

Influência do Meio de Cultivo sobre a População e Produção de Exopolissacarídeos por *Azospirillum brasilense* Ab-V5

Karina Maria Lima Milani¹, Odair José Andrade Pais dos Santos¹, Mayara Barbosa Silva¹, Diana Leziér¹, Beatriz Pazzanese Barreira¹ e André Luiz Martinez de Oliveira¹

¹ Universidade Estadual de Londrina - Departamento de Bioquímica e Biotecnologia
Caixa Postal 6001 – CEP 95070 Londrina – Pr - E-mail: milanibio@gmail.com

RESUMO

*As Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal (BPCV) são conhecidas pela sua capacidade de promoção do crescimento da planta, e são utilizadas para produzir diferentes inoculantes comerciais para as culturas agrícolas. Devido à necessidade de obtenção de formulação contendo células com elevada qualidade fisiológica, o objetivo do trabalho foi avaliar a densidade populacional e produção de exopolissacarídeos (EPS) por *Azospirillum brasilense* Ab-V5 em diferentes meios de cultivo. Para o ensaio, a estirpe de *A. brasilense* Ab-V5 foi cultivada em cinco meios de cultivo, diferentes na composição e relação C/N. Foram avaliadas a viabilidade celular e a concentração de EPS em diferentes tempos de cultivo. Dentre as formulações testadas, FORM2, FORM4 e FORM15 apresentaram uma concentração de células acima de 1×10^8 células por mL de cultivo, sendo que a FORM4 apresentou as maiores populações em todas as avaliações. A produção de EPS ocorreu com maior intensidade na formulação FORM2.*

Palavras-chave: Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal (BPCV), Inoculantes agrícolas e Viabilidade Celular.

INTRODUÇÃO

As BPCV se associam a diferentes espécies de plantas em ambientes naturais, e apresentam a capacidade de promover o crescimento das plantas através de diferentes mecanismos como: a fixação biológica de nitrogênio (FBN), produção de fitormônios, solubilização de fosfato, síntese de sideróforos, produção de antibióticos, entre outros¹. O estudo das associações entre BPCV e as plantas demonstram alto potencial para a produção de inoculantes, e estes podem contribuir significativamente com a redução ao uso de agroquímicos.

Apesar dos resultados promissores encontrados devido à utilização de inoculantes agrícolas, diversos fatores influenciam a eficiência da tecnologia, e formulações inadequadas são frequentemente as barreiras mais comuns para a comercialização dos mesmos. Para que se possam formular e produzir comercialmente os inoculantes, é necessária uma integração dos parâmetros físicos, químicos e biológicos nestes produtos, permitindo assim a manutenção de elevadas populações do micro-organismo alvo e um maior tempo de sobrevivência em prateleira e no campo². Diferentes substâncias produzidas pelos micro-organismos possuem influência quanto ao comportamento e sobrevivência das células microbianas adicionadas aos veículos³. Neste contexto o desenvolvimento de formulações para a veiculação de BPCV que proporcionem um maior número de bactérias sob condições de campo, e que apresentem um tempo de

armazenamento prolongado e uma proteção dos micro-organismos selecionados contra os fatores deletérios do solo, associando ainda baixo custo e facilidade de produção, pode aumentar a eficiência desta tecnologia⁴. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi avaliar a densidade populacional e a produção de exopolissacarídeos (EPS) por *Azospirillum brasilense* Ab-V5 em diferentes meios de cultivo, uma vez que estes parâmetros são indicadores de qualidade em formulações inoculantes.

MATERIAL E MÉTODOS

Micro-organismo e Preparo dos Meios de Cultivo

O micro-organismo utilizado foi a estirpe Ab-V5 de *Azospirillum brasilense*, registrada no MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) para uso como inoculante nas culturas de milho, trigo e arroz.

Para o ensaio, foram preparadas cinco formulações de meio de cultivo, a partir da mistura de concentrações definidas de diferentes componentes (FORM1; FORM2; FORM3; FORM4 e FORM15). A composição das formulações estão em processo de obtenção de patente. Em seguida, 500 mL de cada formulação foram transferidos para Erlenmeyers com capacidade total de 2 L e esterilizados. Posteriormente, cada Erlenmeyer foi inoculado com uma suspensão bacteriana de *A. brasilense* Ab-V5 contendo uma concentração de 10^4 células no início dos cultivos. Os cultivos foram incubados sob agitação de 180 rpm a 28 °C, por um período de até 120 horas.

Avaliações

As formulações foram avaliadas em três tempos de cultivo, 72, 96 e 120 horas após a inoculação. Em cada tempo de cultivo, foram determinadas a viabilidade celular de *A. brasilense* Ab-V5, e concentração de exopolissacarídeo (EPS) nos meios de cultivo.

A avaliação da viabilidade celular foi realizada através da contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) pelo método da gota⁵. Para determinação da produção de EPS, 10 mL das culturas de cada formulação foram centrifugadas a 9.000 rpm por 15 minutos a 4°C para obtenção do extrato livre de células (ELC). O EPS presente no ELC foi precipitado pela adição de 30 mL de etanol, seguido de incubação a -20°C durante 24 horas e centrifugação (9000 rpm, 4° C, 15 min.). Posteriormente, o precipitado foi solubilizado no menor volume possível de água destilada (cerca de 5 mL) e submetido à diálise por 3 dias consecutivos. Após a diálise, o material foi liofilizado e pesado.

Análises Estatísticas

Os resultados foram analisados para comparação das médias pelo teste de tukey 5% de probabilidade, por meio do software SASM- Agri. Também correlacionou-se a produção de EPS com o tempo de cultivo por meio do Software MS Excel.

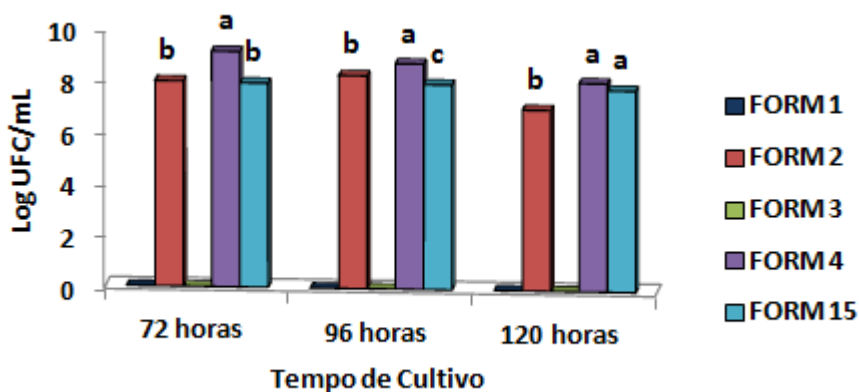
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da contagem de UFC demonstraram uma variação na manutenção de elevadas populações de *A. brasilense* Ab-V5 entre as formulações testadas (Figura 1). Essa variação pode ser explicada pela diferença na concentração dos componentes presentes nas diferentes formulações, como já observado em alguns trabalhos com *Azospirillum spp*⁶⁻⁷.



Observa-se que após 72 e 96 horas de cultivo, as maiores populações de *A. brasilense* Ab-V5 foram encontradas no meio FORM4 ($1,7 \times 10^9$ e $6,3 \times 10^8$ UFC/mL). As formulações FORM2 (1×10^8 e 2×10^8 UFC/mL) e FORM 15 ($9,4 \times 10^7$ e 1×10^8 UFC/mL) também apresentaram elevadas contagens. Já em 120 horas de cultivo não houve diferença significativa nas populações presentes nos meios FORM4 e FORM15, devido ao decaimento das contagens observadas para o meio FORM4. Considerando todos os tempos de cultivo, a FORM4 foi a que apresentou maior potencial de utilização para o desenvolvimento de um inoculante. Não foi possível a determinação do número de UFC de *A. brasilense* Ab-V5 quando cultivado nos meios FORM1 e FORM2, e este resultado pode ter ocorrido tanto pela diminuição da viabilidade das células (formação de estruturas de resistência, como esporos), como também pela extinção.

Figura 1. Logaritmo do número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) de *A. brasilense* nas diferentes formulações testadas. As letras comparam as médias entre as formulações dentro de cada tempo de cultivo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



Com relação à quantificação de EPS, observou-se que todas as formulações induziram *A. brasilense* Ab-V5 a produzir EPS, embora a quantidade de EPS produzido tenha variado entre as formulações testadas (Figura 2). O conteúdo de EPS foi positivamente correlacionado com o tempo de cultivo para FORM1 ($r^2=0,5$), FORM2 ($r^2=0,74$), FORM4 ($r^2=0,88$), FORM15 ($r^2=0,86$), e as maiores concentrações foram observadas após 120 horas de crescimento. Tem-se que com 72 horas de cultivo não houve diferença significativa na produção do polímero, no entanto com 96 e 120 horas a maior produção de EPS foi observada na FORM 2 com um máximo de 1,56 g de EPS/L de cultura. Considerando os resultados de contagem e produção de EPS, é interessante observar que mesmo na incapacidade de determinação do número de UFC na FORM1 e FORM3, foi possível observar tanto o aumento (FORM1) como a diminuição (FORM3) na concentração de EPS, indicando a ocorrência de atividade metabólica.

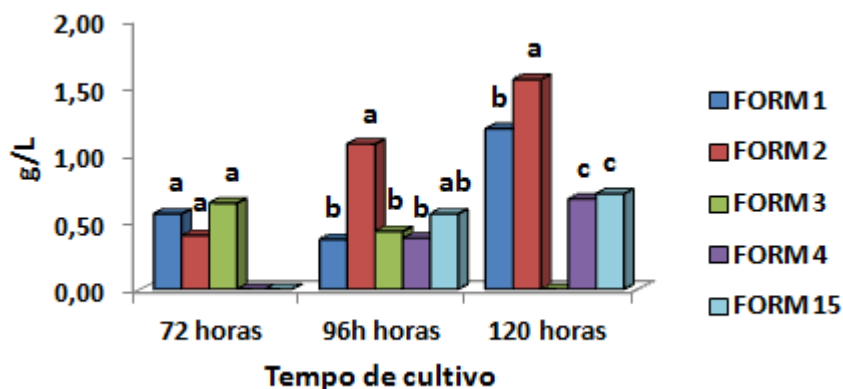
O EPS produzido por *A. brasilense* tem grande importância no desenvolvimento de novas formulações de inoculantes. Isso porque sabe-se que o EPS exerce um importante papel na proteção das células microbianas contra a dissecação e na adesão à superfícies, podendo assim facilitar a sobrevivência das células em condições desfavoráveis e facilitar a adesão sobre sementes, por exemplo. Neste contexto, a produção desse polímero deve ser um parâmetro adicional a ser avaliado nos estudos realizados com o objetivo de aumentar a eficiência dos inoculantes.



III SIMBBTEC
Londrina 2013

Anais do III Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia Trabalho Completo apresentado na seção: PÔSTER

Figura 2. Produção de Exopolissacarídeos (EPS) por *A. brasilense* Ab-V5 cultivado em diferentes formulações de meio de cultura. As letras comparam as médias entre as formulações dentro de cada tempo de cultivo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



CONCLUSÕES

Dentre as formulações testadas, a FORM 4 apresentou um alto potencial para o cultivo em massa de *A. brasilense* Ab-V5, e pode servir como base para o desenvolvimento de novas formulações inoculantes. A grande produção de EPS nas demais formulações testadas também indica seu potencial para a produção de biomassa celular com alta qualidade fisiológica para uso em formulações inoculantes.

REFERÊNCIAS

- (1) DOBBELARE, S.; VANDERLEYDERN, J.; OKON, Y. Plant-growth promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, 22:107-149, 2003.
- (2) STEPHENS, J. H.G.; RASK, H. Inoculant production and formulation. **Field Crops Research**, Amsterdam. v.65, p. 249-258, 2000.
- (3) KACL, 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**, v. 156, n. 4, p. 522-531, 2005.
- (4) DÍAZ-FRANCO, A.; MAYEK-PÉREZ, N. LA BIOFERTILIZACIÓN COMO TECNOLOGÍA SOSTENIBLE. **Consejo Nacional d Ciencia y Tecnologia**, p. 167-186, 2008.
- (5) MILES, A. A.; MISRA, S.S. The estimation of the bacterial power of the blood. *Journal of hygiene*. Cambridge, v. 38, p. 732-749, 1938.
- (6) BASHAN, Y.; TREJO, A.; DE-BASHAN, L. E. Development of two culture media for mass cultivation of *Azospirillum* spp. and for production of inoculants to enhance plant growth. **Biology and Fertility of Soils**, v. 47, n. 8, p. 963-969, 7 abr. 2011.
- (7) KUMARESAN, G.; REETHA, D. Survival of *Azospirillum brasilense* in liquid formulation amended with different chemical additives. **Journal of Phytology**, v. 3, n. 10, p. 48-51, 2011.