfa até 45 dias de incubação.	47
<b>Tabela 4:</b> Altura das plantas (AP), massa seca da parte aérea (MSPA), relação massa seca da parte aérea (MSPA/MSR), número de nódulos (NN) e nodulação específica (Nod Esp) nas plantas de caupi cv "IPA 206" inoculadas com a estirpe BR 3267 usando biopolímeros como veículos de inoculação microbiana em comparação a turfa (veículo tradicional) em dois métodos de inoculação (pó (P) e líquido (L)).	50
<b>Tabela 5:</b> Teor de Nitrogênio (teor N) e eficiência da fixação de $\text{N}_2$ ( $\text{EfN}_2$ ) nas plantas de caupi cv "IPA 206" inoculadas com a estirpe BR 3267 usando biopolímeros como veículos de inoculação microbiana em comparação a turfa (veículo tradicional) em dois métodos de inoculação (pó (P) e líquida (L)).	53

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
CAPITULO 1 - EXOPOLISSACARÍDEOS RIZOBIAL: AVALIAÇÃO DO TEMPO DE CULTIVO E TEMPERATURA NA PRODUÇÃO E COMPORTAMENTO REOLÓGICO	
<b>Figura 1:</b> Viscosímetro Brookfield, modelo LVDV II+P e banho termostático modelo TC 502 (A), extração do EPS (B), EPS extraído ainda úmido (C) e EPS seco em pó (D).	22
<b>Figura 2:</b> Viscosidade aparente do caldo bacteriano produzido pela EI-6 e ISOL-14, cultivadas a 28, 33 e 38° C em diferentes tempos de cultivo.	24
<b>Figura 3:</b> Viscosidade aparente do caldo bacteriano produzido pela EI-6 e ISOL-14, cultivadas a 33 e 38° C em diferentes tempos de cultivo.	24
CAPITULO 2 - SOBREVIVÊNCIA DE RIZÓBIO EM BIOPOLÍMEROS COMO VEÍCULOS PARA INOCULANTE MICROBIANO E EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA NO CAUPI	
<b>Figura 1:</b> Sobrevivência de rizóbios em veículos alternativos para inoculante microbiano.	48
<b>Figura 2:</b> Visão geral do experimento da eficiência simbiótica do caupi inoculados com veículos alternativos em casa de vegetação.	49

**SANTOS, ALEXANDRA DE ANDRADE.** Msc. Pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, Dezembro de 2010. Produção de polissacarídeos visando obter insumos biológicos de interesse para a agricultura. Orientadora: Dra. Márcia do Vale Barreto Figueiredo

## **RESUMO GERAL**

Biopolímeros são polissacarídeos de origem biológica, que podem ser sintetizados por bactérias, fungos e leveduras, em alguns casos são produzidos comercialmente através de tecnologias modernas e usados como alternativa às outras gomas tradicionais. Várias bactérias são isoladas e cultivadas para a produção comercial desses biopolímeros, principalmente devido ao elevado grau de viscosidade das soluções poliméricas. Alguns biopolímeros são usados como veículos alternativos para inoculação e têm-se mostrado eficientes devido à capacidade de limitar a transferência de calor, boas propriedades reológicas e alta atividade em água. O feijão caupi tem importância de ordem nutricional, social, econômica e estratégica para a região Nordeste, estudos da simbiose entre o feijão caupi e rizóbio, principalmente envolvendo aspectos ecológicos, como competitividade e sobrevivência da estirpe no inoculante precisam ser consideradas paralelamente aos esforços no sentido de aperfeiçoar o processo de fixação biológica de nitrogênio. Os objetivos deste trabalho foram: avaliar a estirpe e o isolado bacteriano, quanto ao tempo de cultivo e a temperatura na produção e comportamento reológico de exopolissacarídeos (EPSs) sintetizados por rizóbios, avaliar a sobrevivência da estirpe de *Bradyrhizobium* sp. (BR3267) em biopolímeros como veículos alternativos para inoculação e verificar a eficiência da fixação biológica de nitrogênio em plantas de caupi cv. "IPA 206". Este trabalho foi composto por três experimentos, o primeiro foi conduzido utilizando duas estirpes de rizóbio EI-6 e IPA-49 cultivados em meio YEM (modificado) a pH 7,0. As bactérias foram mantidas em agitador rotatório (200rpm) com diferentes controles de temperatura (28, 33 e 38° C), para a produção de EPSs, sendo a produção de EPSs mantidas por diferentes tempos de cultivo: 48, 96 e 144 horas de crescimento. No segundo, a sobrevivência do rizóbio foi avaliada em dois biopolímeros (EI-6 e xantana) comparados à turfa (veículo tradicional). Os inoculantes foram incubados em temperatura de 28° C por um período de 0, 15, 30 e 45 dias após a inoculação, em cada período foi efetuada a contagem dos microrganismos pelo método do número mais provável (NMP). O terceiro experimento foi conduzido em casa de vegetação, em condições axênicas em vasos de Leonard contendo areia lavada (pH 6,5), utilizando os mesmos veículos em dois métodos de inoculação (pó e líquida). Os resultados mostraram que a estirpe EI-6 foi superior em relação à estirpe IPA-49 onde apresentou uma maior produção e produtividade de EPS no tempo de cultivo de 144 horas e na temperatura de 33° C. Foi verificado que os biopolímeros (EI-6 e xantana) obtiveram boa sobrevivência do rizóbio em número mais provável (NMP) pelo método de infecção plantas mantendo uma densidade populacional superior ao veículo tradicional (turfa) aos 45 dias de incubação. Os biopolímeros, em ambos os métodos de inoculação estudados, podem ser indicados como veículos para inoculação de rizóbios proporcionando boa nodulação, eficiência simbiótica e desenvolvimento no caupi.

**SANTOS, ALEXANDRA DE ANDRADE.** Msc. at Universidade Federal Rural de Pernambuco, December de 2010. Polysaccharides production aiming to obtain biological inoculants of interest to agriculture. Guideline: Dra. Márcia do Vale Barreto Figueiredo

## **GENERAL ABSTRACT**

Biopolymers are polysaccharides of biological origin synthesized by bacteria, fungi and yeasts, which can be commercially produced through modern technologies and used as alternative to other conventional gums, various bacteria are isolated and grown for commercial production of these biopolymers, mainly because of the high viscosity of polymer solutions. Some polymers, as alternative vehicles for inoculation, have proven to be effective due to the ability to limit heat transfer, good rheological properties and high activity in water. The bean has nutritional, social, economic and strategic importance for the Northeast region; studies of the symbiosis between rhizobia and cowpea, particularly involving environmental aspects such as competitiveness and survival of the strain in the inoculant must be considered in parallel with efforts to improve the process of biological nitrogen fixation. The objectives of this study were: evaluate the strain and the bacterial isolate, the cultivation time and temperature in the production and rheological behavior of EPSs synthesized by rhizobia, evaluate the survival of *Bradyrhizobium* sp. (BR3267) in vehicles to inoculation and to verify the efficiency of biological nitrogen fixation on cowpea cv. IPA 206. This work consisted of three experiments, the first experiment was conducted using a strain rhizobia EI-6 and IPA-49 grown in YEM medium (modified) at 7.0 pH. Bacteria were maintained on rotary shaker (200rpm) with different temperature controls (28, 33 and 38°C) for the EPSs production, being it kept for different periods: 48, 96 and 144 hours of growth. The second, The rhizobia survival was assessed in two biopolymers (xanthan and EI-6) compared to peat (traditional vehicle), the inoculant was incubated at room temperature (28-30° C) for a period of 0, 15, 30 and 45 days after inoculation, In each period was performed the counting of microorganisms by the most probable number method (MPN), and the third experiment was conducted in a greenhouse in vitro conditions in Leonard jars containing washed sand (pH 6.5) using the same vehicles in two inoculation methods (powder and liquid). Results showed that strain EI6 was higher than in the strain IPA-49 presenting higher yield and productivity of EPS in the cultivation time of 144 hours and at temperature of 33° C there is decrease in productivity above this temperature. It was found that biopolymers (xanthan and EI-6) obtained good rhizobia survival in most probable number (MPN) by the method of infection plants maintaining higher population density than the peat (traditional vehicle) at 45 days of incubation. The biopolymers in both inoculation methods studied may be indicated as vehicles for microbial inoculation providing good nodulation, symbiotic efficiency and development in cowpea.

## INTRODUÇÃO GERAL

Biopolímeros microbianos são polissacarídeos, também conhecidos como gomas ou exopolissacarídeos (EPSs), que tem a capacidade de formar géis e soluções viscosas em meio aquoso (MOREIRA et al., 2003). Os EPSs produzidos por uma grande variedade de micro-organismos são gomas hidrossolúveis também chamados de colóides hidrofílicos, hidrocolóides ou gomas que possuem propriedades físicas, estruturais e químicas diferentes (SUTHERLAND, 2001).

A reologia considera dois materiais como ideais: o sólido elástico e o líquido viscoso. Para o líquido viscoso a propriedade de maior interesse é a viscosidade, que tem como característica não possuir forma definida, escoando irreversivelmente com a aplicação de uma força externa (BRETAS & D'ÁVILA, 2005).

Alguns trabalhos estão sendo realizados com a finalidade de aperfeiçoar condições de cultivos para produção de EPSs sintetizados por rizóbios, que incluem: fontes de carbono, volume de inóculo, pH, agitação e aeração, muitos trabalhos têm indicado pH neutro como ideal para produção destes EPSs (NAVARINI, 1997; ALVES, 1998; DUTA et al., 2006; CASTELLANE & LEMOS, 2007; BARRETO, 2008; XAVIER, 2009).

No processo de produção de polissacarídeos deve-se considerar desde o micro-organismo em estudo até a determinação dos parâmetros de fermentação, onde se destaca o meio de produção e sua influência na síntese, no rendimento e na composição dos EPSs (FARIA, 2002). Existem evidências de que a composição de EPS varia, não só entre os diversos gêneros de micro-organismos, mas também com mudanças no meio ambiente bacteriano (KARR et al., 2000; CASTELLANE & LEMOS, 2007). Estudos de novas tecnologias de cultivo e seleção de micro-organismos podem representar a descoberta de estirpes mais produtoras para aperfeiçoar processos como a fixação biológica de nitrogênio, uma vez que estes EPSs parecem ser determinantes da especificidade simbiótica.

Nas últimas décadas observaram-se progressos significativos em relação à identificação, caracterização e utilização de polissacarídeos sintetizados por micro-

organismos. Vários biopolímeros têm sido produzidos e utilizados comercialmente, entre eles: dextrana, xantana, alginato bacteriano, gelana, celulose bacteriana (MARTINS & SÁ-CORREIA, 1993; MAUGERI, 2001; GIAVASIS et al., 2003; KALOGIANNIS et al., 2003; VIET et al., 2008). Outros biopolímeros estão em estudo, porém, não são produzidos em escala comercial, destacando-se: indicana, pululana, ciclossóforanas, succinoglucana, clairina, diutana (NAVARINI et al., 1997; MAUGERI, 2001; NAVARRETE & SHAH, 2001; CHI & ZHAO, 2003; MOREIRA et al., 2003).

Os biopolímeros microbianos têm sido estudados, devido a algumas vantagens de sua obtenção em relação às outras gomas vegetais, tais como: produção independente de condições climáticas, possibilidade de utilização de matérias-primas regionais, maior rapidez na obtenção do produto acabado e necessidade de espaço relativamente pequeno, além de ser um produto biodegradável (SOUZA & GARCIA-CRUZ, 2004; SUTHERLAND, 2001).

Pesquisas estão sendo desenvolvidas utilizando EPSs sintetizados pelos micro-organismos diazotróficos, na tentativa de melhor compreender sua participação na simbiose. No entanto, para aperfeiçoar o processo de produção é de extrema importância o desenvolvimento de processos econômicos que visam à redução de meios de cultura e do tempo de cultivo. Portanto, são fundamentais estudos buscando as melhores condições dos processos fermentativos, para obtenção de novas tecnologias, a serem utilizadas na produção de insumos microbiológicos para utilização em sistemas agrícolas e agroflorestais.

## **REVISÃO DE LITERATURA**

### **Caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.)**

O feijão caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) é uma leguminosa de ampla distribuição mundial encontrada principalmente nas regiões tropicais, cujas características edafoclimáticas assemelham-se às do seu provável centro de origem,

a África (STEELE & MEHRA, 1980; MOSTASSO et al., 2002), apresenta relativa tolerância a períodos secos (SOUZA, 1991) principalmente as cultivares de crescimento indeterminado (MIRANDA et al., 1985), podendo chegar a uma produtividade média de 1.800 kg.ha<sup>-1</sup> (INSTITUTO AGRONÔMICO DE PERNAMBUCO, 2009).

A cultura do feijão caupi, vulgarmente conhecido como feijão macassar, feijão-de-corda ou feijão verde, tem relevante importância econômica no Nordeste brasileiro, por ser uma das principais culturas de subsistência e base alimentar, é fonte de proteína de origem vegetal de baixo custo consumida principalmente pela população rural de baixa renda, da região semi-árida do Nordeste, exercendo a função de suprir parte das necessidades protéicas das populações e cultivada com um baixo nível tecnológico (TEIXEIRA et al., 1988; MENEZES, 2001; ANDRADE JÚNIOR et al., 2003; FREIRE FILHO et al., 2005; GRANGEIRO et al., 2005; FREIRE FILHO et al., 2006). No caupi a estimativa da contribuição da fixação biológica de nitrogênio é da ordem de US\$ 13 milhões, somente para a região Nordeste do Brasil (RUMJANEK et al., 2005).

Está bem documentada na literatura que a cultura do caupi tem relativa capacidade de interagir com bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico, que podem contribuir para aumentar a produtividade e diminuir os custos de produção (SOARES et al., 2006). Características agronômicas desejáveis como ciclo curto, baixa exigência hídrica e reconhecida capacidade para se desenvolver satisfatoriamente em solos de baixa fertilidade conferem rusticidade ao feijão caupi, que consegue produzir bem mesmo em circunstâncias desfavoráveis de água e de fertilidade do solo (ANDRADE JÚNIOR et al., 2003; MENEZES et al., 2007).

No Brasil a prática da inoculação e de adubação nitrogenada no feijão caupi não é comum, mas quando este feijão encontra-se bem nodulado, seja através de inoculação ou através de rizóbios nativos pode dispensar as fontes de nitrogênio fertilizante e ainda, assim, atingir altos níveis de produtividade, diminuindo significativamente o custo de produção (RUMJANEK et al., 2005). O custo da inoculação de feijão caupi, por hectare, é em torno de 5 a 8 reais, bem inferior aos

custos da adubação nitrogenada que pode variar de 250 a 500 reais por hectare (FREIRE FILHO et al., 2005).

### **Fixação Biológica de Nitrogênio em Leguminosas**

Os inúmeros micro-organismos que se multiplicam e habitam o solo são responsáveis, direta ou indiretamente por processos bioquímicos diversos que controlam as transformações dos elementos químicos e as transferências de energia e nutrientes no sistema solo-planta-atmosfera, constituindo a base de sustentação e produtividade dos ecossistemas terrestres. Destacando-se os processos de decomposição da matéria orgânica e a Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN) (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Apesar da atmosfera ser composta por 78% nitrogênio ( $N_2$ ), este não está disponível para a maioria dos vegetais. Entretanto as plantas da família das leguminosas podem conseguir parte ou todo o nitrogênio diretamente do ar, devido a suas associações com rizóbios (SANTOS et al., 2008). A FBN consiste na transformação biológica do nitrogênio ( $N_2$ ) atmosférico em amônia ( $NH_3$ ), sendo realizada principalmente por bactérias especializadas, que tem a enzima nitrogenase, em vida livre ou em associação com plantas, em especial as leguminosas (LODEIRO et al., 2000; VIEIRA et al., 2006; NOVAIS et al., 2007).

A maior fonte de nitrogênio para os sistemas agrícolas e naturais é proporcionada pela FBN (BOHLOOL et al., 1992; BOGINO et al., 2006). A simbiose com bactérias da família Rhizobiaceae que incluem seis gêneros: *Rhizobium*, *Ensifer* (*Sinorhizobium*), *Mesorhizobium*, *Allorhizobium*, *Azorhizobium* e *Bradyrhizobium*, são coletivamente chamados de rizóbios (YOUNG, 1996; VAN BERKUM & EARDLY, 1998; VANCE, 1998; MOREIRA, 2008; WEIR, 2009). Entretanto outras  $\alpha$ -proteobacteria tem sido apresentadas produzindo nódulos em leguminosas (MOULIN et al., 2002) *Methylobacterium* (SY et al., 2001); *Blastobacter* (VAN BERKUN & EARDLY, 2002) and *Devosia* (RIVAS et al., 2002), assim como  $\beta$ -

proteobacteria tais como *Ralstonia* (CHEN et al., 2001) e *Burkholderia* (CHEN et al., 2003).

Devido ao sucesso da FBN com a cultura da soja e o crescimento do setor agrícola no Brasil começam a despontar tecnologias voltadas para outras leguminosas de grãos como o feijão caupi (STAMFORD et al., 1990; FIGUEIREDO et al., 1999; RUMJANEK et al., 2005).

A interação via utilização de inoculantes, também pode permitir aumento no rendimento da cultura para a substituição, total ou parcial, dos adubos nitrogenados, desde que supra a cultura com N necessário para o seu crescimento e desenvolvimento, além de diminuir os custos de produção e economizar combustíveis fósseis utilizados para a fabricação de fertilizantes nitrogenados (SOARES et al., 2006).

## **Biopolímeros**

Biopolímeros, também conhecidos como polímeros biológicos, são macromoléculas derivadas de fontes naturais. Os exopolissacarídeos (EPSs) fazem parte de uma classe de biopolímeros de alto valor agregado e com ampla variedade de aplicações (CHOA et al., 2006). A célula microbiana pode ser uma fonte rica de moléculas de carboidratos, alguns destes são componentes da parede celular, enquanto outros podem ser encontrados completamente dissociados da célula e são conhecidos como exopolissacarídeos. Os EPSs são produzidos largamente por bactérias e microalgas e menos frequentemente por leveduras e fungos filamentosos (ROLLER & DEA, 1992).

Fentanes (1983) especifica que os polissacarídeos microbianos extracelulares podem ser encontrados sob duas formas diferentes: ligadas à parede celular, denominadas de capsulares, ou como mucos solúveis aumentando substancialmente a viscosidade do caldo em fermentação. Estes são os mais produzidos industrialmente.

Dos polímeros de origem bacteriana, a goma xantana tem sido a mais estudada. O seu uso em alimentos foi permitido pela “Food and Drug Administration” (FDA), desde julho de 1969 (FDA, 1969). A produção de polissacarídeos extracelulares é muito comum em muitos gêneros de bactérias. As bactérias pertencentes à família Rhizobiaceae são produtores de polissacarídeos extracelulares (EPS) em meio de cultura (BECKER & PÜHLER, 1998). Esses EPS rizobianos são heteropolissacarídeos espécie ou estirpe-específicos, compostos de diferentes tipos de monossacarídeos (BECKER & PUHLER, 1998). Os monossacarídeos mais comumente encontrados nos EPSs são D-glucose, D-galactose, D-manose, L-fucose e L-ramnose (ROSADO et al., 2003). Os EPSs microbianos oferecem várias vantagens como à possibilidade de uma produção controlada, velocidade e rendimento elevados, maior pureza e consistência na composição, conduzindo a produtos específicos (TAVARES, 2006).

Como resultado da produção do EPS, pode haver mudanças na viscosidade e reologia do meio de cultivo (SILVA et al., 2006). A reologia é a ciência que estuda a deformação e o fluxo dos materiais sob influência de tensões. Dentro deste contexto, a matéria pode estar no estado líquido, sólido ou gasoso (BRETAS & D’ÁVILA, 2005; DAK et al., 2007).

Devido à diversidade em estrutura e propriedades físicas, os biopolímeros microbianos possuem muitas aplicações em industriais de alimentos, farmacêutica, petrolífera, cosmética, têxtil, de tintas, produtos agrícolas entre outras (FIGUEIREDO et al., 2008). Pesquisas visando aplicação agroindustrial, de modo geral, estão concentradas nos polissacarídeos extracelulares, pois apresentam um processo de extração e purificação mais simples, além de possibilitarem uma produtividade mais elevada (KANG & MCNEELY, 1977).

### **Produção de Inoculante**

Segundo Pandey & Maheshwari (2007) inoculante é uma preparação contendo uma ou mais estirpes bacterianas benéficas (ou espécies) num condutor

fácil de usar, econômico, podendo ser orgânico, inorgânico, ou sintético. No Brasil, a produção de inoculante iniciou-se na década de 1950 (FREIRE et al., 1968), sendo a turfa o veículo mais utilizado pela indústria até o presente. A turfa é frequentemente importada, já que o país não possui turfa de boa qualidade e por ser um recurso natural pouco frequente (BUCHER & REIS, 2008), a mesma é oriunda 100% de atividades extrativas, o que despreza e compromete seu valor como: importante registro geológico e fóssil (CARLILE, 2000). Sua composição pode não ser muito uniforme, podendo apresentar contaminação por resíduos biológicos ou de metais pesados (OSLEN et al., 1994). A maioria dos inoculantes são feitos a base de turfa na forma de pó ou grânulos, com pH ajustado perto da neutralidade e esterilizados (HUNGRIA & CAMPO, 2000).

Veículos de inoculantes de baixo custo e com potencial para aplicação na agricultura tem sido alvo de intensas pesquisas como, por exemplo, bagaço de cana, casca de arroz, farelo de trigo, carvão vegetal, pó de carvão, fosfato de rocha, lignita, vermiculita, diatomita, perlita, minerais como apatita, composto urbano, palha de milho, amendoim e algodão, vinhaça seca, pó de coco, entre outros (DATE & ROUGHLEY, 1977; SMITH, 1987; GONZALEZ et al., 1986; BURTON, 1979; PACZKOWSKI & BERRYHILL, 1979; HILTBOLD et al., 1980; SPARROW & HAM, 1983; FIGUEIREDO et al., 1992; DAZA et al., 2000; TEMPRANO et al., 2002; PANDEY & MAHESHWARI, 2007).

Polímeros biodegradáveis têm sido apontados como veículos ecologicamente seguros, por serem degradados pela ação de micro-organismos sem causar danos ao meio ambiente (ROSA et al., 2001). A utilização de alginato e goma xantana, sendo biodegradáveis e de baixo custo, que promovem o encapsulamento das células e só as libera após a degradação do material no ambiente e assim previnem as células de estresses ambientais, podendo favorecer a multiplicação e sobrevivência das células quando aplicados no solo (JUNGER & MUGNIER, 1982; VAN ELSAS et al. 1992; DENARDIN & FREIRE, 2000; BASHAN et al., 2002).

## REFERÊNCIAS

ALVES, L. C. **Obtenção e caracterização de biopolímero produzido por *Bradyrhizobium* sp.** 102p. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 1998.

ANDRADE JÚNIOR, A.S.; SANTOS, A.A.; SOBRINHOS, C.A.; BASTOS, E.A.; MELO, F.B.; VIANA, F.M.P.; FILHO, F.R.F.; CARNEIRO, J.S.; ROCHA, M.M.; CARDOSO, M.J.; SILVA, P.H.S.; RIBEIRO, V.Q. 2003. **Cultivo do feijão caupi.** Embrapa. Sistema de Produção, 2. Versão Eletrônica. Disponível em <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoCaupi/index.htm>. Acesso em 16 de Setembro de 2010.

BARRETO, M. C.S. **Inovações tecnológicas baseadas na produção de biopolímero com viabilidade para inoculantes rizobianos.** Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2008.

BASHAN, Y.; HERNANDEZ, J.P.; LEYVA, L.A.; BACILIO, M. Alginate microbeads as inoculant carriers for plant growth-promoting bacteria. **Biology and Fertility Soils**, Berlin, v.35, p. 359–368, may, 2002.

BECKER, A.; PÜHLER, A. Production of exopolysaccharides. In: SPAINK, H.P.; KONDOROSI, A.; HOOYKAAS, J.J. (Ed.). **The Rhizobiaceae**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998. p.97- 118.

BOGINO, P. et al. Peanut (*Arachis hypogaea* L.) response to inoculation with *Bradyrhizobium* sp. in soils of Argentina, **Annals of Applied Biology**, Cambridge, v.148, n.3, p.207-212, 2006.

BOHLOOL, B.B. et al. Biological nitrogen fixation for sustainable agriculture: A perspective. **Pant and Soil**, The Hague, v.141, n.1/2, p.1-11, 1992.

BUCHER, C.A.; REIS, V.M. **Biofertilizante contendo bactérias diazotróficas.** Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2008. 17p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 247).

BURTON, J. C. *Rhizobium* species. In: PEPPLER, H. J.; PERLMAN, D. (Eds.) Microbial Technology. New York, **Academic Press**, v.1, p.29-57, 1979.

BRETAS, R. E. S.; D'ÁVILA, M. A. **Reologia de polímeros fundidos.** 2. ed. São Carlos: Ed. UFSCar, 2005.

CARLILE, B. For peat's sake. **Biological Sciences Review**. v.12, n.3, p.19- 21, 2000.

CASTELLANE, T. C. L.; LEMOS, E.G. M. Composição de exopolissacarídeos produzidos por estirpes de rizóbios cultivados em diferentes fontes de carbono. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.10, p.1503-1506, 2007.

CHEN, W M, Laevens, S, LEE, T M, COENYE, T, DEVOS, P, MERGEAY, M, VANDAMME, P. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.51, p.1729–1735, 2001.

CHEN, W M, BONTEMPS, C, VANDAMME, P, BÉNA, G, BOIVIN-MASSON, C. Legume Symbiotic Nitrogen Fixation by  $\beta$ - Proteobacteria is Widespread in Nature. **The Journal of Bacteriology**. v.18, p.7266–7272, 2003.

CHI, Z.; ZHAO, S. Optimization of médium and cultivation conditions for pullulan production by a new pullulan-producing yeast strain. **Enzyme and Microbial Techology**, 33, 206-211, 2003.

CHOA, E.J.; OHA, J.Y.; CHANGB, H.Y.; YUN, J.W. Production of exopolysaccharides by submerged mycelial culture of a mushroom *Tremella fuciformis*. **Journal of Biotechnology**, v. 127, p. 129–140, 2006.

DAK, M.; VERMA, R.C.; JAAFREY, S.N.A. Effect of temperature and concentration on rheological properties of “Kesar” mango juice. **Journal of Food Engineering**. Davis, v.80, p.1011–1015, 2007.

DATE, R. A.; ROUGHLEY, R. J. Preparation of legume seed inoculants. In: HARDY, W. F.; GIBSON, A. H. (Eds.) **A treatise on dinitrogen fixation**. New York, Wiley, p.243-276, 1977.

DAZA, et al. Perlite as carrier for bacterial inoculants. **Soil Biology & Biochemistry**, v.32, p.657-572, 2000.

DENARDIN, N. D.; FREIRE, J. R. J. Assessment of polymers for the formulation of legume inoculants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, UK, v.16, n.3, p. 215-217, abr. 2000.

DUTA, F. P.; FRANÇA, F. P.; LOPES, L. M. A. Optimization of culture conditions for exopolysaccharides production in *Rhizobium* sp. using the response surface method. **Research article**. Vol.9 n.4, 2006.

FARIA, L. H. G. B. **Caracterização taxonômica e produção de polissacarídeos utilizando bactéria isoladas de amostras de solo**. 2002. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2002.

FENTANES, E.G. Polissacarídeos microbianos. In: RAMIREZ, R.O., (Ed). **Prespectiva de la biotecnologia in México**. México: Fundación Javier Barros Sierra, p. 73-92, 1983.

FIGUEIREDO, M. V. B.; STAMFORD, N. P.; VIDOR, C.; VILAR, J. J.; OLIVEIRA FILHO, E. C. Sobrevivência do *Bradyrhizobium* sp. em substrato alternativos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.27, p.1497-1506, 1992.

FIGUEIREDO, M.V.B.; VILAR, J.J.; BURITY, H.A.; DE FRANÇA, F.P. Alleviation water stress effects in cowpea by Bradyrhizobium spp. Inoculation. **Plant and Soil**, v.207, p.67-75, 1999.

FIGUEIREDO, M.V.B. et al., A simbiose do rizóbio com as leguminosas: Desafios e perspectivas. In: ARAÚJO, A.S.F., et al.. **Matéria orgânica e organismos do solo**. 2008. Cap.7, p.149-192.

FOOD & DRUG ADMINISTRATION. **Food additives permitted in food for human consumption: xanthan gum**. Federal Register, Washington, v.34, n.53, part 121, p.5376, mar. 1969.

FREIRE, J.R.J.; RHOR, T.G.; OLIVEIRA, P.J.; XAVIER, G.R.; RUMJANEK, N. G. Trabalhos em rizobiologia no Rio Grande do Sul. In: REUNIÃO LATINO AMERICANA SOBRE INOCULANTES PARA LEGUMINOSAS, 4., 1968, Porto Alegre. **Anais**. Porto Alegre: Secretaria de Agricultura, 1968. p.19-24.

FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; BARRETO, P. D.; SANTOS, A. A. Melhoramento genético: In: FREIRE FILHO, F. R. LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. (Eds.) **Feijão caupi: avanços tecnológicos**. Embrapa-Informação Tecnológica, p.28-92, 2005.

FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; ALCANTARA, J. P.; BELARMINO FILHO, J. & ROCHA, M. M. BRS Marataoã: novacultivar de feijão-caupi com grão tipo sempre-verde. **Revista Ceres**, v.52, p.771-777, 2006.

GIAVASIS, I.; ROBERTSON, I.; McNEIL, B.; HARVEY, L. M. Simultaneous and rapid monitoring of biomass and biopolymer production by *Sphingomonas paucimobilis* using Fourier transform-near infrared spectroscopy. **Biotechnology Letters**, 25, 975-979, 2003.

GONZALEZ, N.M.; AYUNDA, A.; GOMEZ, M.; GONZALEZ, Z. R. Evolucion de algunos materiales de soporte para inoculantes bacterianos. **Turrialba**, v.36, p.447-452, 1986.

GRANGEIRO, T.B. et al. Composição bioquímica da semente. In: FREIRE FILHO, F.R. et al. (Ed.). **Feijão caupi: avanços tecnológicos**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. p.338-365.

HILTBOLD, D. A. E.; THURLOW, D. L.; SKIPPER, H. D. Evolution of commercial soybean inoculants by various techniques. **Agronomy Journal**, v.72, p.675-681, 1980.

HUNGRIA M.; CAMPO, R. J. **Bactérias economizam milhões de dólares no cultivo da soja e do feijoeiro**. AGROCAST. 2000.

INSTITUTO AGRONÔMICO DE PERNAMBUCO. **Cultivares recomendadas pelo IPA para a Zona da Mata de Pernambuco**. Recife, 2009.

JUNGER, G.; MUGNIER, J. Polymer-entrapped rhizobium as an inoculant for legumes. **Plant and Soil**, The Hague, NL, v.65, n.2, p.219-231, jun. 1982.

KALOGIANNIS, S.; IAKOVIDOU, G.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M.; KIRIAKIDIS, D. A.; SKARACIS, G. N. Optimization of xanthan gum production by *Xanthomonas campestris* grow in molasses. **Process Biochemistry**, 39, 249-256, 2003.

KANG, K. S.; MCNEELY, W. PS-7 – A new bacterial heteropolysaccharide, L. In: SANDFORD, P. A.; LASKIN, A. (Eds.) Extracellular Microbial Polysaccharides. **American Chemical Society**, p.220-230, 1977.

KARR, D.B.; LIANG, R.T.; REUHS, B.L.; EMERICH, D.W. Altered exopolysaccharides of *Bradyrhizobium japonicum* mutants correlate with impaired soybean lectin binding, but not with effective nodule formation. **Planta**. v.211, p.218-226, 2000.

LODEIRO, A. R.; GONZALEZ, P.; HERNANDEZ, A.; BALAGUÉ, L. J.; DAVELUKES, G. Comparison of drought tolerance in nitrogen-fixing and inorganic nitrogen-grow common beans. **Plant Science**, v.154, p.31-41, 2000.

MARTINS, L. O.; SÁ-COREIA, I. Temperatura profiles of gellan gum synthesis and activities of biosynthetic enzymes. **Biotechnologia Applied Biochemistry**, V. 20, p. 385-389, 1993.

MAUGERI, F. Produção de polissacarídeos. In: LIMA, U. A.; AQUARENO, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. Biotecnologia Industrial: **Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo: Editoea Edgard BOLcher Ltda., v. 3, 2001.

Menezes, J. R. (2001). Manejo da cultura de feijão: enfoque sistêmico. In: Simpósio da Cultura do Feijao Irrigado. Piracicaba. **Anais**. Piracicaba: Esalq, Departamento de Produção Vegetal, p.35-42.

MENEZES, A.C.S.G.; ZILLI, J.E.; VILARINHO, A.A.; GALVÃO, A.; MESSIAS, O.I. 2007. Importância sócio-econômica e condições de cultivo do feijão-caupi em Roraima. In: Workshop sobre a cultura do feijão-caupi em Roraima, Boa Vista, 2007. **Anais**. Boa Vista: Embrapa Roraima, 2007. p. 12-30 (Embrapa Roraima. Documentos, 4).

MIRANDA, P. et al.. **Deficiência hídrica na cultura do feijão macassar (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)**. In: EMPRESA PERNAMBUCANA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (Recife-PE): Programa feijão; relatório final de pesquisa. Recife, 1985. p. 93-103.

MOREIRA, A. N.; PINO, F. A. B. del; VENDRUSCOLO, C. T. Estudo da produção de biopolímeros via enzimática através da inativação e lise celular e com células viáveis de *Beijerinckia* sp. 7070. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 2, p. 300-305, maio/ago. 2003.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras, MG: UFLA, 2006. 729p.

MOREIRA, F.M.S. Bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam Leguminosas. In: **Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros**. MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O.; BRUSSAARD, L. (Eds.), Lavras, UFLA, 2008, p.621-680.

MOSTASSO, L.; MOSTASSO, F.L.; DIAS, B.G.; VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. 2002. Selection on bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. **Field Crops Research**, 73:121-132.

MOULIN, L, CHEN, W-M, BÉNA, G, DREYFUS, B, BOIVIN-MASSON, C. Rhizobia: the family is expanding. In: O'BRIAN, M, LAYZELL, D, VESSEY, K, NEWTON, W. Editors. **Nitrogen Fixation: Global Perspectives**. 2002. CAB International. P.61-65.

NAVARINI, L.; STREDANSKY, M.; MATULOVA, M.; BERTOCCHI, C. Production and characterization of an exopolysaccharide from *Rhizobium hedysari* HCNT 1. **Biotechnology Letters**, v. 19, n 12, p. 1231–1234, 1997.

NAVARRETE, R. C.; SHAH, S. N. New Biopolymer for coiled tubing applications. **Society of Petroleum Engineers 68487, Richardson, TX, USA**, p. 1-10, 2001.

NOVAIS, R. F.; ALVAREZ V., V. H.; BARROS, N. F. de; FONTES, R. L. F.; CANTARUTTI, R. B.; NEVES, J. C. L. Editores. **Fertilidade do Solo**. Vicosa, MG; Sociedade Brasileira de Ciencia do Solo, 2007. 1017p.

OLSEN, P. E.; RICE, W. A.; COLLINS. M. M. Biological Contaminants in North American legume inoculants. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 27, p. 699- 701, 1994.

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

PACZKOWKI, M. W.; BERRYHILL, D. L. Survival of *Rhizobium phaseoli* in coal based legume inoculants. **Applied and Environmental Microbiology**, v.38, p.612-615, 1979.

RIVAS, R, VELAZQUEZ, E, WILLEMS, A, VIZCAINO, N, SUBBA-RAO, N S, MATEOS, P F, GILIS, M, DAZZO, F B, Martinez-Molina E. A new species of *Devosia* that forms a unique nitrogen-fixing root-nodule symbiosis with the aquatic legume *Neptunia natans* (L.f.). Druce. **Applied and Environmental Microbiology**. v.68, p.5217-5222, 2002.

ROLLER, S., DEA, I.C.M. Biotecnology in production and modification of biopolymers for foods. **Critical Reviews in Biotechnology**. v.12, p.261-277, 1992.

ROSA, D.S.; FRANCO, B.L.M.; CALI, M.R. Biodegradabilidade e propriedades mecânicas de novas misturas poliméricas. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.11, p.82-88, 2001.

ROSADO, F.R.; GERMANO, S.; CARBONERO, E.R.; DA COSTA, S.M.; LACOMINI, M.; KEMMELMEIER, C. Biomass and exopolysaccharide production in submerged cultures of *Pleurotus ostreatus* Sing. and *Pleurotus ostreatus* "florida" (Jack.:Fr.) Kummer. **Journal of Basic Microbiology**. v.43, n.3, p.230-237, 2003.

RUMJANEK, N. G.; MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; NEVES, M. C. P. Fixação Biológica de Nitrogênio. In: FREIRE FILHO, F.R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. (Org.). **Feijão caupi: avanços tecnológicos**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p.281-335, 2005.

SANTOS, C.E.R.S.; FREITAS, A.D.S.; VIEIRA, I.M.M.B.; COLAÇO, W. Fixação simbiótica do N<sub>2</sub> em leguminosas tropicais. In: FIGUEIREDO, M.V.B.; BURITY, H.A.; STAMFORD, N.P.; SANTOS, C.E.R.S. **Micro-organismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura**. Agrolivros, 2008. cap.1, 17-43.

SILVA, M. L. C.; MARTINEZ, P. F.; IZELI, N. L.; SILVA, I. R.; VASCONCELOS, A. F. D.; CARDOSO, M. S.; STELUTTI, R. M.; GIESE, E. C.; BARBOSA, A. M. Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1. p. 85-92, 2006.

SMITH, R. S. Production and quality control of inoculants. In: ELKAN, C. H. (Ed.) **Symbiotic nitrogen fixation technology**. New York, Marcel Dekker, p.392-411, 1987.

SMITH, R.S. New inoculant technology to meet changing legume management. In: ELMERICH, C., KONDOROSI, A., NEWTON, E.D. (eds.). Biological nitrogen fixation for the 21<sup>st</sup> century. Dordrecht, **Kluwer Academic Publishers**, p.621-622, 1997.

SOARES, A. L. L.; PEREIRA, J. P. A. R.; FERREIRA, P. A. A.; VALE, H. M. M.; LIMA, A. S.; ANDRADE, M. J. B. & MOREIRA, F. M. S. Eficiência agrônômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em perdões (MG), 1 - caupi. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.30, p.795-802, 2006.

SOUZA, L.V. **Efeito da deficiência hídrica sobre o crescimento, a fixação do dinitrogênio e a produção de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)**. 1991. 98p. Dissertação (Mestrado Agronomia Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 1991.

SOUZA, D. M.; GARCIA-CRUZ, C. H. Produção fermentativa de polissacarídeos extracelulares por bactérias. Semina: **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 25, n. 4, p. 331-340, 2004.

STEELE, W. M; MEHRA, K. L. Structure, evolution and adaptation to farming system and environment in *Vigna*. In: SUMMERFIELD, D.R; BUNTING, A.H., eds. **Advances in legume science**. 1980. England, Royal Botanic Gardens. p.459-468.

SPARROW, S.D. J. R.; HAM, G. E. Survival of *Rhizobium phaseoli* in six carrier materials. **Agronomy Journal**, v.75, p.181-184, 1983.

STAMFORD, N.P. et al. Fixação de N<sub>2</sub> e matéria seca do caupi em dois solos do semi-árido brasileiro submetido a deficiência hídrica. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.14, p.283-290, 1990.

SUTHERLAND, I.W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Trends in Biotechnology**, Limerick, v. 16, p. 41-46, 1998.

SUTHERLAND, I. W. Microbial polysaccharides from gram-negative bacteria. **International Dairy Journal**, v.11, p.663-674, 2001.

SY, A, GIRAUD, E, JOURAND, P, GARCIA, N, WILLEMS, A, LAJUDIE, P, PRIN, Y, NEYRA, M, GILLIS, M, BOINVIN-MASSON, C, DREYFUS, B. *Methylobacterium methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. **The Journal of Bacteriology**. V.183, p.214-220, 2001.

TAVARES, A. P. M.; **Produção de lacase para potencial aplicação como oxidante na indústria papelreira**. Tese (Doutorado). Universidade de Aveiro, 2006.

TEMPRANO, F. J. et al..Survival of several *Rhizobium/ Bradyrhizobium* strains on different inoculant formulations and inoculated seeds. **International Microbiology**, v.5, p. 81-86, 2002.

TEIXEIRA, S.M.; MAY, P.H.; SANTANA, A.C. de. Produção e importância econômica do caupi no Brasil. In: ARAUJO, J.P.P. de; WATT, E.E. (Org.). **O caupi no Brasil**. Brasília : IITA/ Embrapa. p. 99-136. 1988.

VANCE, C. P. Legume symbiotic nitrogen fixation: agronomic aspects. In: SPAINK, H. P. (Ed.) *The Rhizobiaceae*. **Kluwer Academic Publishers**, p.509-530, 1998.

VAN BERKUM, P.; EARDLY, B.D. Molecular evolutionary systematics of the *Rhizobiaceae*. In: Spaink, H. P.; Kondorosi, A.; Hooykaas, P. J. J. **The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Plant-associated Bacteria**, Editado por: Dordrecht: Kluwer Academic, 1998. p. 1-24.

VAN BERKUN, P.; EARDLY, B.D. The aquatic budding bacterium *Blastobacter denitrificans* is a nitrogen-fixing symbiotic of *Aeschynomene indica*. **Applied and Environmental Microbiology**. v.68, p.1132-1136, 2002.

VAN ELSAS J. D.; TREVORS J. T.; WOLTER A.C.; HEIJNEN C.E Survival and root colonization by alginate-encapsulated *Pseudomonas fluorescens* cells following

introduction into soil. **Biology and Fertility of Soil**, Berlin, v.14, n.1, p.14-22, set.1992.

VIEIRA, C.; JUNIOR, T. J. DE P.; BORÉM, A. **Feijão**. 2ª ed. Atual – Viçosa UFV, 2006 600p. (VIEIRA, JUNIOR, BORÉM, 2006). **Feijão** 2º Edição. Universidade Federal de Viçosa

VIET, D.; BECK-CANDANEDO, S.; GRAY, D. G. Synthesis and haracterization of blue dextrans. **Carbohydrate Polymers**, v. 74 , p. 372–378, 2008.

XAVIER , TEREZINHA FERREIRA. **Produção e caracterização de exopolissacarídeos (EPSs sintetizados por microorganismos diazotróficos**. Dissertação (Mestrado em ciência do Solo) – Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2009.

WEIR, B. S. (2009). **The current taxonomy of rhizobia**. New Zealand rhizobia website. Disponível em: <http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia.html>. Last updated: Setembro, 2009. Acesso em 10 de outubro de 2010.

YOUNG J.P.W. Phylogeny and taxonomy of rhizobia. **Plant and Soil**, v. 186, p. 45-52, 1996.

**CAPITULO 1 - EXOPOLISSACARÍDEOS RIZOBIAL: AVALIAÇÃO DO TEMPO DE CULTIVO E TEMPERATURA NA PRODUÇÃO E COMPORTAMENTO REOLÓGICO**

Artigo científico submetido à Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira (PAB).

# EXOPOLISSACARÍDEOS RIZOBIAL: AVALIAÇÃO DO TEMPO DE CULTIVO E TEMPERATURA NA PRODUÇÃO E COMPORTAMENTO REOLÓGICO <sup>(1)</sup>

Alexandra de Andrade Santos <sup>(2)</sup>, Maria Alice Gomes de Andrade Lima <sup>(3)</sup>, Rosa Livia Carvalho de Moraes <sup>(4)</sup>, José de Paula Oliveira <sup>(5)</sup>, Márcia do Vale Barreto Figueiredo <sup>(6)</sup>

## Resumo

Biopolímeros são polissacarídeos de origem microbiana sintetizados por bactérias, fungos e leveduras biodegradáveis, que podem ser produzidos comercialmente através de tecnologias modernas e usados como alternativas para outras gomas tradicionais. Nos últimos anos têm sido objeto de intensa pesquisa, tendo em vista seu elevado potencial de aplicação em diferentes setores. As bactérias do gênero *Rhizobium* sintetizam grandes quantidades de Exopolissacarídeos (EPSs), estes têm sido estudados na tentativa de melhor compreender sua participação na simbiose leguminosa x rizóbio. Várias bactérias são isoladas e cultivadas para a produção comercial desses biopolímeros, principalmente devido ao elevado grau de viscosidade das soluções poliméricas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a estirpe e o isolado bacteriano, o tempo de cultivo e a temperatura na produção e comportamento reológico de exopolissacarídeos sintetizados por rizóbios. O experimento foi conduzido utilizando duas estirpes de rizóbio EI-6 e IPA-49 cultivados em meio YEM (modificado) a pH 7,0. As bactérias foram mantidas em agitador rotatório (200rpm) com diferentes controles de temperatura (28, 33 e 38° C), para a produção de EPSs, sendo a produção de EPSs mantidas por diferentes tempos de cultivo: 48, 96 e 144 horas de crescimento. Após foi avaliado a comportamento reológico do caldo bacteriano através da leitura da viscosidade aparente realizada em viscosímetro rotacional, bem como a determinação do pH do caldo bacteriano e a quantificação da produção e

(1) Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo (PPGCS) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE);

(2) Mestranda do PPGCS da Universidade Federal Rural de Pernambuco, R. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE, CEP: 52171-900, [andradex82@hotmail.com](mailto:andradex82@hotmail.com);

(3) Professora Associada da Universidade Federal de Pernambuco;

(4) Assistente de Pesquisa do Instituto Agrônomo de Pernambuco;

(5) Pesquisador do Instituto Agrônomo de Pernambuco – IPA;

(6) Pesquisadora do IPA/CARHP e Professora credenciada, membro permanente, do PPGCS.

produtividade dos EPSs sintetizados por rizóbios. Os dados foram submetidos à análise de variância com nível de significância de 5% pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Os resultados mostraram que a estirpe EI-6 foi superior em relação à estirpe IPA-49 onde apresentou uma maior produção e produtividade de EPS no tempo de cultivo de 144 horas e na temperatura de 33° C. Houve uma queda na produtividade acima desta temperatura. A viscosidade aparente do caldo bacteriano aumenta com o tempo de cultivo nos rizóbios estudados, e maior viscosidade foi apresentada pela estirpe EI6 no tempo de cultivo 144 horas e na temperatura de 33° C.

**Termos de indexação:** EPS; *Rhizobium sp.*; reologia; estirpes; viscosidade aparente.

## **RHIZOBIAL EXOPOLYSACCHARIDES: EVALUATION OF CULTURE TIME AND TEMPERATURE IN PRODUCTION AND RHEOLOGICAL BEHAVIOR <sup>(1)</sup>**

### **Summary**

Biopolymers are polysaccharides of microbial origin synthesized by bacteria, fungi and biodegradable yeasts, which can be commercially produced through modern technologies and used as alternative to other conventional gums; in recent years they have been object of intense research in view of its high application potential in different sectors. Bacteria of the genus *Rhizobium* synthesize large amounts of exopolysaccharides (EPSs), which have been studied in attempt to better understand their participation in the legume x rhizobia symbiosis. Various bacteria are isolated and grown for commercial production of these biopolymers, mainly because of the high viscosity of polymer solutions. The aim of this study was to evaluate the strain and the bacterial isolate, the cultivation time and temperature in the production and rheological behavior of EPSs synthesized by rhizobia. The experiment was conducted using a strain rhizobia EI-6 and IPA-49 grown in YEM medium (modified) at 7.0 pH. Bacteria were maintained on rotary shaker (200rpm) with different temperature controls (28, 33 and 38°C) for the EPSs production, being it kept for different periods: 48, 96 and 144 hours of growth. Subsequently, it was evaluated the rheological behavior of bacterial broth by reading the apparent viscosity performed in rotational viscometer as well as determining the bacterial broth pH and the quantification of production and productivity of EPSs synthesized by rhizobia. Data were subjected to analysis of variance at 5% significance level by the F test and means compared by the Tukey test ( $p < 0.05$ ). Results showed that strain EI6 was higher than in the strain IPA-49 presenting higher yield and productivity of EPS in the cultivation time of 144 hours and at temperature of 33°C There is decrease in productivity above this temperature. The apparent viscosity of bacterial broth increases with time of cultivation in rhizobia studied, and higher viscosity was shown by the strain EI6 at the cultivation period of 144 hours at a 33°C temperature.

**Index terms:** EPS, *Rhizobium* sp., rheology, strains, apparent viscosity.

## Introdução

Biopolímeros são polissacarídeos de origem microbiana sintetizados por bactérias, fungos e leveduras (SUTHERLAND et al., 1992) biodegradáveis, que podem ser produzidos comercialmente através de tecnologias modernas e são usadas como substituição alternativa para outras gomas tradicionais (SUTHERLAND & TAIT, 1992; SUTHERLAND, 2001), podendo ser utilizado na indústria química, farmacêutica, alimentícia e na agricultura, devido as suas características físico-químicas. Nos últimos anos os biopolímeros têm sido objeto de intensa pesquisa, tendo em vista seu elevado potencial de aplicação em diferentes setores industriais.

Os polissacarídeos de origem microbiana apresentam cadeia complexa e são capazes de produzir três tipos de carboidratos poliméricos quanto à localização celular, como constituintes da parede celular (lipopolissacarídeo ou LPS), associados covalentemente à superfície celular (polissacarídeos capsulares ou CPS), ou secretados para o meio extracelular (exopolissacarídeo ou EPS). São classificados como homopolissacarídeos (ex. dextrana) e heteropolissacarídeos (ex. gelana, xantana) (KUMAR et al., 2004; SOUZA et al., 2004; CANILHA et al., 2006;).

Segundo Vermani et al. (1995) um grande número de bactérias patogênicas de plantas ou não patogênicas produzem quantidades abundantes de EPS, como as *Xanthomonas*, *Erwinia* e bactérias fixadoras de nitrogênio *Rhizobium*, *Beijerinckia* e *Azotobacter*. As bactérias do gênero *Rhizobium* sintetizam grandes quantidades de EPS gastando mais de 70% de sua energia nesta produção (GONZALEZ et al., 1996). As bactérias da ordem *Rhizobiales*, de crescimento rápido sintetizam exopolissacarídeos ácidos de alta massa molecular, que são excretados para o meio de cultura e resulta no aumento da viscosidade mesmo (ZEVENHUIZEN et al., 1986; BREEDVELD et al., 1990; CORZO VARILLAS et al., 2006). Os polissacarídeos extracelulares sintetizados por bactérias do gênero *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Ensifer* têm sido estudados na tentativa de melhor compreender sua participação na simbiose leguminosa x rizóbio, uma vez que estes biopolímeros parecem ser determinantes da especificidade simbiótica, entretanto, a função destas moléculas ainda não foi completamente elucidada (SKORUPSKA et al., 2006) .

A produção de biopolímeros microbianos para o uso comercial quando comparada com a extração de gomas de plantas superiores e algas, bem como os polímeros sintéticos, apresentam algumas vantagens como: a ampla diversidade de biopolímeros produzidos por micro-organismos; a produção, em quantidade e com alta qualidade, independente das condições climáticas, conduzidas por fermentações em condições controladas e utilizando matéria-prima de qualidade constante (PACE et al., 1981), maior uniformidade em suas propriedades físico-químicas devido à especificidade do micro-organismo utilizado e a possibilidade de controle dos parâmetros de fermentação, como pH, temperatura, aeração, velocidade de agitação, tempo de fermentação e composição do meio de cultivo (SOUZA et al., 2004).

Os polissacarídeos extracelulares podem ser produzidos quando uma fonte de carboidratos encontra-se presente em excesso no meio de cultivo bacteriano (PACE et al., 1981), as condições ideais para o crescimento bacteriano e a produção de polissacarídeo são afetadas pela proporção entre o volume de ar e o volume de meio, presença ou ausência de agitação, quantidade do inóculo, além dos nutrientes que fazem parte do meio de cultura (SUTHERLAND, 1993; GARCIACRUZ, 1997; BUENO, 2001; BUENO et al., 2001; FARIA, 2002; COLTRO, 2003; CASTELANE, 2007).

Os parâmetros que mais influenciam no processo de biossíntese de EPSs são a estirpe bacteriana, a composição do meio de cultivo, taxa de agitação, aeração, pH, temperatura e tempo de incubação (NAMPOOTHIRI et al., 2003; SOUZA et al., 2004; DUTA et al., 2006; BARRETO, 2008; XAVIER, 2009). A temperatura é um fator crítico na síntese de polissacarídeos. Na faixa de temperatura de 25 a 35° C é encontrado o maior crescimento e maior produção de EPS, onde cada espécie bacteriana apresenta a sua temperatura ótima (GANDHI et al., 1997; KAWAI et al., 1992; VERMANI et al., 1995; SCHMIDELL, 2001).

Várias bactérias são isoladas e cultivadas para a produção comercial desses polímeros, principalmente devido ao elevado grau de viscosidade das soluções poliméricas (SUTHERLAND, 2001). Isaac Newton foi o primeiro cientista a expressar

a lei básica da viscosimetria, descrevendo o comportamento de fluxo de um líquido ideal. Com o tempo, as camadas líquidas sofrem deformação e a velocidade com a qual a deformação aumenta em relação ao tempo é chamada de taxa de deformação ou cisalhamento. (NAVARRO, 1997). A propriedade física de um líquido de resistir ao fluxo induzido pela tensão aplicada (cisalhamento) é descrita como viscosidade. Ela é dependente da natureza físico-química da substância, da temperatura, da pressão, da taxa de deformação e do tempo (SCHRAMM, 2006).

Este trabalho teve como objetivo avaliar duas estirpes de rizóbio, tempo de cultivo e temperaturas na produção e no comportamento reológico de exopolissacarídeos sintetizados por rizóbios.

## **Material e Métodos**

O experimento foi conduzido utilizando duas estirpes de rizóbio (EI-6 e IPA-49) cultivadas em meio YEMA – agar manitol extrato de levedura (Vincent, 1970 (modificado)), substituindo os  $10\text{g.L}^{-1}$  de manitol por  $30\text{g.L}^{-1}$  de sacarose com pH 7,0. Em todo o experimento, o inóculo foi produzido com o pré- inóculo crescido nas seguintes condições: foi retirada uma alçada da cultura mantida no meio YEM - manitol extrato de levedura (Vincent, 1970 (modificado)) por 36h a  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ , sendo este conduzido em 25 mL de meio YEM em Erlenmeyers de 125 mL, incubado em agitador rotatório, 200 rpm, até atingir uma  $\text{DO}_{560\text{nm}} = 0,7$ . O inóculo foi preparado transferindo-se 1mL do pré- inóculo para Erlenmeyers de 250 mL, contendo 50mL de meio YEM sendo incubado em agitador rotatório a 200 rpm, até atingir uma  $\text{DO}_{560\text{nm}}$  que corresponde ao ótimo da fase log de crescimento do micro-organismo, onde a concentração de células é em torno de  $10^9\text{ UFC mL}^{-1}$ (XAVIER, 2009).

Em seguida foi realizada a inoculação em Erlenmeyers de 500 mL com 100 mL de meio YEM adicionando-se 2,5% do inóculo de EI-6 e IPA-49. Estas foram mantidas em agitador rotatório (200 rpm) com diferentes controles de temperatura ( $28, 33$  e  $38\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), para a produção de exopolissacarídeos (EPSs), sendo a produção de EPSs mantidas pelos diferentes tempos de cultivo: 48, 96 e 144 horas de

crescimento (XAVIER, 2009). O experimento foi realizado com o delineamento experimental em blocos casualizados e arranjo em parcela subdividida, com uma fatorial na subparcela, onde a temperatura compõe a parcela principal e as subparcelas são compostas pelos rizóbios e os tempos de cultivos.

Completando-se os tempos para produção de EPSs (48, 96 e 144 horas) foi avaliado o comportamento reológico do caldo bacteriano através da leitura da viscosidade aparente. Para a estirpe IPA-49 a leitura da viscosidade foi realizada com o spindle SC4-18 (o qual lê viscosidade na faixa de 1,5 a 30 mPa.s) e para a EI-6 com o spindle SC4-18 e spindle SC4-31 (lendo viscosidades na faixa de 15 a 300 mPa.s), de acordo com a viscosidade apresentada pelo caldo bacteriano. As leituras de viscosidades foram realizadas em viscosímetro rotacional Brookfield, modelo LVDV II+P e banho termostático modelo TC 502, na temperatura de 25° C que foi controlada através de banho termostático acoplado ao equipamento.



**Figura 1:** Viscosímetro Brookfield, modelo LVDV II+P e banho termostático modelo TC 502 (A), extração do EPS (B), EPS extraído ainda úmido (C) e EPS seco em pó (D).

Após a viscosimetria realizou-se a determinação do pH do caldo bacteriano e a quantificação da produção e produtividade dos biopolímeros. Para a recuperação do exopolissacarídeo (EPS) foi adicionado álcool etílico absoluto na proporção 3:1 (álcool: caldo bacteriano). A produção e produtividade de EPSs foram determinadas

através da técnica de massa seca em balança de precisão, após a secagem do EPS em estufa a  $30^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , até peso constante.

Os dados foram submetidos à análise de variância, utilizando o Guided Data Analysis Procedure do SAS (SAS Institute, 1999), com nível de significância de 5% pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

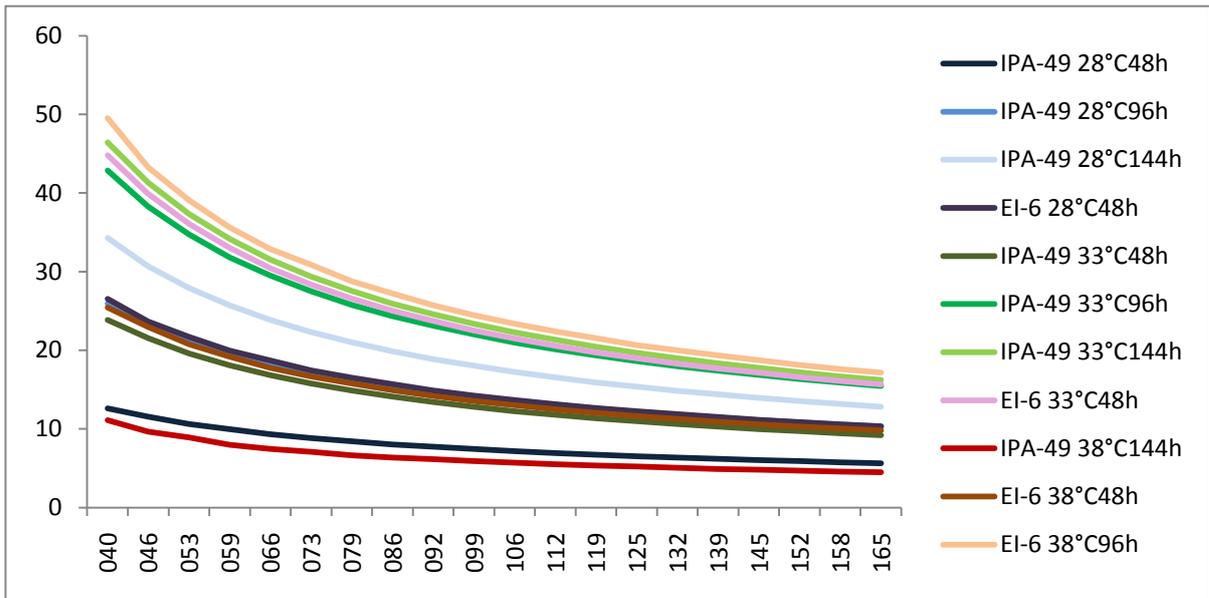
## **Resultados e Discussão**

As Figuras 2 e 3 mostram que os rizóbios EI-6 e IPA-49 apresentaram um comportamento pseudoplástico, o qual é caracterizado pela viscosidade aparente decrescer com o aumento da taxa de cisalhamento, este comportamento é esperado em soluções poliméricas de polissacarídeos microbianos (AMANULLAH et al., 1996; CACIK et al., 2001; PADILHA, 2003; RAO et al., 2003).

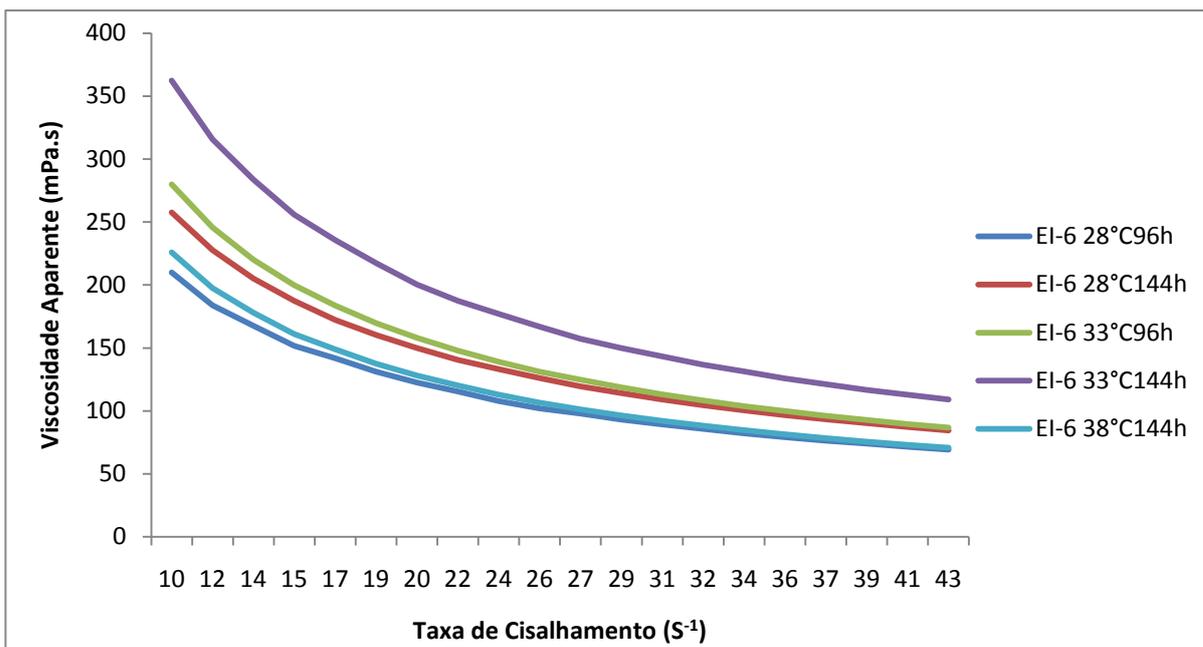
Kaci et al. (2005) isolaram e identificaram um EPS produzido por uma estirpe de *Rhizobium*, de solos áridos, e as análises reológicas mostraram que as soluções do polissacarídeo apresentam comportamento de fluido pseudoplástico, sendo utilizado como agente espessante. Schramm (2006) avalia que soluções poliméricas, quando em repouso, mantêm suas moléculas entrelaçadas e enoveladas numa ordem interna irregular que se caracteriza por uma considerável resistência interna ao fluxo, manifestando-se através da viscosidade elevada. Com o aumento das taxas de cisalhamento, ocorre uma ordenação ou alinhamento das partículas na direção do fluxo, provavelmente pelas interações desfeitas, ocasionando a diminuição da viscosidade.

As estirpes EI-6 e IPA-49 apresentaram viscosidades distintas em todos os tempos estudados (Figuras 2 e 3), sendo as viscosidades crescentes no tempo de cultivo, provavelmente devido ao aumento da produção de EPS, este dado corrobora com o encontrado por Barreto (2008), em estudo realizado com nove linhagens de *Rhizobium* em dois tempos de cultivo (96 e 168 h), relatou um aumento na viscosidade em função do tempo de fermentação.

A estirpe de rizóbio EI-6 apresentou uma maior viscosidade do caldo bacteriano (Figuras 2 e 3) em todas as avaliações, sendo que esta bactéria a partir das 96 horas de cultivo, nas temperaturas de 28 e 33° C apresentou um grande aumento na viscosidade do caldo bacteriano (sendo necessário o uso de um spindle diferente do utilizado para as outras avaliações para efetuar a leitura na maior faixa de viscosidade).



**Figura 2:** Viscosidade aparente do caldo bacteriano produzido pela EI-6 e IPA-49, cultivadas a 28, 33 e 38° C em diferentes tempos de cultivo.



**Figura 3:** Viscosidade aparente do caldo bacteriano produzido pela EI-6 cultivada a 28, 33 e 38° C em diferentes tempos de cultivo.

Como mostra na Figura 2 a viscosidade apresentada pela estirpe de rizóbio IPA-49 nas 48, 96 e 144 horas de tempo de cultivo e nas temperaturas de 28, 33 e 38° C, encontra-se na faixa de 4,51 a 46,41 mPa.s, já a viscosidade apresentada pela estirpe EI-6 às 48 horas de cultivo nas temperaturas de 28 e 33° C e EI-6 as 48 e 96 horas de cultivo a 38° C encontra-se na faixa de 9,80 a 49,52 mPa.s (Figura 3), com exceção da IPA-49 a 38° C que nos tempos de avaliação de 48 e 96 horas não foi possível realizar a leitura da viscosidade aparente, pois esta apresentou-se inferior a 1,5 mPa.s, tendo em vista que o spindle utilizado tinha a capacidade de realizar leituras de viscosidades entre 1,5 e 30 mPa.s. A maior viscosidade em todos tempos e temperaturas de estudo foi de 362,4 mPa.s apresentado pela bactéria EI-6 cultivada a 33° C a 144 horas de cultivo. Xavier (2009) cultivando a estirpe de rizóbio EI-6 por 192 horas encontrou uma viscosidade de 394 mPa.s.

Como mostra as Figuras 2 e 3, quanto às temperaturas avaliadas, houve uma diminuição da viscosidade das duas bactérias quando cultivadas a 38° C, quando as bactérias foram cultivadas a 33° C, estas apresentaram a maior viscosidade em

todos os tempos de cultivo estudados. Sendo a estirpe IPA-49 a que apresentou uma menor viscosidade quando cultivada na temperatura de 38 ° C (Figura 2).

Para a variável produção de EPS e pH do caldo bacteriano (Tabelas 1 e 2, respectivamente) a interação tripla bactéria x tempo de cultivo x temperatura, para a variável produtividade apenas, as interações duplas entre estirpe de rizóbio x temperatura de cultivo e tempo x temperatura de cultivo foram significativas apresentaram efeito significativo pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade e suas médias comparadas ao teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Pode-se observar também na Tabela 1 que a maior produção de EPS foi obtida pela estirpe EI-6 quando cultivada a 33° C por 144h, porém a mesma não apresentou diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) à 96h de cultivo na mesma temperatura. Em relação à estirpe IPA-49 a maior produção foi obtida quando cultivada a 28° C por 144h, já esta apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) às 48 horas de cultivo para a mesma temperatura. Em relação ao tempo de cultivo para os rizóbios as produções nas temperaturas de 28 e 33° C não diferiram estatisticamente entre si, mas diferiram da produção a 38° C, para os tempos de cultivo de 48, 96 e 144 horas. Quando avaliados os rizóbios, quanto à produção de EPS pode-se observar que para todos os tempos de cultivo a estirpe EI-6 apresentou a maior produção, diferindo apenas da IPA-49 quando cultivada a 33° C em todos os tempos de cultivo.

Castellane (2007) avaliando a produtividade de EPSs de duas estirpes de *Rhizobium tropici* em meio sólido, verificou que a estirpe que apresentou a maior produtividade foi a SEMIA 4080. Estudos realizados por Padilha (2003) também verificou que os resultados de fermentação obtidos para linhagens de *Xanthomonas* utilizadas demonstraram a influência do tempo de incubação na produção de EPS. Lancheros et al. (2001) avaliando a produção de EPS pela bactéria *Rhizobium leguminosarum* cepa B sob diferentes temperaturas cultivadas por 144 horas, encontrou uma maior produção de EPS quando esta foi mantida a 34° C.

**Tabela 1:** Produção ( $\text{g L}^{-1}$ ) de Exopolissacarídeos (EPSs) sintetizados por rizóbios: EI-6 e IPA-49 em diferentes temperaturas (28, 33 e 38° C) e tempos de cultivo (48, 96 e 144 horas).

Bactérias	Temperaturas	Tempos de cultivo		
		48h	96h	144h
EI-6	28° C	1,532 Ba1	3,105 Aa1	3,838 Aa1
	33° C	2,006 Ba1	3,176 Aa1	3,970 Aa1
	38° C	0,382 Ab1	0,715 Ab1	0,545 Ab1
IPA-49	28° C	0,941 Ba1	1,465 ABa2	1,928 Aa2
	33° C	1,078 Aa2	1,672 Aa2	1,483 Aa2
	38° C	0,029 Ab1	0,102 Ab1	0,146 Ab1
CV (%)	29,7			

Valores seguidos por letras maiúsculas (para estirpes em uma determinada combinação temperatura x tempo), letras minúsculas (temperatura para uma determinada combinação estirpe x tempo) ou algarismos idênticos (tempo para uma determinada combinação estirpe x temperatura) não se diferenciam, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Na Tabela 2 não houve diferença significativa entre os valores de pH quando comparados aos rizóbios, temperatura e tempo de cultivo, porém pode-se observar que quando os rizóbios foram mantidos na mesma temperatura as estirpes EI-6 e IPA-49 apresentaram valores de pH do caldo bacteriano próximos. A estirpe EI-6 quando cultivada a 28, 33 e 38° C apresentou um menor pH nos tempos de cultivo de 96 e 144 horas não diferindo entre si do tempo de 48 horas. O mesmo ocorreu com a estirpe IPA-49 quando cultivada nas três temperatura estudadas. Foi observado um menor pH desta estirpe (IPA-49) nas temperaturas 33 e 38° C, porém as mesmas não apresentaram diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) entre si e na temperatura de 28° C. O pH do caldo bacteriano diminuiu com o tempo de cultivo sendo a menor diminuição encontrada para a estirpe EI-6 quando cultivada a 28 e 33° C e para a IPA-49 quando cultivado a 38° C (Tabela 2).

Lima (1999) avaliando a produção de goma xantana de três linhagens de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* cultivadas a 120 rpm na temperatura de  $29 \pm 1^\circ\text{C}$ , e tempo de cultivo de 48 horas, também observou diminuição do pH.

**Tabela 2:** pH do caldo bacteriano da estirpe EI-6 e do isolado IPA-49 cultivados em diferentes temperaturas (28, 33 e 38° C) e tempos de cultivo (48, 96 e 144 horas).

Bactérias	Temperaturas	Tempos de cultivo		
		48h	96h	144h
EI-6	28°C	6,5 Aa1	5,9 Aa1	4,8 Bb2
	33°C	6,4 Aa1	5,8 Aa1	5,7 Aa1
	38°C	6,5 Aa1	6,0 Aa1	6,0 Aa1
IPA-49	28°C	6,5 Aa1	6,3 Aa1	6,2 Aa1
	33°C	6,4 Aa1	6,1 Aa1	6,0 Aa1
	38°C	6,4 Aa1	6,0 Aa1	5,9 Aa1
CV (%)	6,97			

Valores seguidos por letras maiúsculas (para estirpes em uma determinada combinação temperatura x tempo), letras minúsculas (temperatura para uma determinada combinação estirpe x tempo) ou algarismos idênticos (tempo para uma determinada combinação estirpe x temperatura) não se diferenciam, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A produtividade de EPS (Tabela 3) foi maior para os dois rizóbios quando cultivados a 33° C, esta não diferiu estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade da temperatura de 28° C, porém diferiu estatisticamente da temperatura de 38° C. A produtividade da estirpe EI-6 foi superior a IPA-49, quando cultivadas nas temperaturas de 28, 33 e 38° C, este resultado corrobora com o encontrado por XAVIER (2009).

**Tabela 3:** Produtividade de EPS g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> sintetizados pelas estirpes EI-6 e IPA-49 cultivados em diferentes temperaturas (28, 33 e 38° C).

Bactérias	Temperaturas		
	28° C	33° C	38° C
EI-6	0,0303 Aa	0,0342 Aa	0,0064Ba
IPA-49	0,0161 Ab	0,0167Ab	0,0009Bb
CV (%)	27,87		

Nas linhas (letras maiúsculas) e nas colunas (letras minúsculas) médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente, entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A produtividade de EPS pelos rizóbios na temperatura de 28° C foi maior no tempo de cultivo: 48 horas, apresentando uma diferença significativa do tempo de 144 horas. Porém, quando mantidas na temperatura de 33° C houve uma diminuição da produtividade após as 96 horas de cultivo, a qual apresentou diferença significativa pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade dos demais tempos de cultivo. No entanto, quando os rizóbios foram cultivados a 38° C não apresentaram diferença significativa nos tempos de cultivo estudados (Tabela 4).

As produtividades nos tempos de 96 e 144 horas de cultivo nas temperaturas de 28° e 33° C não diferiram estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade, já no tempo de 48 horas a maior produtividade foi quando as bactérias foram cultivadas a 33° C diferindo estatisticamente das demais temperaturas (Tabela 4).

Segundo Sutherland (2001), alguns EPS são sintetizados durante todo o crescimento bacteriano enquanto que outros são produzidos somente durante a fase logarítmica ou na fase estacionária. Segundo Antunes et al. (2000) e Rottava (2005) a produtividade é influenciada pela linhagem do micro-organismo, tempo e meio de fermentação.

**Tabela 4:** Produtividade de EPS  $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  sintetizados por rizóbios em diferentes temperaturas (28, 33 e 38° C) e tempos de cultivo (48, 96 e 144 horas).

Temperaturas	Tempos de cultivo		
	48h	96h	144h
28° C	0,0258 Ab	0,0238 ABa	0,0200 Ba
33° C	0,0321 Aa	0,0248 Ba	0,0189 Cab
38° C	0,0043 Ac	0,0043 Ab	0,0024 Ab
CV (%)	27,87		

Nas linhas (letras maiúsculas) e nas colunas (letras minúsculas) médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente, entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Com base nos resultados obtidos neste trabalho é indicado utilizar a estirpe EI-6 pelo tempo de cultivo de 144 horas a uma temperatura de 33° C por apresentar uma maior produção de EPSs, mesmo que a produtividade neste tempo não tenha sido a maior, tendo em vista que o maior acúmulo de EPSs ocorre nas primeiras 48 horas de crescimento. O pH do caldo bacteriano decresce com o tempo de cultivo e foi menor na estirpe EI-6.

## Conclusões

- A estirpe EI-6 foi superior em relação a estirpe IPA-49 onde apresentou uma maior produção de exopolissacarídeo (EPS) no tempo de cultivo de 144 h e na temperatura de 33° C, acima desta temperatura ocorre uma queda.
- A maior produtividade de EPS sintetizado é apresentada pela estirpe EI-6 quando cultivada a temperatura de 33° C, acima desta temperatura ocorre uma queda.
- A maior viscosidade do caldo bacteriano é apresentada pela estirpe EI-6 no tempo de cultivo de 144 horas à temperatura de 33° C, o mesmo aumenta com o tempo de cultivo nos rizóbios estudados.
- A viscosidade aparente do caldo bacteriano aumenta com o tempo de cultivo nos rizóbios estudados.

## Referências

AMANULLAH, A.; SERRANO, L. C.; GALINDO, E.; NIENOW, A. W. Reproducibility of pilot scale xanthan fermentations. **Biotechnology Progress**, New York, v. 12, p. 466-473, 1996.

ANTUNES, A. E. C.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, J. L. S.; VENDRUSCOLO, C. T. Síntese de biopolímero xantana em meios convencionais e alternativos: viscosidade x composição. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.6, n.2, p.83-87, 2000.

BARRETO, M. C.S. **Inovações tecnológicas baseadas na produção de biopolímero com viabilidade para inoculantes rizobianos.** Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2008.

BREEDVELD, M. W.; ZEVENHUIZEN, L. P.; ZEHNDER, A. J. Excessive excretion of cyclic beta-(1,2)-glucan by *Rhizobium trifolii* TA-1. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.56, n.7, p.2080-6, 1990.

BUENO, S. M. **Isolamento e caracterização de bactérias selvagens produtoras de polissacarídeos obtidas de amostras de solo da estação ecológica de São José do Rio Preto – SP.** 2001, 161f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2001.

BUENO, S. M.; GARCIA-CRUZ, C. H. The influence of fermentation time and the presence of salts in the rheology of the fermentation broth of a polysaccharide-producing bacteria free of soil. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v. 50, n. 1, p. 41-46, 2001.

CACIK, F.; DONDO, R. G.; MARQUES, D. Optimal control of a batch bioreactor for the production of xanthan gum. **Computers and Chemical Engineering**, [S.l.], v. 25, p. 409-418, 2001.

CANILHA, L.; SILVA, D. D. V.; CARVALHO, W.; MANCILHA, I. M. Aditivos alimentares produzidos por via fermentativa parte 3: polissacarídeos e enzimas. **Revista Analytica**, São Paulo, v. 20, p. 32-41, 2006.

CASTELLANE, T.C.L. **Análise de polissacarídeos essenciais para a nodulação do feijoeiro por *Rhizobium tropici* cultivados em diferentes fontes de carbono.** Dissertação (mestrado). Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal, 2007.

CASTELLANE, T.C.L.; LEMOS, E.G.M. Composição de exopolissacarídeos produzidos por estirpes de rizóbios cultivados em diferentes fontes de carbono. **Revista Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.10, p.1503-1506, 2007.

COLTRO, A. L. **Produção e determinação da composição dos exopolissacarídeos produzidos por bactérias isoladas da rizosfera.** 2003, 104f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2003.

CORZO VARILLAS, J.; HERNANDEZ, J. H.; NAVARRO, G. A. Polisacáridos y lipopolisacáridos rizobianos. Estructura y papel em La simbiose. En: Bedmar, E.J.; González, J.; Lluch, c.; Rodelas, B. **Fijación de nitrógeno: Fundamentos y Aplicaciones.** Sociedade Espanola de Fijación de Nitrógeno (SEFN), p. 148- 159, 2006.

DUTA, F. P.; FRANÇA, F. P.; LOPES, L. M. A. Optimization of culture conditions for exopolysaccharides production in *Rhizobium* sp. using the response surface method. **Research article**. V.9, n.4, 2006.

FARIA, L. H. G. B. **Caracterização taxonômica e produção de polissacarídeos utilizando bactéria isoladas de amostras de solo**. 2002. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2002.

GANDHI, H. P.; RAY, R. M.; PATEL, R. M. Exopolymer production by *Bacillus* species. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v.34, p.323-327, 1997.

GARCIA-CRUZ, C. H. **Produção de polissacarídeos bacterianos**. 1997, 63f. Tese (Livre Docencia) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 1997.

GONZALEZ, J.E.; REUHS, B.L. & WALKER, G.C. Low molecular weight EPS II of *Rhizobium meliloti* allows nodule invasion in *Medicago sativa*. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, v.93, p. 8636-8641, 1996.

KACI, Y.; HEYRAUD, A.; BARAKAT, M.; HEULIN, T. Isolation and identification of an EPS-producing *Rhizobium* strain from arid soil (Algeria): characterization of its EPS and the effect of inoculation on wheat rhizosphere soil structure. **Research in Microbiology**, Paris, v.156, n.4, p.522-531, 2005.

KAWAI, H.; ISOBE, Y.; KORIBE, M.; TOKUDA, J.; TOKUNO, I.; ENDO, K.; KAWAI, F. Production of a novel extracellular polysaccharide by a *Bacillus* strain isolated from Soil. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, Tokio, v.56, n.6, p.853-857, 1992.

KUMAR, C.G.; JOO, H-S.; CHOI, J-W.; KOO, Y-M.; CHANG, C-S. Purification and characterization of an extracellular polysaccharide from haloalkalophilic *Bacillus* sp. I-450. **Enzyme and Microbial Technology**, v.34, p.673-681, 2004.

LIMA, M. A. G. A. **Obtenção e caracterização de xantanas produzidas por diferentes linhagens de *Xantomonas campestris* pv. *campestris***. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Rio de Janeiro, 1999.

LANCHEROS, R.; CAICEDO, L.; NAVARRO, Y. **Efecto de los nutrientes y condiciones ambientales sobre La producción de polisacáridos por La bacteria *Rhizobium leguminosarum* cepa B**. XXI Congresso Colombiano de Ingeniería Química, Bogotá, 2001.

NAMPOOTHIRI, K. M.; SINGHANIA, R. R.;SABARINATH, C.; PANDEY, A. Fermentative production of gellan using *Sphingomonas paucimobilis*. **Process Biochemistry**, London, v.38, p.1513-1519, 2003.

NAVARRO, R. F. **Fundamentos de reologia de polímeros**. Caxias do Sul: Editora da Universidade de Caxias do Sul, 1997.

PACE, G. W.; RIGHELATO, R. C. Production of extracellular microbial polysaccharides. **Advances in Biochemical Engineering**, v.15, p.41-70, 1981.

PADILHA, F. F. **Produção de biopolímeros sintetizados por microorganismos**. 2003. 99 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos). Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2003.

RAO, Y. M.; SURESH, A. K.; SURAIISKUMAR, G. K. Free radical aspects of *Xanthomonas campestris* cultivation with liquid phase oxygen supply strategy. **Process Biochemistry**, New York, v. 38, p. 1301-1310, 2003.

ROTTAVA, I. **Seleção de linhagens de *Xanthomonas* sp para produção de goma xantana**. Dissertação (Mestrado). Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI), Erechim, 2005.

SAS INSTITUTE. **The SAS System for Windows** CD-ROM for Windows 32 bits – 1999.

SCHMIDELL, W. Em **Biotecnologia Industrial**; SCHMIDELL, W.; Lima, U. A.; Aquearone, E.; Borzani, W., eds.; Edgard Blücher: São Paulo, 2001, v. 2, cap. 6.

SCHRAMM, G. **Reologia e reometria: fundamentos teóricos e práticos**. São Paulo: Artliber, 2006.

SKORUPSKA, A.; JANCZAREK, M.; MARCZAK, M.; MAZUR, A.; KROL, J. Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic Functions. **Microbial Cell Factories**, v. 5, p.7, 2006.

SUTHERLAND, I. W.; TAIT, M. I. Biopolymers. **Encyclopedia of Microbiology**, v.1, p.339-349, 1992.

SUTHERLAND, I. W. Xanthan. In: *Xanthomonas*. SWINGS, J. G.; CIVEROLO, E. L. (Eds). **Chapman & Hall**, London, p. 363-388, 1993.

SUTHERLAND, I. W. Microbial polysaccharides from gram-negative bacteria. **International Dairy Journal**, v.11, p.663-674, 2001.

SOUZA, D. M.; GARCIA-CRUZ, C. H. Produção fermentativa de polissacarídeos extracelulares por bactérias. Semina: **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 25, n. 4, p. 331-340, 2004.

VERMANI, M. V.; KELKAR, S. M.; KAMAT, M. Y. Production and optimization of certain growth parameters for an exopolysaccharide from *Azotobacter vinelandii* MTCC 2460 isolated from a plant rhizosphere. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v.80, n.6, p.599-602, 1995.

VINCENT, J. M. A **manual for the practical study of *Rhizobium* of root bacteria**. Oxford; Blackwells Scientific Publication, 1970. 164p.

XAVIER, T. F.; **Produção e caracterização de exopolissacarídeos (EPSs) sintetizados por microorganismos diazotróficos**. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo). Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, 2009.

ZEVENHUIZEN, L.P.T.M.; BERTOCCHI, C. VAN NEERVEN, A. R. W. Congo red absorption and cellulose synthesis by *Rhizobiaceae*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 52, 381-386, 1986.

**CAPITULO 2 - SOBREVIVÊNCIA DE RIZÓBIO EM BIOPOLÍMEROS COMO VEÍCULOS PARA INOCULANTE MICROBIANO E EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA NO CAUPI**

# **SOBREVIVÊNCIA DE RIZÓBIO EM BIOPOLÍMEROS COMO VEÍCULOS PARA INOCULANTE MICROBIANO E EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA NO CAUPI <sup>(1)</sup>**

**Alexandra de Andrade Santos <sup>(2)</sup>, Mario de Andrade Lira Junior <sup>(3)</sup>, Maria Vanilda dos Santos Santana<sup>(4)</sup> Márcia do Vale Barreto Figueiredo <sup>(5)</sup>**

## **Resumo**

O feijão caupi tem importância de ordem nutricional, social, econômica e estratégica para a região Nordeste, estudos da simbiose entre o caupi e rizóbio, principalmente envolvendo aspectos ecológicos, como competitividade e sobrevivência da estirpe no inoculante precisam ser consideradas paralelamente aos esforços no sentido de aperfeiçoar o processo de fixação biológica de nitrogênio. Alguns biopolímeros têm sido usados como veículos alternativos para inoculação e têm-se mostrado eficientes devido à capacidade de limitar a transferência de calor, boas propriedades reológicas e alta atividade em água. Este trabalho foi composto por dois experimentos, tendo como objetivos avaliar a sobrevivência da estirpe de *Bradyrhizobium* sp. (BR3267) em biopolímeros como veículos alternativos para inoculação; e verificar a eficiência da fixação biológica de nitrogênio em plantas de caupi cv. "IPA 206". A sobrevivência do rizóbio foi avaliada em dois biopolímeros (EI-6 e xantana) comparados à turfa (veículo tradicional). O biopolímero (EI-6) foi produzido no laboratório de biologia do solo do Instituto Agrônomo de Pernambuco- IPA, e a produção do EPS sintetizado pela estirpe de rizóbio EI-6 (Araripina- PE). Cada veículo foi passado em peneira com malha de 0,72 mm homogeneizado e colocado 10 g em sacos de polietileno de média densidade e autoclavado (120 °C; 101KPa), a turfa foi autoclavada por uma 1 hora em três dias consecutivos com intervalos de 24 horas e os dois biopolímeros por um período de

(1) Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo (PPGCS) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

(2) Mestranda do PPGCS da Universidade Federal Rural de Pernambuco, R. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE, CEP: 52171-900, [andradex82@hotmail.com](mailto:andradex82@hotmail.com).

(3) Professor Adjunto da Universidade Federal Rural de Pernambuco e do PPGCS.

(4) Bolsista do RHAЕ-FACEPE

(5) Pesquisadora do Instituto Agrônomo de Pernambuco - IPA/CARHP e Professora credenciada, membro permanente, do PPGCS.

15 minutos. Os veículos utilizados foram inoculados utilizando a estirpe padrão BR3267 ( $10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup>), mantendo 40% de umidade e pH de 6,5 a 7,0. Os inoculantes foram incubados em temperatura de 28° C por um período de 0, 15, 30 e 45 dias após a inoculação. Em cada período foi efetuada a contagem dos microorganismos pelo método do número mais provável (NMP), as plantas foram cultivadas em tubos de Gibson com solução nutritiva sem a adição de nitrogênio, por um período de 24 dias em câmara de crescimento, no laboratório de biologia de solo do IPA. O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados (2), com duas réplicas em cada bloco, sendo a densidade populacional obtida pela tabela de Fisher e Yates (1963), segundo Vincent (1970). O experimento II foi conduzido em casa de vegetação do IPA, em condições axênicas em vasos de Leonard (autoclavado por uma hora a 120° C e 101 KPa) contendo areia lavada (pH 6,5), utilizando os mesmos veículos em dois métodos de inoculação (pó e líquida). Os inoculantes foram preparados da mesma forma do experimento anterior utilizando o mesmo teor de umidade, pH, cultivar e estirpe padrão. O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso com 4 blocos. Foi verificado que os biopolímeros (EI-6 e xantana) obtiveram boa sobrevivência do rizóbio em número mais provável (NMP) pelo método de infecção plantas mantendo uma densidade populacional superior ao veículo tradicional (turfa) aos 45 dias de incubação. Os biopolímeros, em ambos os métodos de inoculação estudados, podem ser indicados como veículos para inoculação microbiana proporcionando boa nodulação, eficiência simbiótica e desenvolvimento do caupi.

**Termos de indexação:** exopolissacarídeos; nodulação; simbiose; substrato; *Vigna unguiculata* [L.] Walp.

## RHIZOBIA SURVIVAL ON BIOPOLYMERS AS A VEHICLE FOR MICROBIAL INOCULATION AND SYMBIOTIC EFFICIENCY IN COWPEA

### Summary

The bean has nutritional, social, economic and strategic importance for the Northeast region; studies of the symbiosis between rhizobia and cowpea, particularly involving environmental aspects such as competitiveness and survival of the strain in the inoculant must be considered in parallel with efforts to improve the process of biological nitrogen fixation. Some polymers, as alternative vehicles for inoculation, have proven to be effective due to the ability to limit heat transfer, good rheological properties and high activity in water. This work consisted of two experiments, aiming to evaluate the survival of *Bradyrhizobium* sp. (BR3267) in vehicles to inoculation and to verify the efficiency of biological nitrogen fixation on cowpea cv. IPA 206. The rhizobia survival was assessed in two biopolymers (xanthan and EI-6) compared to peat (traditional vehicle). The biopolymer (EI-6) was produced in the laboratory of soil biology, Agronomic Institute of Pernambuco, IPA, and the EPS production synthesized by rhizobia strains EI6 (Araripina-PE). Each vehicle was passed through sieve with a 0.72 mm mesh and 10 g were placed in medium density and autoclaved polypropylene bags (120°C; 101KPa), peat was autoclaved for one hour on three consecutive days at 24 hours intervals, and the two biopolymers for a period of 15 minutes. Vehicles used were inoculated using the strain BR3267 ( $10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup>) in 40% moisture content and 6.8 to 7.0 pH interval. The inoculant was incubated at room temperature (28-30° C) for a period of 0, 15, 30 and 45 days after inoculation. In each period was performed the counting of microorganisms by the most probable number method (MPN); plants were grown in Gibson tubes with nutrient solution without nitrogen addition for a period of 24 days in a growth chamber in the laboratory soil biology, IPA. The experimental design was in randomized blocks (2), with two replicates in each block, and the population density obtained by the table of Fisher and Yates (1963), according to Vincent (1970). The second experiment was conducted in a greenhouse in vitro conditions in Leonard jars (autoclaved for one hour at 120° C and 101 kPa) containing washed sand (pH 6.5) using the same vehicles in two inoculation methods (powder and liquid). The inoculants were

prepared similarly to the first experiment using the same moisture content, pH, cultivar and standard strain. The experimental design was in randomized blocks with four blocks. It was found that biopolymers (xanthan and EI-6) obtained good rhizobia survival in most probable number (MPN) by the method of infection plants maintaining higher population density than the peat (traditional vehicle) at 45 days of incubation. The biopolymers in both inoculation methods studied may be indicated as vehicles for microbial inoculation providing good nodulation, symbiotic efficiency and development in cowpea.

**Index terms:** exopolysaccharides, nodulation, symbiosis, alternative substrate, *Vigna unguiculata* [L.] Walp.

## Introdução

O feijão caupi tem importância de ordem nutricional, social, econômica e estratégica para as regiões Norte e Nordeste (SOARES et al., 2006). Estudos da simbiose entre o caupi e rizóbio, principalmente envolvendo aspectos ecológicos, como competitividade e sobrevivência da estirpe no inoculante precisam ser consideradas paralelamente aos esforços no sentido de aperfeiçoar o processo de fixação biológica de nitrogênio (MARTINS et al. 1997).

Um veículo de inoculação de alta qualidade deve ser de fácil obtenção, processamento e manuseio, ter características constantes, assegurar a nutrição e viabilidade das células e manter elevadas quantidades de células rizobianas durante o período de armazenamento, ser atóxico ao rizóbio, não exigir condições especiais de armazenamento, ser de fácil transporte e com matéria prima disponível e baixo custo, possuir alta capacidade de absorção e retenção de água e capacidade de tamponamento do pH (ROUGLEY, 1970; EL HADDAD, 1985; FIGUEIREDO et al., 1992; KEYSER et al., 1992; CASSIDY, et al., 1996; DENARDIN, 1997; CÂMARA, 1998; YARDIN et al., 2000; CARTROUX, et al. 2001).

No Brasil, a indústria de inoculantes tem feito grande esforço para melhorar a qualidade dos produtos comercializados e em virtude da atuação da fiscalização do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e do aumento das exigências nos padrões de qualidade. Os inoculantes microbianos melhoraram muito a partir de 1996, normalmente excedendo as quantidades mínimas exigidas de células de rizóbio e falhas de inoculação tornaram-se muito raras (VOSS, 2002).

A oferta de inoculantes no mercado brasileiro é bem variada, encontrando-se inoculantes dos tipos líquidos, turfosos, o pó molhável, liofilizados, em géis, dentre outros (CÂMARA, 1998; SCHUH, 2005). O uso de inoculantes rizobianos em leguminosas de grãos tem sido responsável por expressivas economias no custo da produção agrícola, por meio da redução do uso de adubos minerais nitrogenados, advinda dos benefícios do processo da FBN (RUMJANEK et al., 2005). O veículo

mais utilizado para a produção de inoculantes é a turfa, porém infelizmente a turfa é um recurso limitado e ausente em alguns países e poderá se tornar um recurso escasso no futuro. Este veículo também necessita de um rigoroso processamento como a sua extração no campo, moagem, secagem, neutralização e esterilização antes de seu uso nos sistemas de produção comercial, e não é fácil de usar em equipamentos de plantio (TITTABUTR, et al., 2007). Desta forma, diversos veículos têm sido estudados como suporte para inoculantes, destacando-se as formulações feitas a partir de polímeros naturais ou sintéticos, que podem fornecer as características desejadas ao produto final bem como manter a viabilidade do rizóbio (DOMMERMUES et al., 1979; JAWSON et al., 1989; SCHUH, 2005; LORDA et al., 2007).

Independente do tipo de inoculante microbiano ele deve obedecer alguns requisitos tais como o número mínimo de células exigido pela legislação em vigor, no mínimo  $10^9$  células.g<sup>-1</sup> ou mL de inoculante, e devem ter comprovada eficiência agrônômica conforme normas oficiais da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola (RELARE) aprovadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). A quantidade mínima a ser utilizada deve ser a que forneça 600.000 células por semente. Deve-se verificar também o número de registro do MAPA, verificar o prazo de validade (embalagem), devendo ser conservado em local protegido do sol e arejado até o momento da utilização (FIGUEIREDO et al.,2008; MAPA, 2009).

Inoculantes formulados a base de turfa esterilizada, aditivados com 10% de montmorilonita e com 1,5% de polivinilpirrolidona (PVP), apresentam maior população de *Bradyrhizobium japonicum*, em relação ao controle (GARCIA-BLÁSQUEZ, 1993). O uso de PVP em inoculantes formulados a base de biopolímeros proporcionaram concentrações de células viáveis, das estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 de *Bradyrhizobium elkanii*, iguais ou superiores aquelas obtidas por estes mesmos inoculantes não aditivados, após oito meses de armazenamento sob condições de temperatura ambiente (DENARDIN, 1997).

Alguns biopolímeros usados como veículos alternativos para inoculação têm-se mostrado eficientes para o crescimento e incubação de bactérias, devido à capacidade de limitar a transferência de calor, boas propriedades reológicas e alta atividade em água (JUNG & MUNGNIER, 1982; SCHUH, 2005; FERNANDES JÚNIOR, 2006; SILVA, et al., 2009).

Desta maneira, outras formas de produção de inoculantes usando veículos biodegradáveis, atóxicos, hidrossolúveis, obtidos de fontes renováveis e de baixo custo, associada com estirpes de rizóbios competitivas, deve ser o objetivo de estudos para o desenvolvimento de novos inoculantes, inseridos no contexto atual da indústria, da responsabilidade ambiental e social, economia de recursos e inovação tecnológica (FERNANDES JÚNIOR, 2006).

Neste contexto os objetivos deste trabalho foram avaliar a sobrevivência da estirpe de *Bradyrhizobium* sp. (BR3267) em biopolímeros como veículos alternativos para inoculação; e verificar a eficiência da fixação biológica de nitrogênio em plantas de caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) cv. "IPA 206"

## **Material e Métodos**

Este trabalho foi composto por dois experimentos, um para avaliar a sobrevivência da estirpe de *Bradyrhizobium* sp. (BR3267) nos biopolímeros como veículos alternativos para inoculação e outro para verificar a eficiência da fixação biológica de nitrogênio em plantas de caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) cv. "IPA 206", esta cultivar foi obtida pelo cruzamento entre os genótipos 371 e CNCx 11-2E e apresenta hábito de crescimento indeterminado do tipo semi ereto (INSTITUTO AGRONÔMICO DE PERNAMBUCO, 2009).

## Experimento I: Sobrevivência de rizóbios em veículos alternativos para inoculante microbiano

A sobrevivência do rizóbio foi avaliada em dois biopolímeros e/ ou exopolissacarídeos - EPSs (EI-6 e xantana) (Tabela 1) como veículos de inoculação comparados à turfa (veículo tradicional) (Tabela 2). A xantana, um biopolímero sintetizado pela bactéria *Xanthomonas campestris* foi cedido pela Prof<sup>a</sup> Dra. Maria Alice Gomes de Andrade Lima (UFPE). Outro biopolímero foi produzido no laboratório de biologia do solo do Instituto Agrônomo de Pernambuco- IPA, EPS sintetizado pela estirpe de rizóbio EI-6 (Araripina-PE) obtido no tempo de cultivo de 144 horas à temperatura de 33° C em agitador rotatório.

Após o tempo de produção foi realizada a extração deste EPS (produzido pela estirpe de rizóbio EI-6) seguido de posterior secagem em estufa a 30° ± 1° C, até peso constante com seguida maceração do EPS em cadinho.

**Tabela 1:** Análise dos constituintes físico e químico presentes nos biopolímeros (EI-6 e xantana) utilizados com veículo de inoculação.

Biopolímero (EI-6)								
pH	Umidade gravimétrica (%)	Ácido pirúvico (%)	Constituinte Químico presentes *	elementos inorgânicos (%) <sup>*</sup>				
				Na	K	Ca	Mg	P
7,0	14,73	7,1	Galactose, Glucose, Fucose	0,507	1,74	0,034	1,397	0,938
Biopolímero (Xantana)								
7,0	13,14	1,5	Constituinte Químico presentes ** Acido urônico, Manose e Glicose	Cinzas: 9,18				

Fonte: \* XAVIER, 2009; \*\* LIMA, 1999.

**Tabela 2:** Características física e química da turfa como veículos de inoculação.

pH	Umidade gravimétrica (%)	P	Na	K	Ca	Mg	Al
		mg.dm <sup>-3</sup>	-----Cmolc.dm <sup>-3</sup> -----				
4,45*	9,86	16	0,52	0,28	7,0	4,5	0,25

\* foi efetuada a correção do pH da turfa para 6,5, com carbonato de cálcio.

Os veículos foram passados em peneira com malha de 0,72 mm homogeneizado e colocado 10 g em sacos de polietileno de média densidade e autoclavado (120 °C; 101KPa). A turfa foi autoclavada por uma hora em três dias consecutivos com intervalos de 24 horas e os dois biopolímeros por um período de 15 minutos (SCHUH, 2005).

Os veículos utilizados foram inoculados utilizando a estirpe padrão BR3267, recomendada pela Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola (RELARE), para caupi. O mesmo possui uma concentração de 10<sup>9</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> obtidas por plaqueamento em meio YMA pelo método da gota (“Drop-plate”) utilizando 40µL, por setor, das diluições de 10<sup>6</sup> a 10<sup>9</sup> das bactérias na superfície do meio em placas de Petri subdivididas. As placas foram incubadas em estufa a 28° C até aparecimento das colônias quando foi efetuada a contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC/gota). O teor de umidade utilizado nos veículos foi de 40% e o pH de 6,8 a 7,0. O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados (2), com duas réplicas em cada bloco, sendo a densidade populacional obtida pela tabela de Fisher & Yates (1963), segundo Vincent (1970).

Os inoculantes foram incubados por um período de 0, 15, 30 e 45 dias após a inoculação. Em cada período foi efetuada a contagem dos micro-organismos pelo método do número mais provável (NMP), as diluições e infecção em plantas seguiram a metodologia descrita por Vincent (1970), sendo as diluições 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup> e 10<sup>8</sup> adicionadas nas sementes de caupi cv. “IPA 206” as quais foram desinfestadas

segundo Hungria & Araújo (1994). As plantas foram cultivadas em tubos de Gibson, com solução nutritiva de Arnold & Hogland (1950) modificada por Silveira, (1998), por um período de 24 dias em câmara de crescimento no Laboratório de Biologia de Solo do IPA a uma temperatura de 28° C e luminosidade 500 a 1000 lumes (MAPA, 2010) por 12 horas (controlada por relógio automático e as lâmpadas utilizadas devem emitir um espectro semelhante ao do sol) para a avaliação da presença e/ou ausência de nodulação nas plantas.

O experimento foi conduzido utilizando o delineamento experimental em blocos casualizados (2 blocos), com duas réplicas em cada bloco, sendo a densidade populacional obtida pela tabela de Fisher & Yates (1963), segundo Vincent (1970).

### **Experimento II: Eficiência simbiótica do caupi inoculados com veículos alternativos.**

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do IPA a uma temperatura média de  $30 \pm 2^\circ$  C e umidade relativa do ar média  $63 \pm 2\%$  em condições axênicas em vasos de Leonard (autoclavado por uma hora a  $120^\circ$  C e 101 KPa) contendo areia lavada (pH 6,5). A cultivar de caupi utilizada foi "IPA 206".

Foram utilizados três veículos: os biopolímeros (EI-6 e xantana) e a turfa (veículo tradicional) em dois métodos de inoculação (pó e líquida). Os inoculantes foram preparados da mesma forma que o experimento anterior (experimento I), utilizando o mesmo teor de umidade, pH, e a estirpe padrão BR3267 ( $10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup>). Após inoculação, os veículos (pó) foram mantidos em maturação por 72 horas em condições ambiente (28 – 30° C) para a inoculação das sementes. Em relação ao inoculante líquido foi retirada uma alíquota de 1 g de cada veículo e dissolvido de forma homogênea em agitador do tipo vórtex em 99 mL de solução salina (0,85% NaCl) e inoculado 1 mL por semente.

A contagem em placas dos inoculantes líquido foi efetuada pelo método da gota ("Drop-plate") e em pó (metodologia desenvolvida por Temprano et al, (2002),

onde 10 sementes de cada inoculante foi colocada em erlenmeyer contendo 100 mL de NaCl (0,85%) e agitado por um período de 15 minutos, em seguida foi retirada uma alíquota (1mL) para a diluição seriada e plaqueamento das diluições  $10^5$  a  $10^7$  em meio de cultura YMA com vermelho congo.

Na semeadura foram plantadas seis sementes por vaso e no sexto dia após o plantio (DAP) foi realizado o desbaste deixando duas plantas por vaso. A irrigação foi efetuada por capilaridade utilizando a solução nutritiva de Arnold & Hogland (1950) modificada por Silveira (1998), a qual foi renovada a cada três dias.

A colheita foi realizada aos 40 DAP e foram realizadas as seguintes avaliações: altura de plantas, comprimento da raiz, matéria seca da parte aérea (MSPA), da raiz (MSR) e dos nódulos (MSN), relação MSPA/MSR, número e tamanho de nódulos, nitrogênio acumulado na MSPA pelo método de Kjeldahl segundo Bremner (1965), nodulação específica (GULDEN & VESSEY, 1998), teor de N e eficiência do  $N_2$  ( $EfN_2$ ).

O delineamento experimental usado foi em blocos casualizados com quatro blocos utilizando 3 veículos e dois métodos de inoculação e um tratamento controle (sem inoculação). Os dados foram submetidos à análise de variância, utilizando o Guided Data Analysis Procedure do SAS (SAS Institute, 1999), com nível de significância de 5% pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## **Resultados e Discussão**

Pode-se verificar na Tabela 3 (experimento I) que os veículos de inoculação, turfa e biopolímeros (EI-6 e xantana) armazenados nos diferentes tempos estudados mantiveram a maior densidade populacional na faixa de  $1,12 \cdot 10^7$  a  $0,25 \cdot 10^6$  de bactérias viáveis pela contagem do NMP (Número mais provável), baseados na estimativa dentro da confiabilidade de 95% ( $x \pm 6,6$ ) pelo método de infecção em plantas, a turfa no tempo 0 (contado após 2 dias de maturação), no biopolímero- EI-

6 aos 15 e 45 dias e no biopolímero- xantana aos 0, 15 e 45 dias. Este método, sendo um processo indireto de contagem envolvendo inoculação de diluições crescentes, é contudo inferior ao método de contagem em placas (DATE & VINCENT, 1962; WEAVER et al. 1972; FIGUEIREDO et al. 1992) o qual subestima a quantidade de bactérias viáveis, porém estão em concordância dentro da confiabilidade do NMP. No veículo biopolímero (EI-6) no tempo 0, a nodulação foi prejudicada, indicando que algum fator interferiu na capacidade de infecção em planta, inferindo problemas na homogeneização, visto que nos 15 dias e 45 dias o veículo apresentou uma maior nodulação e conseqüentemente maior densidade populacional.

Em estudo para avaliar a sobrevivência de *Bradyrhizobium* em diferentes veículos, Figueiredo et al. (1992) testaram a diatomita, composto urbano, vinhaça seca, vermiculita e pó-de-coco em comparação com a turfa, armazenados a 5° C. Os pesquisadores verificaram que dos veículos estudados o pó-de-coco e a vermiculita apresentaram um ligeiro declínio populacional aos 30 dias, e que o maior número de bactérias para todos os veículos ocorreu aos 90 dias, quando realizada a contagem pelo método de infecção em planta por um período de 30 a 240 dias em câmara de crescimento, utilizando como planta teste a cunha (*Clitoria ternatea* L.)

Schuh (2005) utilizando biopolímeros como suporte para inoculante, na forma de gel e líquido, observou que o valor das unidades formadoras de colônias em placas de Petri. Mostrou que a curva de sobrevivência dos inoculantes formulados com os biopolímeros apresentou uma redução mais lenta e gradual do número de células viáveis num período de armazenamento de 0 a 360 dias, quando comparadas com a do inoculante turfoso.

**Tabela 3:** Sobrevivência da estirpe BR3267 em veículos alternativos para inoculantes microbianos (biopolímeros) comparados a turfa até 45 dias de incubação.

Veículos de inoculação	Dia	Faixa de NMP
Turfa	0	$1,12 \cdot 10^7$ --- $0,25 \cdot 10^6$
Turfa	15	$0,39 \cdot 10^7$ --- $0,09 \cdot 10^6$
Turfa	32	$0,39 \cdot 10^7$ --- $0,09 \cdot 10^6$
Turfa	45	$0,39 \cdot 10^7$ --- $0,09 \cdot 10^6$
Biopolímero (EI-6)	0	$0,39 \cdot 10^7$ --- $0,09 \cdot 10^6$
Biopolímero (EI-6)	15	$1,12 \cdot 10^7$ --- $0,25 \cdot 10^6$
Biopolímero (EI-6)	32	$0,39 \cdot 10^7$ --- $0,09 \cdot 10^6$
Biopolímero (EI-6)	45	$1,12 \cdot 10^7$ --- $0,25 \cdot 10^6$
Biopolímero (Xantana)	0	$1,12 \cdot 10^7$ --- $0,25 \cdot 10^6$
Biopolímero (Xantana)	15	$1,12 \cdot 10^7$ --- $0,25 \cdot 10^6$
Biopolímero (Xantana)	32	$0,39 \cdot 10^7$ --- $0,09 \cdot 10^6$
Biopolímero (Xantana)	45	$1,12 \cdot 10^7$ --- $0,25 \cdot 10^6$
Limite de confiabilidade a 95%		$x \div 6,6$

Tumerelo & Denadin (2008) avaliaram a eficiência de acondicionadores a base de polímeros, sendo um deles goma xantana (GX), um biopolímero extraído da bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, e a polivinilpirrolidona (PVP), um polímero sintético, acondicionados a temperatura ambiente, em refrigerador e em freezer, para as bactérias *Ralstonia solanacearum* e *Pectobacterium atrosepticum*, verificaram decréscimo na concentração de células viáveis em ambas as formulações e condições de armazenamento após o 12º mês.

Testes pioneiros foram realizados por Dommergues et al.,(1979), para observar a sobrevivência *Bradyrhizobium* em matrizes de poliacrilamida, bem como sua eficiência em nodular plantas de soja em condições de casa de vegetação, os resultados mostraram que tanto a sobrevivência quanto a nodulação do rizóbio não diferiram na poliacrilamida e na turfa.



**Figura 1:** Sobrevivência de rizóbios em veículos alternativos para inoculante microbiano.

Na Figura 2. (experimento II) pode-se observar a vista geral do experimento em vasos de Leonard na casa de vegetação no Instituto Agrônomo de Pernambuco-IPA.



**Figura 2:** Visão geral do experimento da eficiência simbiótica do caupi inoculados com veículos alternativos em casa de vegetação.

Nas tabelas 4 e 5 as variáveis altura de plantas, massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR), relação MSPA/MSR, número de nódulos (NN), nodulação específica (Nod Esp), teor de nitrogênio (Teor N) e eficiência do  $N_2$  (Ef  $N_2$ ) nas plantas de caupi apresentaram efeito significativo pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade e suas médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Para as variáveis, altura da planta e MSPA todos os tratamentos diferiram estatisticamente do tratamento controle (TA), porém não diferiram entre si, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). As plantas de caupi inoculadas com o veículo turfa foram as que

apresentaram um maior desenvolvimento da parte aérea, sendo seguida pela xantana (P) para a altura da planta, já para a massa seca da parte aérea foi maior nas plantas inoculadas com turfa em pó e líquido (Tabela 4).

Fernandes Junior (2006) utilizando como veículo de inoculação duas misturas poliméricas de carboximetilcelulose e amido (M3 e M4) com a adição de 1% ou ausência de ZnO ou MgO, observou que a massa seca da parte aérea de uma das misturas que não recebeu nenhum dos compatibilizantes destacou-se em relação a turfa na coleta realizada aos 35 dias após a emergência de plantas de feijão caupi.

**Tabela 4:** Altura das plantas (AP), massa seca da parte aérea (MSPA), relação massa seca da parte aérea (MSPA/MSR), número de nódulos (NN) e nodulação específica (Nod Esp) nas plantas de caupi cv “IPA 206” inoculadas com a estirpe BR 3267 usando biopolímeros como veículos de inoculação microbiana em comparação a turfa (veículo tradicional) em dois métodos de inoculação (pó (P) e líquido (L)).

Veículos de inoculação	AP (cm.planta <sup>-1</sup> )	MSPA (g.vaso <sup>-1</sup> )	MSPA/ MSR (g.g <sup>-1</sup> )	NN (vaso <sup>-1</sup> )	Nod Esp (N° nod.MSR <sup>-1</sup> )
Turfa (P)	102,18 A	4,93 A	5,84 A	116,75 A	139,4 A
Biopolímero- EI-6 (P)	78,75 A	3,49 A	5,01 A	113,0 A	160,44 A
Xantana (P)	100,48 A	4,49 A	5,72 A	129,0 A	171,98 A
Turfa (L)	98,4 A	4,54 A	5,72 A	158,0 A	202,27 A
Biopolímero- EI-6 (L)	79,18 A	3,49 A	5,04 A	141,5 A	201,96 A
Xantana (L)	91,13 A	4,18 A	5,48 A	156,0 A	204,02 A
TA *	20,5 B	0,64 B	1,14 A	0 B	0,00 B
CV (%)	25,31	24,02	20,74	18,84	20,70

Na coluna, médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey (P < 0,05). \* testemunha absoluta (controle- sem inoculação).

Os diferentes veículos de inoculação e as duas formas de inoculação (líquido(L) e pó (P)) não influenciaram a relação entre massa seca da parte aérea e massa seca da raiz do caupi, não apresentando diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey (Tabela 4).

Schuh (2005) utilizando biopolímeros na forma de gel e líquido como suporte para inoculante, mantendo plantas de soja sob irrigação ou sob estresse hídrico nos primeiros cinco dias, observou uma redução na produção de massa seca da parte aérea devido à falta de irrigação no início do cultivo para algumas formulações a base de goma xantana, goma arábica, goma jataí e álcool polivinílico.

Silva et al., (2009) avaliando como veículos de inoculação os polímeros e carboximetilcelulose e amido a 60% e 40% (p/v), respectivamente. A partir da proporção 60/40 (CMC/ amido), foram preparadas as misturas poliméricas nas concentrações  $0,8 \text{ g L}^{-1}$  e  $2,2 \text{ g L}^{-1}$ , em água destilada (forma líquida) e na forma gel, respectivamente, inoculadas com cinco estirpes de bactérias diazotróficas e duas variedades de cana-de-açúcar (RB72454 e RB867515). Foi observado na variedade RB72454, um aumento da produtividade de colmos, nesses tratamentos, de  $50 \text{ Mg.ha}^{-1}$  em relação a testemunha absoluta, e os resultados apresentados foram semelhantes ao controle nitrogenado. Para a variedade RB867515, foi observado aumento médio de  $30 \text{ Mg ha}^{-1}$  em relação ao controle absoluto, que também não diferiu do controle nitrogenado.

O número de nódulos e a nodulação específica nas plantas de caupi apresentados na Tabela 4 nos diferentes veículos e métodos (P e L) de inoculação não apresentaram diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) e diferiram do tratamento controle (TA), sendo que os inoculantes líquidos apresentaram um maior número de nódulos e nodulação específica, destacando-se o inoculante turfa líquido para o número de nódulos e a xantana líquido para a nodulação específica.

Jawson et al., (1989) observaram que estirpes de rizóbio, em géis de celulose incubados por 70 dias e inoculados em sementes de soja permitiram a formação de nódulos em número superior ao inoculante turfoso, em condições de campo, apesar da competitividade e das altas populações rizobianas nativas. Fernandes Junior (2006) estudando diferentes composições poliméricas a base de carboximetilcelulose e amido como veículos de inoculação para leguminosas, observou que a nodulação nas composições poliméricas não apresentou diferença da turfa em plantas de feijão caupi aos 35 dias após a emergência.

Para o teor de N na massa seca da parte aérea do caupi as plantas inoculadas com o veículo em pó biopolímero (EI-6) foi superior em relação aos demais tratamentos, diferindo estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade dos tratamentos xantana em pó e do tratamento controle, onde se encontrou o menor teor de N na massa seca da parte aérea, como mostra a Tabela 5.

Fernandes Junior (2006) relatou que em plantas de feijão caupi o nitrogênio total da parte aérea das misturas poliméricas carboximetilcelulose e amido que não recebeu nenhum dos compatibilizantes (M4 NC) diferiu estatisticamente das misturas M3 NC e M3 1% MgO e M4 1%ZnO, porém não diferiu das demais misturas poliméricas, da turfa e dos tratamentos controle absoluto e nitrogenado, em coleta realizada aos 35 dias após a emergência.

Silva (2009) avaliando como veículos de inoculação para a variedade de cana-de-açúcar RB72454, as misturas poliméricas de carboximetilcelulose e amido na proporção 60/ 40 na concentração de 0,8 (g.L<sup>-1</sup>) para o polímero líquido e 2 g.L<sup>-1</sup> para o biopolímero gel, e o inóculo misto (75 mL dos micro-organismos em 175 mL do meio de crescimento), observou quando inoculados os toletes com uma gema de cana-de-açúcar que para a variável N total os tratamentos inóculo misto, polímero gel (IPC 2,2) e polímero líquido (IPC 0,8), não diferiram entre si, mas diferiram do tratamento controle.

No presente experimento, não houve diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) para os tratamentos turfa e biopolímeros (EI-6 e xantana) em pó (P) e líquido (L) em relação a EfN<sub>2</sub>, porém a maior média da eficiência apresentada foi para veículo biopolímero- EI-6 (P), seguido pela turfa (L), turfa (P), xantana (L), EI-6 (L) e xantana (P), respectivamente.

França (2009) avaliando acondicionadores com NaCl a 0,1% em água destilada, Glicerol a 20% em água destilada e Carboximetilcelulose (CMC) a 0,2% em água destilada, encontrou um teor de N de 0,049gN.gMSPA<sup>-1</sup> em plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) quando conservou estirpes de rizóbios em CMC 0,2% por 60 dias, o qual diferiu dos condicionantes NaCl a 0,1% e Glicerol a 20%.

**Tabela 5:** Teor de Nitrogênio (teor N) e eficiência da fixação de N<sub>2</sub> (EfN<sub>2</sub>) nas plantas de caupi cv “IPA 206” inoculadas com a estirpe BR 3267 usando biopolímeros como veículos de inoculação microbiana em comparação a turfa (veículo tradicional) em dois métodos de inoculação (pó (P) e líquida (L)).

Veículos de inoculação	Teor N (mg N g MSPA <sup>-1</sup> )	Ef N <sub>2</sub> (mg N g MSN <sup>-1</sup> )
Turfa (P)	33,22 AB	357,68 A
Biopolímero- EI-6 (P)	40,90 A	389,38 A
Xantana (P)	29,47 B	299,80 A
Turfa (L)	34,47 AB	375,76 A
Biopolímero- EI-6 (L)	36,92 AB	333,98 A
Xantana (L)	34,77 AB	348,86 A
TA*	12,42 C	
CV (%)	15,58	20,59

Na coluna, médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5%.  
\* testemunha absoluta (controle- sem inoculação).

Os dados na tabela 5 demonstram que os biopolímeros (EI-6 e xantana) podem ser indicados como veículo para inoculação rizobiana, principalmente o EI-6 que na variável teor de N foi superior a xantana e ao veículo tradicional (turfa).

## Conclusões

- Os biopolímeros (EI-6 e xantana) inoculados com a BR3267 obtiveram boa sobrevivência do rizobio em número mais provável (NMP) pelo método de infecção plantas mantendo uma densidade populacional superior ao veículo tradicional (turfa) aos 45 dias de incubação.
- Os biopolímeros (EI-6 e xantana) podem ser indicados como veículos para inoculação rizobiana, os quais proporcionaram nodulação, eficiência simbiótica e desenvolvimento no feijão caupi, sendo capaz de substituir a turfa para a produção de inoculantes.
- As duas formas de biopolímeros (pó e líquida) proporcionaram um bom desenvolvimento e uma boa performance simbiótica no feijão caupi cv “IPA 206”.

- O biopolímero EI-6 como veículo para inoculação de feijão caupi com a estirpe BR 3267 foi superior a xantana e a turfa no teor de Nitrogênio acumulado na massa seca da parte aérea.

## Referências

BREMNER J.M.. Total Nitrogen. Methods of soil analysis Part 2- Chemical and Microbiological Properties, number 9 in **the series Agronomy**, American Society of Agronomy, Inc., Publisher USA, p. 1149-1178, 1965.

CÂMARA, G.M.S. Inoculação das sementes de soja. In: CÂMARA, G.M.S. **Soja: tecnologia de produção**. Piracicaba: [s.n.]. p.278-293, 1998.

CARTROUX, G. Trends in rhizobial inoculant production and use. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.230, p.21-30, 2001.

CASSIDY, M.B.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Environmental applications of immobilized microbial cells: a review. **Journal of Industrial Microbiology**. v.16, p.79-101, 1996.

DATE, R. A.; VINCENT, J.M. Determination of the number of root, nodule bacteria in the presence of other organisms. **Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry**. Victoria, v.2, p.5-7, 1962.

DENADIN, N.D. **Avaliação de polímeros para a formulação de inoculantes com *Bradyrhizobium japonicum***. 1997. 100p. Tese de Doutorado – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1997.

DOMMARGUES, Y.R.; DIEM, H.G.; DIVIES, C. Polyacrylamide-entrapped *Rhizobium* as na inoculant for legumes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.37, p.779-781, 1979.

EL-HADDAD, M.E. The present situation of *Rhizobium* legume inoculant in Egypt. In: Workshop **on Rhizobium/ Legume Inoculants**. 1985. Porto Alegre, RS. Proceedings. Porto Alegre. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. p.43-100.

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

FIGUEIREDO, M.V.B.; STAMFORD, N.P.; VIDOR, C.; VILAR, J.J.; OLIVEIRA FILHO, E. C. **Sobrevivência do *Bradyrhizobium* sp.. Em substratos alternativos**. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 27, n. 11, p. 1497-1506, 1992.

FIGUEIREDO, M.V.B. et al., A simbiose do rizóbio com as leguminosas: Desafios e perspectivas. In: ARAÚJO, A.S.F., et al.. **Matéria orgânica e organismos do solo**. 2008. Cap.7, p.149-192.

FRANÇA, C. R. R. S.; **Viabilidade da conservação de estirpes de rizóbio por diferentes condicionadores líquidos**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2009.

GARCÁ-BLÁSQUEZ, C.M. **Adição de montmorilonita e polivinilpirrolidona em substrato turfoso para produção de inoculantes para leguminosas**. 1993. 159 p. (Tese de Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1993.

GULDEN, R.H.; VESSEY, J.K. Low concentrations of ammonium inhibit specific nodulation (nodule number g<sup>-1</sup> root DW) in soybean (*Glycine max* [L.] Merr.). **Plant and Soil**. 198: 127–136, 1998.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. **The water culture method of growing plants without soil**. University of California, Berkeley, 1.ed, 32p, 1950.

HUNGRIA, M; ARAÚJO, R. S. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. EMBRAPA- CNPAJ, Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994, 542p.

INSTITUTO AGRONÔMICO DE PERNAMBUCO. **Cultivares recomendadas pelo IPA para a Zona da Mata de Pernambuco**. Recife: IPA, 2009.

JAWSON, M.D.; FRANZLUEBBERS, A.J.; BERG, R.K. *Bradyrhizobium japonicum* survival in and soybean inoculation with fluid gels. **Applied Environmental Microbiology**, v.55, p.617-622, 1989.

JUNG, G.; MUGNIER, J. Polymer-entrapped *Rhizobium* as an inoculant for legumes. **Plant and Soil**. v.65, p.219-231, 1982.

KEYSER, H.H. et al. Rhizobial ecology and technology. In: METTING, F.B. (Ed) **Soil Microbial Ecology: Applications in Agricultural and Environmental Management**, New York: Marcel Decker, p.205-226, 1992.

LIMA, M. A. G. A. **Obtenção e caracterização de xantanas produzidas por diferentes linhagens de *Xantomonas campestris* pv. *campestris***. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Rio de Janeiro, 1999.

LORDA, G. et al. Peat-based inoculums of *Bradyrhizobium japonicum* and *Sinorhizobium fredii* supplemented with xanthan gum. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v.23, p.1-5, 2007.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA), **Portaria 340 de 28 de Setembro de 2009** – Anexo I. Diário Oficial da União da Republica Federativa do Brasil, Brasília, seção 1, pag. 4 de 01 de Outubro de 2009.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA), **Instrução Normativa SDA/MAPA 30/2010** – Instrução Normativa Nº 30, de, 12 de Novembro de 2010.

MARTINS, L.M.V.; XAVIER, G.R.; NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. 1997. **Características relativas ao crescimento em meio de cultura e a morfologia de colônias de “rizóbio”**. Seropédica. Embrapa Agrobiologia. 14p. (Embrapa-CNPAB. Comunicado Técnico no 19).

**Reunião da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola (RELARE)**. Londrina: Embrapa Soja, 2007. p.24 - (Documentos/ Embrapa Soja, ISSN 1516-781X: n. 290).

ROUGHLEY, R.J. The preparation and use of legume seed inoculant. **Plant and Soil**. 32: 676-701, 1970.

RUMJANEK, N.G.; MARTINS, L.M.V.; XAVIER, G.R.; NEVES, M.C.P. 2005. Fixação biológica do nitrogênio. *In*: Freire Filho, F.R.; Lima, J.A.A.; Ribeiro, V.Q. (Eds.). **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas. p.281-335.

SAS INSTITUTE. **The SAS System for Windows** CD-ROM for Windows 32 bits – 1999.

SCHUH, C. A.; **Biopolímeros como suporte para inoculantes**. 2005. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente) – Universidade Federal de Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

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

SILVEIRA, J. A. G.; CONTADO, J. L.; RODRIGUES, J. L. M.; OLIVEIRA, J. T. A. Phosfoenolpyruvate carboxylase and glutamine synthetase activities in relation to nitrogen fixation in cowpea nodules. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 10, n. 1, p. 19-23, 1998.

SOARES; A.L.L.; PEREIRA, J.P.A.R.; FERREIRA, P.A.A.; VALE, H.M.M.; LIMA, A.S.; ANDRADE, M.J.B.; MOREIRA, F.M.S. Eficiência agrônômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões (MG). I – Caupi. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 30, n.5, p.795-802, 2006.

TEMPRANO, F.J.; ALBAREDA, M.; CAMACHO, M.; DAZA, A.; SANTAMARIA, C.; NONBRE RODRÍGUEZ-NAVARRO, C. Survival of several Rhizobium/ Bradyrhizobium strains on different inoculant formulations and inoculated seeds. **International Microbiology**. v. 5, p.81-86, 2002.

TITTABUTR, P.; PAYAKAPONGA, W.; TEAUMROONGA, N.; SINGLETONB, P.W.; BOONRERDA, N. Growth survival and Field performance of Bradyrhizobium liquid inoculant formulations with polimeric additives. **Science Asia**, v.33, p.69-77. 2007.

TUMELERO, A.I.; DENARDIN, N. D` A. Uso de polimeros em formulacoes para preservacao de *Pectobacterium atrosepticum* e *Ralstonia solanacearum*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, n. 1, p.58-61, 2008.

VINCENT, J. M. **A manual for the pratical study of *Rhizobium* of root bacteria**. Oxford; Blackwells Scientific Publication, 1970. 164p.

VOSS, M. **Inoculação de rizóbio no sulco de semeadura para soja em um campo native, no norte do Rio Grande do Sul**. Passo Fundo: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento: EMBRAPA, 2002. (Comunicado Técnico, 108).

WEAVER, R.W.; FREDERICK, L.R. A new technique for most probable, number counts of *Rhizobium*. **Plant and Soil**, The Hague, v. 36, p.219-222, 1972.

YARDIN, M.R.; KENNEDY, I.R.; THIES, J.E. **Development of high quality carrier materials for field delivery of key microorganisms used as biofertilisers and biopesticides**. Radiation Physics and Chemistry, Washington, v.57, p.565-568, 2000.

XAVIER, T. F.; **Produção e caracterização de exopolissacarídeos (EPSs) sintetizados por microorganismos diazotróficos**. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo). Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, 2009.

## **CONCLUSÕES GERAIS**

A estirpe EI-6 foi superior em relação ao isolado IPA-49 onde apresentou uma maior produção de exopolissacarídeo (EPS) na temperatura de 33° C e no tempo de cultivo de 144 h.

A maior produtividade de EPS sintetizado é apresentada pela estirpe EI-6 quando cultivada a temperatura de 33° C, acima desta temperatura ocorre uma queda.

A maior viscosidade do caldo bacteriano é apresentada pela estirpe EI-6 no tempo de cultivo de 144 horas à temperatura de 33° C.

A viscosidade aparente do caldo bacteriano aumenta com o tempo de cultivo nos rizóbios estudados

Os biopolímeros (EI-6 e xantana) inoculados com a BR3267 obtiveram boa sobrevivência do rizobio em número mais provável (NMP) pelo método de infecção plantas mantendo uma densidade populacional superior ao veículo tradicional (turfa) aos 45 dias de incubação

Os biopolímeros (EI-6 e xantana) podem ser indicados como veículos para inoculação microbiana, os quais proporcionaram nodulação, eficiência simbiótica e desenvolvimento no caupi, sendo capaz de substituir a turfa para a produção de inoculantes

As duas formas de biopolímeros (pó e líquida) proporcionaram um bom desenvolvimento e uma boa performance simbiótica no caupi cv "IPA 206".

O biopolímero EI-6 como veículo para inoculação de feijão caupi com a estirpe BR 3267 foi superior a xantana e a turfa no teor de Nitrogênio.