

387-1

REG. 16087

UFRGS
Faculdade de Agronomia
BIBLIOTECA

TECNOLOGIA DA PRODUÇÃO DE INOCULANTE DE *Bradyrhizobium japonicum* EM FERMENTADOR E EM TURFA

Claudio Luis Crescente Frankenberg¹

Dissertação apresentada como um dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Porto Alegre

Abril, 1990

1) Engenheiro Químico (PUC-RS), bolsista da CAPES.

CIP - CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

F829t Frankenberg, Claudio Luis Crescente
Tecnologia da produção de inoculante de
Bradyrhizobium japonicum em fermentador e
em turfa / Claudio Luis Crescente Frankenberg.
- Porto Alegre : UFRGS, AGRP, 1990.
xiii, 206f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Feder-
al do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-Gra-
duação em Agronomia - Microbiologia Agrícola
e do Ambiente, Porto Alegre, 1990.

1. Bradyrhizobium japonicum : Temperatura :
Influência da : Fermentador de bancada. 2. Bra-
dyrhizobium japonicum : Agitação : Influência
da : Fermentador de bancada. 3. Bradyrhizobium
japonicum : Competição : Estirpe Senia 587 :
Estirpe Senia 5019. 4. Bradyrhizobium japoni-
cum : Inoculante turfoso. 5. Bradyrhizobium
japonicum : Sítio de nodulação. 6. Bradyrhizo-
bium japonicum : Soja : Inoculação. I. Título.

CDD: 631.46

CDU: 631.461.5(043.5)

Catálogo na publicação: Bibliote-
ca da Faculdade de Agronomia da UFRGS.

16087

T
631.46
F829T
E.2

AGR
1990/387-1
1991/12/20

CLÁUDIO LUIS CRESCENTE FRANKENBERG
Eng. Químico (PUC/RS)

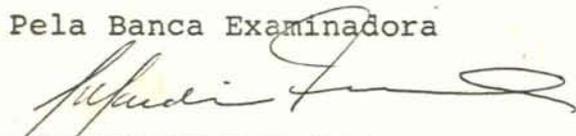
DISSERTAÇÃO

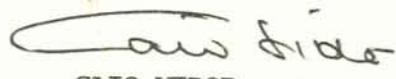
Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

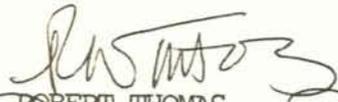
MESTRE EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

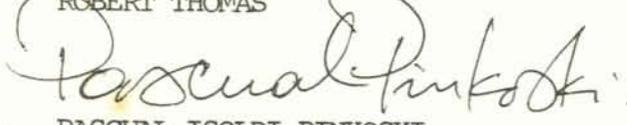
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
FACULDADE DE AGRONOMIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Aprovada em: 11.04.1990
Pela Banca Examinadora


JOÃO RUY JARDIM FREIRE
Orientador


CAIO VIDOR


ROBERT THOMAS


PASCUAL ISOLDI PINKOSKI
CIENTEC

Homologada em: 02.07.1990
Por,


CAIO VIDOR
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Agronomia


EMA MAGALHÃES LEBOUTE
Diretora da Faculdade de
Agronomia

AGRADECIMENTOS

Aos Professores João Ruy Jardim Freire e Robert Thomas pela orientação, estímulo e sugestões no desenvolvimento deste trabalho.

A CAPES pelo apoio financeiro.

Aos colegas do Departamento de Biotecnologia da CIENTEC, em especial a Pascual Isoldi Pinkoski, pela colaboração e pelas facilidades laboratoriais fornecidas durante o desenvolvimento da pesquisa.

Ao Departamento de Solos (UFRGS), à Seção de Microbiologia do Solo (IPAGRO) e ao Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (UFRGS) pelo apoio no presente trabalho.

A todos os colegas do Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da PUC-RS, principalmente à Mara Lucia Fernandes Carneiro, pelo apoio, compreensão e estímulo constante.

Aos meus pais, Claudio Onofre Frankenberg e Olinda Cunha Frankenberg, e a minha tia Francisca Vezaro Cunha, pelo apoio e estímulo constante.

Um agradecimento especial a Magda Beatriz Galant François e a Sidnei Barcellos Felix, pelo carinho, incentivo e paciência durante a realização deste trabalho.

TECNOLOGIA DA PRODUÇÃO DE INOCULANTE DE *Bradyrhizobium japonicum* EM FERMENTADOR E EM TURFA¹

Autor: Claudio Luis Crescente Frankenberg
Orientador: Prof. João Ruy Jardim Freire

RESUMO

Verificou-se a influência da temperatura e da agitação ótima para o desenvolvimento da estirpe SEMIA 587 de *Bradyrhizobium japonicum* em fermentador de bancada. A variação da temperatura, nos estudos cinéticos, influenciou de forma mais marcante o desenvolvimento microbiano do que a variação da agitação. Os melhores resultados a nível de rendimento foram obtidos utilizando-se uma temperatura de 28°C e uma agitação de 230 rpm.

Fez-se também um estudo da competição entre as estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 em fermentador, inoculante turfoso e por sítio de nodulação. A estirpe SEMIA 587, quando desenvolvida conjuntamente com a SEMIA 5019, atingiu aproximadamente 70% da população total após 120 horas de processo. Esta mistura mais as elaboradas com 30, 50 e 70% da estirpe SEMIA 587, foram utilizadas como tratamentos para a inoculação em soja e também para a impregnação em turfa esterilizada. Nestes experimentos observou-se uma predominância da estirpe SEMIA 587, em relação à SEMIA 5019, em fixar nitrogênio e competir por sítios de nodulação e também no inoculante. Os resultados confirmam a possibilidade de utilização dos cultivos mistos, desde que sejam encontradas condições operacionais para o desenvolvimento ótimo das duas estirpes.

1) Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (219p.) - Abril, 1990.

TECHNOLOGY FOR THE PRODUCTION OF INOCULANTS OF *Bradyrhizobium japonicum* IN FERMENTOR AND IN PEAT¹

Author: Claudio Luis Crescente Frankenberg
Adviser: Prof. João Ruy Jardim Freire

SUMMARY

The influence of temperature and agitation on the development of *Bradyrhizobium japonicum* strain SEMIA 587 was investigated using a bench-top fermentor. Change in temperature had a greater influence on microbial development than did variation of agitation rate. The best results in terms of yield were obtained using a temperature of 28°C and an agitation rate of 230 rpm.

The competition between *B. japonicum* strains SEMIA 587 and SEMIA 5019 was studied in liquid media in a fermentor, in peat-based inoculant and for nodule sites in soybeans. When grown with strain SEMIA 5019, SEMIA 587 accounted for 70% of the final population after 120 hours. Soybeans was inoculated with mixtures containing 30, 50 and 70% of strain SEMIA 587, the remainder of the mixture being SEMIA 5019. Sterilized peat was also inoculated with the same proportion of strains. In these experiments strain SEMIA 587 predominated in terms of competition for nodule sites, dinitrogen fixation and survival in sterilized peat. The results indicate that it is possible to use mixtures of the two strains if growth conditions are selected and optimized for both strains.

1) M.Sc. Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology - Agronomy Faculty, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre (p.219) - April, 1990.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 Fatores que afetam o estudo da cinética de crescimento microbiano	5
2.1.1 Agitação e aeração	24
2.1.2 Temperatura	32
2.2 Competitividade entre estirpes de rhizóbio	40
2.3 Comportamento e sobrevivência de rhizóbio em turfa	48
3 MATERIAIS E MÉTODOS	52
3.1 Avaliação da influência da agitação no desenvolvimento da estirpe SEMIA 587 em caldo nutritivo	52
3.2 Avaliação da influência da temperatura no desenvolvimento da estirpe SEMIA 587 em caldo nutritivo	55
3.3 Estudo da competição das estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 em caldo nutritivo	56
3.4 Avaliação da capacidade competitiva das estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 por sítios de nodulação em areia e solução nutritiva em soja	59
3.5 Avaliação da competição e sobrevivência das estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 em turfa esterilizada	61
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	65
4.1 Avaliação da agitação ótima para o crescimento da estirpe SEMIA 587 em fermentador	65
4.2 Avaliação da temperatura ótima para o crescimento da estirpe SEMIA 587 em fermentador	79
4.3 Avaliação da capacidade competitiva entre as estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 em caldo nutritivo	92
4.4 Avaliação do potencial de fixação de nitrogênio e capacidade competitiva por sítios de nodulação	107
4.5 Avaliação da sobrevivência e competição em turfa esterilizada	115
5 CONCLUSÕES	129

	Página
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	132
7 APÊNDICES	152

RELAÇÃO DE TABELAS

		Página
1.	Duração da fase de crescimento exponencial em horas e a taxa de crescimento nesta fase (v) em número de células por mililitro e por hora, da estirpe SEMIA 587 de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> , em fermentador, para as diferentes velocidades de agitação estudadas. Média de quatro repetições ..	69
2.	Produtividade máxima em número de células por litro e por hora, em fermentador, da estirpe SEMIA 587 de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> para as diferentes velocidades de agitação estudadas. Média de quatro repetições	71
3.	Velocidade específica de crescimento máxima (μm), erro absoluto que afeta ($\Delta \mu$) e erro relativo que afeta a concentração celular (α) da estirpe SEMIA 587 de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> , em fermentador, para as diferentes velocidades de agitação estudadas	75
4.	Tempo de geração em horas da estirpe SEMIA 587 de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> , em fermentador, para as diferentes velocidades de agitação estudadas. Média de quatro repetições	76
5.	Valores de pH obtidos após 12 horas de fermentação da estirpe SEMIA 587 de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> para as diferentes velocidades de agitação estudadas. Média de quatro repetições	78
6.	Produtividade máxima em número de células por litro e por hora da estirpe SEMIA 587 de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> para as diferentes temperaturas de operação estudadas em fermentador. Média de quatro repetições	83
7.	Duração da fase de crescimento exponencial em horas e a taxa de crescimento nesta fase (v) em número de células por mililitro e por hora da estirpe SEMIA 587 de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> para as diferentes temperaturas de operação estudadas em fermentador. Média de quatro repetições.	84

8.	Tempo de geração em horas da estirpe SEMIA 587 de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> para as diferentes temperaturas de operação estudadas em fermentador. Média de quatro repetições	86
9.	Velocidade específica de crescimento máxima (μm), erro absoluto que afeta ($\Delta\mu$) e erro relativo que afeta a concentração celular (α) da estirpe SEMIA 587 de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> para as diferentes temperaturas de operação estudadas, em fermentador	87
10.	Valores de pH obtidos após 12 horas de fermentação da estirpe SEMIA 587 de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> para as diferentes temperaturas de operação estudadas. Média de quatro repetições	90
11.	Duração da fase de crescimento exponencial e taxa de crescimento (ν) para os tratamentos com as estirpes SEMIA 587, SEMIA 5019 e com a mistura das duas em fermentador. Média de quatro repetições	94
12.	Velocidade específica de crescimento máxima (μm), erro absoluto que afeta ($\Delta\mu$) e erro relativo que afeta a concentração celular (α) para os tratamentos com as estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 isoladamente, e com a mistura das duas, em fermentador	95
13.	Tempo de geração (G) e produtividade máxima (Pm) para os tratamentos com as estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 isoladamente, e com a mistura das duas, em fermentador. Média de quatro repetições	96
14.	Valor inicial e final da concentração celular em gramas por litro e os valores do rendimento celular em função do substrato (Y) para os tratamentos com as estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 isoladamente, e com a mistura das duas em fermentador. Média de quatro repetições	101
15.	Número e percentagem de ocorrência das estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 nas colônias tipificadas, para os respectivos tempos de desenvolvimento, em fermentador	105

16.	Número de nódulos, peso dos nódulos, rendimento de matéria seca da parte aérea e nitrogênio total na parte aérea de soja, da cultivar Bragg, inoculada com diferentes suspensões bacterianas das estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> em areia e solução nutritiva. Média de cinco repetições	110
17.	Número e percentagem de ocorrência das estirpes de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> nos nódulos de soja, da cultivar Bragg, semeada em areia e caldo nutritivo, em resposta à inoculação com as estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 individualmente e com a mistura destas (TF1, TP1, TP2 e TP3)	114
18.	Taxa semanal de mortalidade (κ) dos inoculantes com <i>Bradyrhizobium japonicum</i> para os tratamentos com as estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 isoladamente, e as misturas TF1 (69% SEMIA 587 + 31% SEMIA 5019) e TP2 (50% SEMIA 587 + 50% SEMIA 5019). Média de quatro repetições	121
19.	Percentagem de ocorrência das estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> nas colônias tipificadas para o tratamento TF1 (69% SEMIA 587 + 31% SEMIA 5019) nos respectivos períodos de incubação	122
20.	Percentagem de ocorrência das estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> nas colônias tipificadas para o tratamento TP2 (50% SEMIA 587 + 50% SEMIA 5019) nos respectivos períodos de incubação	123

RELAÇÃO DE FIGURAS

		Página
1.	Curvas de crescimento em fermentador da estirpe SEMIA 587 de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> nas agitações de 100, 230 e 500 rpm. Média de quatro repetições	66
2.	Influência da agitação na concentração celular máxima, obtida durante as 120 horas de processo, para a estirpe SEMIA 587 de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> . Média de quatro repetições	67
3.	Influência da agitação na velocidade específica de crescimento máxima da estirpe SEMIA 587 de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> . Média de quatro repetições.	73
4.	Curvas de crescimento em fermentador da estirpe SEMIA 587 de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> para as temperaturas de 22, 26, 28, 34 e 38°C. Média de quatro repetições	80
5.	Influência da temperatura na concentração celular máxima, obtida durante as 120 horas de processo, para a estirpe SEMIA 587 de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> . Média de quatro repetições	81
6.	Influência da temperatura na velocidade específica de crescimento máxima da estirpe SEMIA 587 de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> . Média de quatro repetições	88
7.	Curvas de crescimento em fermentador de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> correspondentes aos tratamentos com a estirpe SEMIA 587, com a estirpe SEMIA 5019 e com a mistura (587 + 5019). Média de quatro repetições	91
8.	Curva de crescimento celular (—) e de consumo de substrato (— —) para o tratamento com a estirpe SEMIA 587 de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> em fermentador. Média de quatro repetições	98

	Página
9. Curva de crescimento celular (—) e de consumo de substrato (— —) para o tratamento com a estirpe SEMIA 5019 de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> , em fermentador. Média de quatro repetições	99
10. Curva de crescimento celular (—) e de consumo de substrato (— —) para o tratamento com a mistura (587 + 5019) de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> , em fermentador. Média de quatro repetições	100
11. Curvas de variação do pH em função do tempo de processamento para os tratamentos com a estirpe SEMIA 587, com a estirpe SEMIA 5019 e com a mistura (587+5019) de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> em fermentador. Média de quatro repetições	103
12. Representação do logaritmo da concentração celular do tratamento mistura (587+5019) para os diferentes tempos de desenvolvimento em fermentador, indicando a percentagem da estirpe SEMIA 587 (□) em relação a estirpe SEMIA 5019 (■) ..	106
13. Curvas de crescimento das estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> correspondentes ao percentual de cada uma em relação ao tratamento mistura (587+5019), em fermentador .	108
14. Curva representativa da perda de umidade em função do tempo de armazenamento, à temperatura ambiente, do inoculante à base de turfa esterilizada	116
15. Curvas de sobrevivência de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> em turfa esterilizada, impregnada com os tratamentos TF1, (69% SEMIA 587 + 31% SEMIA 5019) TP2 (50% SEMIA 587 + 50% SEMIA 5019) e com as estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 isoladamente. Média de quatro repetições	119
16. Representação do logaritmo da concentração celular do tratamento TP2 para os diferentes períodos de incubação, indicando a percentagem da estirpe SEMIA 587 (□) em relação à estirpe SEMIA 5019 (■)	124
17. Representação do logaritmo da concentração celular do tratamento TF1 para os diferentes períodos de incubação, indicando a percentagem da estirpe SEMIA 587 (□) em relação à estirpe SEMIA 5019 (■)	125

18. Curvas de sobrevivência das estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 de *Bradyrhizobium japonicum* correspondentes ao percentual de cada uma em relação ao tratamento TF1 (69% SEMIA 587 + 31% SEMIA 5019) ... 126
19. Curvas de sobrevivência das estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 de *Bradyrhizobium japonicum* correspondentes ao percentual de cada uma em relação ao tratamento TP2 (50% SEMIA 587 + 50% SEMIA 5019) ... 127

1 INTRODUÇÃO

Entre os distintos sistemas biológicos capazes de fixar nitrogênio, a simbiose rizóbio-leguminosas contribui com a maior quantidade de nitrogênio ao ecossistema. Calcula-se que a fixação do nitrogênio por leguminosas alcança 20% da quantidade total fixada anualmente sobre o planeta (VIEIRA, 1986).

A indústria de inoculantes não é recente no Brasil. Em 1956 foi instalada a primeira unidade no Rio Grande do Sul, porém somente na década de 70, a produção nacional ganhou força. Isto é decorrente do fato de que a fixação do nitrogênio atmosférico através de microrganismos para a fertilização de plantas demonstrou enorme importância, tanto no aspecto do aumento de produção e/ou produtividade quanto no aspecto de economia de insumos e de energia (DOBEREINER, 1985 e STOUT, 1980). Atualmente existem sete empresas fabricantes de inoculantes no Brasil, sendo três localizadas no Rio Grande do Sul, duas no Paraná, uma em São Paulo e uma no Distrito Federal. A fixação de nitrogênio, segundo FREIRE et alii (1988), é estimada em uma média de 50 kgN/ha/ano, significando que a simbiose rizóbio-soja contribuiu em aproximadamente 600 mil toneladas de nitrogênio para 12 milhões de hectares colhidos desta leguminosa em 1986. Conforme estimativa apresentada por DOBEREINER (1985),

a economia de fertilizantes nitrogenados que se consegue anualmente, apenas na cultura da soja, é da ordem de um bilhão de dólares.

Embora o inoculante para soja esteja sendo produzido industrialmente, ainda persistem diversos problemas tecnológicos, principalmente a falta de conhecimento da cinética de crescimento de *Bradyrhizobium japonicum*, impedindo, assim, a otimização da produção (BONOMI et alii, 1986). Desta forma é de fundamental importância para o País, o desenvolvimento de pesquisas de seleção e melhoramento genético tanto dos vegetais, visando a uma maior eficiência no processo de fixação do nitrogênio, bem como estudos da tecnologia de produção industrial desses microrganismos que serão utilizados no setor agrícola. Os métodos utilizados para a produção de inoculantes são bastante diversificados. Provavelmente o que apresenta maior aplicação, principalmente a nível de escala industrial, é o da multiplicação do rhizóbio em meio líquido utilizando fermentadores ou recipientes de até 1500 litros, conforme a capacidade ou a demanda necessária (VIDOR et alii, 1983). Posteriormente o caldo produzido é impregnado em um suporte, como por exemplo, a turfa, para a partir daí ser comercializado.

A turfa empregada normalmente na produção de inoculantes para leguminosas, é finamente moída, neutralizada e esterilizada, sendo que esta última etapa pode ser realizada por irradiação ou autoclavagem. No Brasil, a irradiação da turfa não é, atualmente, muito utilizada principalmente

devido aos fatos desta técnica não ser amplamente difundida e também ao seu elevado custo. Em função disto, a autoclavagem supre, para pequenas produções, a esterilidade do veículo, apesar de que ainda muitos inoculantes são produzidos com turfa não esterilizada. Muitos estudos vêm sendo realizados com a finalidade de obtenção de novos suportes ou de aumentar a sobrevivência das estirpes na própria turfa.

É hoje reconhecido, também, a necessidade de se introduzir, aos solos, estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* que possuam capacidade para competirem efetivamente por sítios de infecção nodular e para persistirem no solo, além de serem eficientes na fixação do nitrogênio atmosférico. A competição por sítios de infecção nodular pode ser um fator determinante do sucesso ou insucesso da inoculação. Entretanto, antes de estudar a competitividade das estirpes introduzidas em solos contendo alta população de *Bradyrhizobium japonicum*, torna-se necessário o conhecimento do potencial competitivo das estirpes utilizadas como inóculo em solos com baixa população.

Levando-se em conta essas considerações, desenvolveu-se a presente pesquisa, objetivando avaliar-se o crescimento celular em fermentador de bancada da estirpe SEMIA 587 de *Bradyrhizobium japonicum* em diferentes temperaturas de operação e em diferentes velocidades de agitação, com vista à produção industrial de inoculantes. Outro objetivo deste trabalho, foi o de verificar a competição entre as estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 em fermentador, por sítios de infec-

ção nodular e em turfa esterilizada, visando ao estudo da utilização de cultivos mistos na produção industrial, no inoculante turfoso e também a nível de eficiência em fixar o nitrogênio atmosférico.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fatores que afetam o estudo da cinética de crescimento microbiano

A avaliação da cinética microbiana é o primeiro passo a ser efetuado quando do estudo de um processo fermentativo. É através dessa avaliação que se conhece o comportamento do sistema, para então poder direcioná-lo na obtenção de um determinado produto. Segundo BORZANI (1986), a palavra cinética, para os menos avisados, lembra quase sempre uma "ginástica matemática", realizada com o auxílio de equações complexas, objetivando explicar alguns resultados experimentais. Para os pesquisadores que se dedicam a esse campo de estudo, esta "ginástica" é apenas um meio cujo extraordinário potencial já foi muitas vezes comprovado.

Quando um microrganismo é introduzido em um meio de cultura que lhe é bem conveniente, ele desenvolve aí uma atividade relacionada com sua composição e com as condições que o rodeiam (LEVEAU & BOUIX, 1984). Muitos autores baseados neste fato, consideram o crescimento microbiano como um conjunto de reações químicas em cadeia, que levam à síntese dos constituintes da biomassa microbiana obtida no final da operação (MINKEVICH & EROSHIN, 1973; EROSHIN, 1974; NAGAI, 1975; COONEY et alii, 1977; ERICKSON et alii, 1978 e ERICK-

SON et alii, 1978).

Globalmente, o processo microbiológico obedece ao princípio de conservação da matéria. Logo, a medida de valores como a produção de biomassa, a taxa de consumo de oxigênio, a taxa de evolução de calor, a taxa de evolução do CO_2 , e a taxa de utilização de açúcares redutores são usados para obter estimativas do rendimento energético de biomassa (LEVEAU & BOUIX, 1984 e ERICKSON et alii, 1978).

É preciso não esquecer que a retirada de amostras pode afetar os balanços de massa de materiais consumidos ou produzidos durante a fermentação, conduzindo a valores de rendimentos e de fatores de conversão que não representam a realidade (BORZANI & BARALLE, 1983). BORZANI (1985), enfatiza que muito raramente os artigos que relatam resultados experimentais, indicam a incerteza que afeta seus valores, dificultando assim a comparação adequada de resultados obtidos em diferentes trabalhos.

O estudo do crescimento microbiano só pode ser feito validamente se dispusermos de técnicas apropriadas de avaliação da população microbiana cuja evolução deseja-se estudar (LEVEAU & BOUIX, 1984). As concentrações dos substratos envolvidos nos processos fermentativos, na maioria dos casos, constituem o ponto de partida para o estudo da cinética desses processos. Segundo BORZANI (1986), decorre daí a importância da medida dessas concentrações.

As transformações causadas pelas células em um determinado substrato podem ser fortemente influenciadas por

muitas outras que as células microbianas realizam para se manterem vivas e se reproduzirem nas condições em que se encontram. Em função disso, existe a dificuldade de prever-se, dentre as muitas reações provocadas pela população microbiana em um dado processo fermentativo, quais devem ser consideradas para que o estudo da cinética do processo conduza aos melhores resultados práticos (BORZANI, 1986).

Então, avaliar a cinética de uma fermentação requer, necessariamente, um embasamento sobre um considerável número de medidas experimentais. As conseqüências desse estudo, dependem dos métodos utilizados naquelas medidas. A avaliação da quantidade de microrganismo realmente responsáveis por uma fermentação, conforme KUBITSCHK (1969), CALAM (1969), MALLATTE (1969), POSTGATE (1969), STOUTHAMER (1969) e BORZANI (1986), seguramente é uma das maiores dificuldades encontradas quando se pretende estudar a cinética do processo.

Existem muitas técnicas, mas nenhuma convém a todos os casos, e nenhuma é totalmente satisfatória. LEVEAU & BOIUX (1984) ressaltam que os resultados dessas deverão ser interpretados com prudência em razão dos erros e interferências possíveis, e também, da distribuição que essas técnicas permitem ou não fazer entre células vivas e mortas.

A escolha do método a ser utilizado, normalmente não é uma tarefa simples. O que ocorre, na maioria das vezes, é utilizar-se metodologias convencionais e tradicionais sem questionar-se à sua adoção.

Métodos analíticos diferentes para medir o mesmo fenômeno resultam em conclusões distintas, sendo isto mostrado pelo IPT (1984) que examinou a medida da concentração de ART (Açúcares Redutores Totais) em uma mesma amostra, realizada em três laboratórios, utilizando o mesmo método. Os valores variaram em 15%, não havendo então uma harmonização entre estes laboratórios.

A Comissão de Biotecnologia da IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), conforme citado por BORZANI (1986), preocupa-se com esta situação e desenvolve alguns programas específicos que conduzam a métodos analíticos confiáveis e com indicação da incerteza que afeta a medida realizada.

Conforme BORZANI & BARALLE (1983) existem cinco fatores que afetam os valores das concentrações medidas, dependendo, entretanto, das condições em que estas medidas são realizadas. Estes fatores são:

- a) evaporação da água e das substâncias voláteis presentes na amostra a ser analisada;
- b) o arraste de substâncias voláteis ou não, decorrente do borbulhamento de gases;
- c) o acréscimo, durante o ensaio, de soluções como ácidos, antiespumantes, hidróxidos e outras;
- d) a produção de substâncias que alteram o volume da fase aquosa;
- e) a variação do volume da fase aquosa devido ao crescimento celular.

Das diversas substâncias consumidas e produzidas pelos microrganismos, BORZANI (1975) coloca que o primeiro problema que surge é saber quais devem ser escolhidas para o estudo cinético. Uma vez identificados esses componentes e escolhidos os métodos analíticos adequados, o estudo experimental irá se resumir na medida das concentrações dos componentes em função do tempo de duração da fermentação (BORZANI, 1986).

O crescimento microbiano é sempre caracterizado por um número de fatores peculiares ao processo fermentativo. Para cada pesquisador alguns parâmetros são mais significativos do que outros. Em muitas fermentações, porém, é possível identificar alguns componentes do sistema que, seguramente, não podem deixar de serem considerados quando se estuda a cinética de um processo. EROSHIN (1974), salienta que para a bioengenharia além da temperatura ótima, o PH ótimo, a constante de saturação e a taxa de crescimento específica máxima, a variação da concentração celular durante a utilização do substrato orgânico é o parâmetro mais importante no estudo de uma fermentação.

Também para este último autor, a concentração celular juntamente com a eficiência de utilização do oxigênio definem o custo total para a produção de biomassa. THIEMANN (1959), evidencia a concentração de oxigênio dissolvido, o pH e a temperatura como os parâmetros mais importantes que condicionam o andamento de uma fermentação. Para MOSSELL & INGRAM (1955), a condição primordial no desenvolvimento mi-

crobiano é a presença de água no meio fermentativo, caracterizado pela atividade de água (a_w) da célula em estudo.

LEFRANCOIS & REVUZ (1973) e GURARD & SNELL (1974) colocam que a transferência dos nutrientes para o microrganismo, em processos fermentativos submersos, é fundamental para o desenvolvimento cinético, apesar de pouco estudada. Conforme WANG (1979), a condução de um processo de fermentação submersa requer o estudo de vários fatores físicos, químicos e biológicos. Diferentes fatores, segundo LEVEAU & BOUIX (1984) e SIKYTA (1983), são susceptíveis de modificar a distribuição de uma curva de crescimento tais como a concentração dos compostos necessários ao crescimento, a temperatura e o pH. COSTILOW (1981) estudou os fatores biofísicos que afetam o crescimento como o pH, a atividade de água, a pressão osmótica, a temperatura, a pressão, o oxigênio dissolvido e também a taxa de absorção de oxigênio. Conforme BORZANI (1985), a alta complexidade de alguns sistemas e também sua grande variabilidade podem dificultar sobremaneira o estudo de alguns desses fatores.

Segundo THIEMANN (1959), o meio fermentativo juntamente com a cepa de produção, formam o binômio que em grande parte condicionam o sucesso ou insucesso da operação. Outros fatores, naturalmente, influem também no andamento do processo fermentativo, mas não tão acentuadamente quanto os anteriores.

Uma série de efeitos ambientais, podem ser condicionados em grande parte pelo ciclo de esterilização do meio.

THIEMANN (1959), CUNHA (1978), LIMA & BORZANI (1975), DREW (1981) e SCHMIDELL (1976) salientam a importância e as variáveis decorrentes da esterilização (do ar, do meio e dos equipamentos) no processo fermentativo.

Um aspecto importante a ser considerado no estudo da cinética das fermentações, segundo BORZANI (1975), reside no fato de que as concentrações das enzimas não se mantêm constantes com o tempo, o que vem a dificultar o exame dos problemas envolvidos.

Muitas variáveis podem afetar a velocidade de uma reação. Nos sistemas homogêneos, a influência da temperatura, pressão e composição é evidente. Nos sistemas heterogêneos, com mais de uma fase envolvida, o problema torna-se mais complexo; assim, a transferência de massa e a transferência de calor devem ser levadas em consideração (LEVENSPIEL, 1974). Segundo BORZANI (1985), o método utilizado no cálculo de velocidades em um processo fermentativo pode afetar substancialmente o resultado do estudo da cinética do processo.

Como já foi salientado anteriormente, muitos autores (THIEMANN, 1959; ANDREYEVA & BIRYUKOV, 1973; EROSHIN, 1974; COONEY et alii, 1977; CONCONE et alii, 1978 e LEVEAU & BOUIX, 1984), salientam que o pH é um dos fatores mais importantes no que diz respeito ao andamento de uma fermentação.

o pH afeta no conjunto de atividades celulares e também na produção de metabólitos secundários, Esse efeito,

conforme LEVEAU & BOUIX (1984), é manifestado por um fenômeno de comportamento comparável ao da temperatura. Nota-se que a velocidade de crescimento em função do pH atinge um valor máximo em um determinado valor ou zona de pH ótimo. De um lado ou de outro dessa zona ela é menor e torna-se nula (o crescimento microbiano é inibido) para valores suficientemente baixos e elevados.

O estudo cinético de um processo fermentativo leva muitas vezes à proposição de um modelo matemático (ABOUTBOUL et alii, 1988). Segundo BORZANI (1975), muitas tentativas têm sido realizadas no sentido de se procurar interpretar resultados experimentais com auxílio desses modelos. Entretanto, ABOUTBOUL et alii (1988) colocam que registram-se poucas tentativas de análise de sua sensibilidade frente aos parâmetros estudados.

Os modelos matemáticos visam a colaborar na elucidação dos mecanismos envolvidos no processo e a estabelecer um conjunto de equações que possibilitem o adequado controle do sistema e a sua otimização. Embora não apareça com muita frequência, pode-se associar ao modelo proposto uma análise da influência de cada um dos seus parâmetros (BORZANI, 1975 e ABOUTBOUL et alii, 1988). Entre os trabalhos que retratam esse assunto destacam-se: GAUDY et alii (1967); RAMKRISNA et alii (1967); HAMER (1973); BIRYUKOV & TARASONA (1973); ANDREYEVA & BIRYUKOV (1973); BORZANI (1975); FREDRICKSON (1976); CONCONE et alii (1978); MACHON et alii (1978); KJAERGAARD (1978); WANG (1979); BORZANI (1980); BOR-

ZANE & BARALLE (1983); BORZANI (1985); ABOUTBOUL et alii (1988) e BORZANI (1988).

É importante lembrar que modelos diferentes podem conduzir a concordâncias razoavelmente equivalentes, quando comparados com um mesmo conjunto de valores experimentais.

Durante estudos da cinética fermentativa, a estimativa de determinados parâmetros requer o cálculo de derivadas. BORZANI (1975) e SIKYTA (1983) ressaltam que a partir das curvas de crescimento, utilizando derivados, é possível a cada instante, determinar: as velocidades de consumo do substrato, de formação de produtos e de crescimento microbiano. LEDUY & ZAJIC (1973), propuzeram um programa, para determinação dessas derivadas, baseando-se no método de diferenciação geométrica.

Qualquer processo industrial, e as fermentações não fogem à regra, inicia no laboratório ou em escala de bancada, para terminar, se resultados positivos forem alcançados, em processos industriais freqüentemente a níveis de grandeza superiores ao do processo original. Durante a transferência de um processo em escala experimental para um em escala industrial, inúmeros problemas surgem e têm que ser resolvidos, implicando, não poucas vezes, em alterações fundamentais no processo original.

Basicamente, o problema da variação de escala ou "scaling-up" de processos fermentativos só pode ser resolvido com a devida segurança, por tentativas. Existem, contudo, algumas áreas do processo fermentativo onde se con-

centram mais freqüentemente os problemas do escalonamento:

- a) excesso de passagens até a obtenção do volume adequado do inóculo;
- b) esterilização do meio de fermentação;
- c) manutenção da geometria;
- d) constância da velocidade periférica das palhetas no sistema de agitação;
- e) aeração;
- f) custo dos controles;
- g) necessidade de diversos testes antes das partidas de produção.

JACKSON (1985), cita também como problemas no "scale-up" industrial: os aspectos de engenharia bioquímica, a economia de escala, a agitação, a transferência de calor, a esterilização do meio, a esterilização do ar, a recuperação de produtos e as perdas.

Normalmente as etapas ou estágios de desenvolvimento da fermentação, compreendem estudos nos seguintes níveis:

- a) frascos agitados (100 a 1000 ml);
- b) fermentadores experimentais (2 a 20 litros);
- c) fermentadores pilotos (0,5 a 5 m³);
- d) fermentadores industriais (25 a 1000 m³).

Para um bom desenvolvimento do processo, THIEMANN (1959) salienta que, além das aberturas para carga e inspeção, os fermentadores devem apresentar varias linhas de adição, como por exemplo, para: o inóculo, amostragens, os nutrientes, descarga, saída do ar, entrada do ar, antiespumantes.

tes, ácidos e álcalis, etc.

Apesar de todas as limitações que os experimentos a nível de frascos agitados apresentam, os estudos de cinética da fermentação (evolução do pH, crescimento, consumo de carboidratos, consumo de nitrogênio e fosfato, e formação de metabólitos) podem fornecer informações importantes para um melhor escalonamento da fermentação. Frequentemente, a comparação dos dados de fermentação em frascos agitados e em escala piloto por exemplo, podem contribuir para a solução de eventuais causas do insucesso no "scaling-up".

O confronto de resultados de escalas diferentes pode revelar que o processo fermentativo como um todo procede mais lentamente a nível piloto do que a nível de frascos, indicando que possivelmente algum parâmetro seja limitante. Normalmente, a idoneidade dos ingredientes não é parâmetro importante a nível de frascos agitados, pois, devido a sua escala reduzida o problema do custo da matéria prima é secundário, e por estas razões, os ingredientes utilizados são, as vezes, todos de grau analítico. Tal, porém, não é o caso, quando os estudos da fermentação são passados para o nível de fermentadores piloto ou industrial. Nestas escalas, as impurezas presentes nos ingredientes podem influenciar negativamente os rendimentos fermentativos.

Outro parâmetro pouco importante a nível de frascos agitados é a formação de espuma, podendo ser relevante em escalas maiores, exigindo, para seu combate, volumes não insignificantes de antiespumantes.

À medida que um processo é escalonado a nível de escala piloto ou de fermentadores industriais, a técnica de preparação do inóculo sofre, por força da variação de escalas, alterações profundas que compreendem não somente o andamento como também a introdução do cultivo sob condições de agitação e aeração diversas.

COONEY et alii (1977) observam que o controle automático de processos, na fermentação industrial, é correntemente limitado através do controle da temperatura, pH e em poucos casos o oxigênio dissolvido (OD). Muitos pesquisadores (TRAMBOUZE & MUELLER, 1973; LEDUY & ZAJIC, 1973; COONEY et alii, 1977 e WANG et alii, 1977), entretanto, estão agora examinando sistemas de controle mais sofisticados.

KOGA & HUMPHREY (1967), LEFRANCOIS & REVUIZ (1973), BAKER (1978), BLAKEBROUGH (1973), BLAKEBROUGH & MORESI (1981), JACKSON (1985), entre outros autores, além de apresentarem os problemas de "scale-up", também propõem condições favoráveis para o funcionamento dos fermentadores, tanto experimentais quanto industriais.

Conforme DIAS et alii (1988), a definição do processo industrial para a produção de microrganismos, simultaneamente ao desenvolvimento da tecnologia para sua utilização, poderá evitar futuras lacunas no conhecimento que revertiriam, de um lado, no atraso da utilização da tecnologia ou, de outro, na produção dos inoculantes de forma empírica e até mesmo inadequada. Esse autor ainda coloca que um processo fermentativo é caracterizado, principalmente por: micror-

ganismo, meio de cultura, condições de operação e tipo de processo.

Em relação ao desenvolvimento de inoculantes, é fundamental a realização de estudos sobre as diferentes etapas para a sua obtenção. LOPRETO et alii (1973a) colocam que um dos aspectos que deve ser levado em conta, em primeiro lugar, é a obtenção de cultivos para cepas previamente selecionadas além de estabelecer as condições de operação que permitam alcançar elevadas concentrações celulares, em curtos tempos de processo, a fim de diminuir os riscos de contaminação e reduzir os custos de produção. Para BALATTI (1985) o processo fermentativo para obtenção de uma alta concentração celular da suspensão de rhizóbio depende da preparação do meio de cultura, da esterilização, do desenvolvimento do inóculo e do processo fermentativo propriamente dito.

O crescimento do rhizóbio em meio líquido, deve reunir certos requisitos para que os inoculantes obtidos, resultem de alta qualidade e que seu custo seja razoável. Isto é possível através da obtenção de cultivos com altas concentrações em curtos espaços de tempo e empregando-se técnicas simples (BERGERSEN, 1961; LOPRETO et alii, 1972; MAZZA et alii, 1976; FANTI et alii, 1977 e COZZI et alii, 1985).

Entre os inúmeros fatores que afetam o comportamento e a vida útil dos inoculantes para leguminosas, segundo BOIARDI et alii (1983), o principal é o número de

rhizóbios viáveis por grama de preparado. Logo, é importante se dispor de caldos com altas concentrações celulares, sem que isto signifique um incremento nos custos de produção. Essas dificuldades impulsionam o início de programas de pesquisa que objetivem responder as questões colocadas (BONOMI, 1985). A Argentina, por exemplo, vem nos últimos anos realizando uma série de estudos referentes às distintas condições de cultivo e de operação para a produção de inoculantes (LEIDERMAN, 1969; ERTOLA, 1969; LOPRETO et alii, 1972; LOPRETO et alii, 1974; COLOMIZO, 1974 e LOPRETO et alii, 1975).

O IPT, em conjunto com outras instituições de pesquisa, conforme citado por BONOMI (1986) e BONOMI et alii (1986), verificou que embora o inoculante esteja sendo produzido industrialmente, ainda persistem diversos problemas tecnológicos, como:

- a) longo tempo de fermentação para o *Rhizobium japonicum*, e a existência de grande número de tanques de fermentação (em muitos casos não adequados) resultando em produtos de baixa homogeneidade e qualidade;
- b) sérias dificuldades em manter as condições asépticas, especialmente quando o processo é conduzido em grandes tanques - altas taxas de fluxo de ar, longo tempo de fermentação e excessivo número de operações no processo industrial são algumas das razões que justificam esse problema;

- c) falta de conhecimento da cinética do crescimento do rhizóbio (especialmente os recomendados no Brasil) impedindo a otimização da produção;
- d) falta de informação relativa ao veículo utilizado na produção do inoculante - falta de características da turfa (químicas, físicas e biológicas), sérias dificuldades em definir um adequado método para esterilização do veículo do que o tradicional raio gama e finalmente a falta de informação do crescimento e sobrevivência em turfa;
- e) métodos ineficientes e demorados (consumindo métodos de controle de qualidade) durante a produção do inoculante e de sua estocagem.

Muitos pesquisadores, como já foi salientado, preocuparam-se em estudar os diversos fatores que influem na cinética de crescimento de rhizóbio ou ainda caracterizá-los. BONOMI et alii (1987) estudaram níveis de aeração necessários para o crescimento de *Rhizobium japonicum*, indicando a importância deste fator nos custos operacionais além de incidir fortemente no risco de contaminação da cultura e também de influenciar o pH do meio ao longo do processo de crescimento. Além da escolha do meio adequado para o desenvolvimento de cada cepa em particular, BALATTI (1976) salienta a necessidade de estudo de outras variáveis como: quantidade e qualidade de inóculo, propriedades físico-químicas do meio e condições operativas.

Com o propósito de estudarem o efeito do fornecimento de oxigênio sobre a velocidade de crescimento de uma cepa de *Rhizobium japonicum*, LOPRETO et alii (1973b) realizaram ensaios para distintas condições de aeração (94,5 a 1580 ml de O₂/1.h), obtendo valores similares da velocidade de crescimento ($\mu = 0,067$ a $0,080 \text{ h}^{-1}$). Para valores inferiores a 31,2 ml de O₂/1.h foi notada uma marcante diminuição no crescimento. MAZZA & BALATTI (1984) estudaram a influência da quantidade de inóculo e do pH inicial, na obtenção de cultivos em meio líquido de *Rhizobium meliloti*, colocando que o melhor pH inicial é o de 6,5 que permitiu alcançar concentrações de até $2,5 \times 10^{10}$ células/ml em 36 horas de processo. ERTOLA et alii (1969) avaliaram o efeito da composição do meio e a taxa de fornecimento de O₂ para o crescimento deste microrganismo.

COZZI et alii (1985) estudaram o crescimento de várias cepas de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* em meios nutritivos líquidos, fixando parâmetros de produção que permitiram obter suspensões celulares aptas para a preparação de inoculantes de feijão. CRUZ et alii (1988) avaliaram o crescimento celular de variedades desse microrganismo e selecionaram aquela mais produtiva para ser utilizada em ensaios fermentativos com vista à produção industrial.

No momento em que se ressaltam dados sobre concentração celular, é bom lembrar que o método de transmitância (normalmente utilizado para esta medida) apesar de oferecer informações rápidas, não é concordante, neste caso, com a

multiplicação bacteriana (CRUZ et alii, 1988). A explicação fica por conta da elaboração de um polímero extracelular de natureza polissacarídea, pois tornam o meio viscoso e nem sempre homogêneo (MORT & BANER, 1980).

Em relação ao *Bradyrhizobium japonicum*, BONOMI et alii (1986) não observaram nenhuma vantagem com a utilização do controle automático do pH durante o processo fermentativo, havendo indicações de que, ao contrário, esse controle aumenta a inibição do crescimento.

Segundo LOPRETO et alii (1975), os rhizóbios não são exigentes quanto às características nutricionais do meio de produção, entretanto estes meios devem satisfazer todas suas necessidades, a fim de se obter altos rendimentos. Em função da necessidade de se desenvolver meios de cultura corretamente balanceados em seus diferentes componentes, inúmeros pesquisadores vêm estudando as melhores condições nutricionais para as diferentes cepas de rhizóbio. Para BALATTI (1976), o êxito de uma fermentação depende da interação microorganismo-meio.

Conforme DIAS et alii (1988), um meio de cultura deve ser fácil de ser preparado; deve ter o menor número possível de constituintes e deve-se evitar sempre que possível, a esterilização de componentes em separado ou por processos especiais; os constituintes devem estar disponíveis com relativa facilidade: devem ser evitados os produtos importados, os produtos sazonais, os que são monopólio de uma empresa ou os que historicamente apresentam grandes flutua-

ções de preços e/ou de oferta; e finalmente, na formulação de um meio de cultura deve ser considerada a economicidade do processo como um todo: nem sempre o meio de cultura tecnicamente correto e mais barato leva ao processo mais econômico, devido à influência na velocidade de reprodução celular e na produtividade, e nos custos de separação e/ou purificação (quando houver). LOPRETO et alii (1975) colocam, ainda, que é importante, em um processo fermentativo, se dispor de um meio de cultura onde possam desenvolver-se o maior número de cepas com altas concentrações celulares.

As fontes de carbono normalmente estudadas para a produção de rhizóbio são: glicerol, manitol, glicose, sacarose, galactose e lactose (LOPRETO et alii, 1972; LOPRETO et alii, 1973a, GARAT et alii, 1980 e BOIARDI & ERTOLA, 1985). De uma maneira geral o glicerol parece ser a fonte mais conveniente de carbono. LOPRETO et alii (1973a e 1973b) citam que com este nutriente foi possível obter cultivos que apresentam altas velocidades de crescimento e que também foi possível alcançar elevadas concentrações celulares. BONOMI et alii (1986) colocam que concentrações de glicerol de até 1,0 g/l não são limitantes para o crescimento da cepa C99 de *Rhizobium japonicum*. Estudando nove cepas de *Rhizobium japonicum*, LOPRETO et alii (1975) consideraram que oito destas cepas apresentaram um bom crescimento e tempos de geração entre 9,2 e 12,3 horas quando a fonte de carbono foi o glicerol.

GARAT et alii (1980) e LOPRETO et alii (1972), es-

tudaram, além das fontes de carbono, outros fatores de crescimento para o *Rhizobium japonicum* como fontes de nitrogênio (extrato de levedura, água de levedura de uso industrial e fosfato de amônio).

Nos últimos anos, diversos pesquisadores vêm se preocupando com os modelos de fermentadores e também com a maneira de condução do processo fermentativo para a produção de inoculantes. FANTI et alii (1976) realizaram ensaios em planta piloto, determinando bases para o desenvolvimento de um equipamento para produção comercial de inoculantes de alfafa e soja, tanto no que diz respeito às características do fermentador, como a dos dispositivos adequados para a preparação de água de levedura.

BALATTI (1981) e MAZZA et alii (1976) estudaram a obtenção de caldos com alta concentração celular para cepas de *Rhizobium japonicum* tanto em fermentadores com agitação mecânica quanto em fermentadores de coluna. Demonstraram que este último apresentou um bom comportamento em função do crescimento celular, atingindo concentrações superiores à 10^{10} células/ml em 40 horas de processo. Outra vantagem salientada para o fermentador de coluna foi a deste ser de simples desenho e de fácil construção e que também pode operar com vazões de ar relativamente baixas. Por outro lado, LOPRETO et alii (1973b) mencionam a necessidade da realização de controles mais rigorosos em qualquer um dos processos.

Normalmente, os caldos de rhizóbio utilizados na

preparação de inoculantes, são obtidos em sistemas batelada (BURTON, 1967). Este sistema permite, de certa forma, obter em cada operação, um certo volume de caldo com concentrações celulares fundamentalmente dependentes da composição do meio. De uma maneira geral, com o aumento da concentração dos componentes nutricionais, ocorrem modificações em alguns parâmetros físico-químicos como a atividade de água, forças iônicas, etc., que limitam conseqüentemente o crescimento microbiano (CHRISTIAN & WALTHO, 1962 e PIRT, 1975). Entre as distintas soluções propostas para superar as limitações do cultivo em batelada, BOIARDI et alii (1983) estudaram o comportamento do sistema de cultivo descontínuo alimentado, com a finalidade de obtenção de caldos de *Rhizobium phaseoli* com alta concentração celular. Além deste último sistema, BOIARDI (1985) sugere outros sistemas alternativos como o semicontínuo e o contínuo.

THOMPSON (1980) e FAO (1975) caracterizaram as melhores condições de operação de um fermentador para a produção de inoculantes, discutindo os tipos de equipamentos, a aeração, a temperatura de incubação, o nível de inóculo, o tempo de incubação, entre outros fatores.

2.1.1 Agitação e aeração

Considerando que a maior parte dos processos industriais, principalmente os de reprodução microbiana, necessitem de oxigênio; a agitação juntamente com a aeração tor-

nam-se parâmetros cruciais a serem estudados.

A literatura sobre agitação e aeração é bastante vasta. Entretanto, pode-se notar que a grande maioria destes trabalhos, como os de HIXSON (1944), COOPER et alii (1944), MACK & UHL (1947), RUSHTON et alii (1950a), RUSHTON et alii (1950b), FINN (1954), FLYNN & LILLY (1967), FINN (1967), BANDYOPADHYAY et alii (1967), AIBA et alii (1973), TOPIWALA & HAMER (1973), LINEK et alii (1973), BRYANT (1977), YAMADA et alii (1978), SINCLAIR (1984) e MAVITUNA & SINCLAIR (1985), preocupou-se em estudar determinados parâmetros tais como: coeficiente de transferência de oxigênio (K_{La}); potência de agitação; suprimento de oxigênio; movimento do fluido em função do tipo de agitador; transporte e transferência de massa; etc. Contudo, poucos dados são encontrados a respeito da influência da agitação e aeração sobre o crescimento microbiano. Muitas vezes estes dados, segundo BRUNELLO & CONCONE (1975), são bastante controversos.

A aeração e agitação dos fermentadores constituem uma das áreas mais complexas das fermentações industriais (THIEMANN, 1959). Apesar do problema, como pôde ser visto anteriormente, ter sido intensamente estudado sob os mais diversos pontos de vista e com diversas metodologias, não existe ainda uma técnica precisa, que permita fazer o escalonamento da aeração e agitação.

Sabe-se que o estado de agitação do meio em fermentação pode afetar profundamente a cinética do processo. En-

tre os muitos exemplos que poderiam ser apontados, BORZANI (1986) salienta a influência da frequência do agitador e da geometria do fermentador no andamento da fermentação.

Conforme BRUNELLO & CONCONE (1975), a agitação e aeração em um processo fermentativo têm por finalidade atingir uma série de objetivos:

- a) dispersão de um ou mais gases em um líquido, na forma de pequenas bolhas, para acelerar os processos de transporte de massa de uma fase à outra;
- b) suspensão de partículas sólidas (microrganismos, substratos insolúveis, etc.);
- c) dispersão de um líquido imiscível, de maneira que possa ser utilizado eficientemente pelo microrganismo;
- d) facilitar a troca de calor entre líquido em fermentação e o sistema de aquecimento ou resfriamento.

Além desses objetivos, THIEMANN (1959) ressalta que a agitação pode influenciar a aeração de vários modos:

- a) aumentando a área interfacial das bolhas (número maior de bolhas pequenas);
- b) retardar a passagem do ar pela massa do fermentador permitindo uma transferência mais eficiente de oxigênio;
- c) evitar a coalescência das bolhas, e portanto a tendência de formar bolhas maiores e reduzir

deste modo a área interfacial;

d) aumentar a turbulência do líquido;

e) aumentar a eficiência de bombeamento do líquido reduzindo o tempo de mistura.

Para garantir um perfeito desenvolvimento microbiano é fundamental que os nutrientes dissolvidos no meio de fermentação estejam em contato contínuo com os microrganismos. No processo de fermentação submersa o organismo se desenvolve não na superfície de um meio líquido ou substrato sólido, mas sim no interior do substrato líquido, recebendo o seu oxigênio necessário por injeção contínua de ar estéril e agitação forçada, garantindo uma boa transferência de massa e mantendo as células sempre em contato com o meio nutritivo homogêneo.

Ao microrganismo em desenvolvimento deve ser facilitado, segundo BRUNELLO & CONCONE (1975), o suprimento de oxigênio existente nas bolhas de ar. Experimentalmente, observa-se que quando se trabalha acima de uma determinada concentração de oxigênio dissolvido, a velocidade de respiração é independente desta e proporcional à concentração de células no meio (WINZLER, 1941).

THIEMANN (1959) salienta, que nem sempre é necessário ou desejável satisfazer totalmente as exigências respiratórias do microrganismo. Há casos em que isto é contraindicado:

a) na produção de vitamina B12 pelo *Pseudomonas denitrificans* é necessário reduzir a oxigenação do meio

afim de obter máxima síntese do metabólito;

- b) nas fermentações viscosas não newtonianas que ocorrem normalmente com microrganismos filamentosos (fungos e estreptomicetos) produtores de antibióticos, a alta viscosidade do meio fermentativo torna extremamente onerosas a agitação e aeração.

Em relação ao fornecimento de oxigênio aos microrganismos, FINN (1954) considera que, devido às dimensões reduzidas da célula microbiana, a resistência à difusão nas proximidades da célula seria muito pequena e que, além disso, seria pouco provável que a agitação pudesse acarretar uma velocidade relativa, suficientemente elevada entre células e meio, para alterar substancialmente aquela resistência. Não há evidências experimentais que permitam um exame seguro desta questão (KEMPE & WEST, 1959).

No decorrer de uma fermentação, as propriedades do meio alteram-se à medida que ela se processa, principalmente quando se tem agitação mecânica, esses fatos segundo AIBA et alii (1973) provocam a deformação das bolhas e a variação de seu diâmetro.

SIKYTA (1983) ressalta que apesar dos consideráveis avanços pertinentes à agitação e à aeração, muitas questões teóricas e práticas ainda necessitam de resposta. Salienta, também, a importância do uso simultâneo de ambos os parâmetros, pois estes afetam o nível de oxigênio, assegurando assim uma concentração suficiente desse elemento nas cul-

turas microbianas submersas. Outro ponto levantado por SI-KYTA (1983) é o problema encontrado nas determinações da taxa ótima de fluxo de ar e da frequência ótima do agitador, que, por conseguinte, afetam a avaliação da aeração e o projeto dos agitadores.

ERTOLA et alii (1969) pesquisaram a relação entre a composição do meio, a agitação e o efeito das taxas de suprimentos de oxigênio para o crescimento de *Rhizobium meliloti*. Observaram que, com o aumento da agitação, ocorreu um aumento na taxa de oxigênio absorvido, contudo a produtividade diminuiu quando foi utilizada uma agitação acima de 400 rpm. Explicou-se este fato em função da variação das características reológicas do meio, ou seja, ocorreu um aumento da viscosidade devido à formação de polissacarídeos extracelulares. BRUNELLO & CONCONE (1975) salientam que é de fundamental importância ter-se conhecimento das características reológicas dos líquidos de fermentação, pois intervêm nas trocas de massa e na potência necessária à agitação.

BALATTI (1979) reporta a existência de uma relação entre a composição do meio de cultivo e as condições operativas da fermentação. Trabalhando com *Rhizobium meliloti* e duas formulações (A e B), notou que no meio A ocorreu uma maior produção de células usando uma agitação de 250 rpm. O meio B, que possuía uma maior concentração de sacarose e de água de levedura, apresentou um rendimento maior em 400 rpm.

ERTOLA et alii (1969) relacionaram as curvas de crescimento experimentais (agitação de 250 à 1000 rpm e vazão de

ar entre 0,7 e 1 vvm) com a curva teórica proposta por ELSWORTH et alii (1957) que obedece à equação:

$$\log X = \log X_0 + (t/G).0,301$$

onde:

X = concentração bacteriana no tempo t;

X₀ = concentração bacteriana inicial;

G = tempo de geração.

As curvas experimentais foram bastante semelhantes às curvas teóricas. Isto significa neste caso, que a limitação do crescimento pelo oxigênio não é significativa. Por outro lado, DUDMAN (1964) menciona que para baixas condições de aeração, o rendimento celular é maior do que quando utiliza-se meios altamente aerados. BURTON (1967) reforça esta observação, salientando que apesar do rhizóbio ser um microrganismo obrigatoriamente aeróbio, pode-se obter um bom crescimento celular usando-se baixas tensões de oxigênio.

BONOMI et alii (1987) estudaram a influência da aeração no crescimento de *Rhizobium japonicum*, identificando a importância deste parâmetro na otimização de uma tecnologia de produção deste microrganismo. DATE (1976) salienta que as taxas de fluxo de ar, citadas na literatura, para produção de rhizóbio variam de 0,2 até 60 vvh (volume de ar por volume de meio por hora). Experiências recentes sugerem que 5 vvh são satisfatórios para a produção de rhizóbio.

Trabalhos realizados por VAN SCHREVEN (1958) e

ROUGHLEY (1970) mostram uma variação de $1,0 \times 10^8$ para $3,5 \times 10^9$ células de rhizóbio/ml, quando do aumento de 1 para 5 vvh. A FAO (1975) também sugere o uso de 5 vvh para a preparação de rhizóbio em alta escala.

Com o propósito de estudar o efeito do oxigênio fornecido a uma cultura de *Rhizobium japonicum* em fermentador, LO-PRETO et alii (1973a) efetuaram medidas de concentração celular para diferentes condições de agitação. Observaram que a curva de crescimento, obtida com 100 rpm, mostrou limitações, sendo essas atribuídas como conseqüências de uma baixa transferência de oxigênio decorrente da baixa agitação. Outro fator observado por esses autores foram que ao aumentar a velocidade de agitação, os cultivos tendem a alcalinizar-se mais rapidamente.

MAZZA et alii (1976) estudaram a obtenção de *Rhizobium japonicum* em um fermentador sem agitação mecânica. Todavia, compararam esse processo com ensaios realizados em fermentadores agitados mecanicamente, variando a agitação de 100 a 400 rpm e mantendo a aeração constante. Relacionaram as curvas de crescimento correspondentes a esses equipamentos, observando que os melhores resultados foram obtidos em tanques agitados mecanicamente. O melhor valor da velocidade específica máxima obtida foi de $0,08 \text{ h}^{-1}$ com uma agitação de 200 rpm.

BONOMI et alii (1986), também trabalhando com *Rhizobium japonicum*, obtiveram uma contagem de células viáveis de aproximadamente 2×10^{10} células/ml, utilizando um fermentador.

tador agitado a 300 rpm em 120 horas.

O principal agitador utilizado nos fermentadores experimentais e em alguns industriais é do tipo turbina (EBOLI, 1975). Segundo BRUNELLO & CONCONE (1975), as principais correntes produzidas por esse tipo de agitador são radiais e tangenciais. Portanto, necessitam de chicanas para evitar a formação de movimento circulatório horizontal e de vórtice. Geralmente, o ar é borbuhlado na parte inferior da turbina, e essa se encarrega de apanhar as bolhas grandes, quebrá-las e dispersá-las através do líquido. MCCABE & SMITH (1973) ressaltam que esses tipos de agitadores são efetivos em líquidos cuja viscosidade varie dentro de uma faixa bastante grande.

Um outro fator importante, salientado por BRUNELLO e CONCONE (1975), é que somente no caso de fermentadores que utilizam agitadores de turbina existem resultados quantitativos. Contudo esses dados só podem ser utilizados nos casos particulares em que foram obtidos. Não existem métodos satisfatórios que prevêm a agitação e/ou aeração para outras dimensões de fermentadores, a partir de dados obtidos em um determinado fermentador; mesmo que existam semelhanças geométricas.

2.1.2 Temperatura

Outro parâmetro importante nas operações fermentativas é a temperatura. Cada microrganismo tem um valor óti-

mo de temperatura, onde o desenvolvimento procede com a velocidade máxima. Contudo, nem sempre a temperatura ótima de desenvolvimento é a mesma que permite o máximo de acúmulo do produto metabólico desejado.

De acordo com a temperatura ótima de desenvolvimento, os microrganismos podem ser classificados em:

- a) psicófilos: ótimo entre 5 e 20°C;
- b) mesófilos: ótimo entre 20 e 40°C;
- c) termófilos: ótimo entre 40 e 55°C.

Segundo LEVEAU & BOUIX (1984), os microrganismos mesófilos preferem temperaturas intermediárias, próximas de 30°C. O crescimento da maior parte deles não ocorrerá abaixo de 15°C nem acima de 45°C. Outro fato salientado por esses autores é que a taxa de crescimento de todos microrganismos atinge seu valor máximo em uma zona relativamente estreita, próxima de temperatura ótima. Abaixo e acima desta temperatura, a taxa de crescimento diminui.

SIKYTA (1983) evidencia que a taxa de crescimento específica, depende do tipo de microrganismo e das condições físicas e químicas da cultura, como temperatura, pH, composição do meio, etc. A temperatura, segundo SINCLAIR (1984), está relacionada, entre outros fatores, com a mistura de gases nos sistemas fermentativos. TRIBOLI (1987) salienta que a escolha da temperatura de operação é influenciada por fatores fisiológicos das cepas utilizadas e também por problemas de perdas de voláteis (por evaporação) e pela formação de espuma em temperaturas elevadas.

Como pôde-se notar a temperatura influencia, além de outros fatores, no conjunto das atividades celulares microbianas. Em baixas temperaturas essas atividades podem ser totalmente bloqueadas. Entretanto, a partir de certa temperatura acima da ótima, alguns constituintes ou estruturas celulares podem sofrer alterações ou até desnaturação. Mesmo que a velocidade de crescimento continue elevada, a concentração celular não tende a atingir seu valor máximo, pois a destruição térmica é mais significativa que o crescimento celular (LEVEAU & BOUIX, 1984).

COSTILOW (1981), reforça os autores acima citados, ressaltando que a temperatura de incubação afeta drasticamente a taxa de crescimento das bactérias, pois influencia todas as reações celulares. Enfatizou, também, que a temperatura afeta os requisitos nutricionais, além do metabolismo e da estrutura bacteriana. A máxima temperatura para o crescimento microbiano é uns poucos graus (3 a 5°C) acima da temperatura ótima de crescimento. Em contraste, a mínima temperatura pode atingir 20 a 40°C abaixo da ótima.

Geralmente, as bactérias não somente crescem lentamente, mas também morrem rapidamente em temperaturas um pouco acima da máxima de crescimento. Conseqüentemente, a incubação de uma cultura bacteriana à temperaturas acima da ótima, necessita de um controle preciso de temperatura.

Segundo LEVENSPIEL (1974), para muitas reações, a expressão da velocidade pode ser escrita como o produto das funções temperatura e composição do meio. Para tais rea-

ções, a temperatura e a constante de velocidade (κ) da reação podem ser expressas, praticamente em todos os casos, pela lei de Arrhenius:

$$\kappa = \kappa_0 \cdot e^{-E/R.T}$$

onde κ_0 é chamado fator de frequência, e E a energia de ativação da reação. BORZANI (1975) caracteriza a influência da temperatura na constante de velocidade (κ) de crescimento de um microrganismo. Evidencia, também, que essa constante está relacionada com as reações enzimáticas. Logo, a uma dada temperatura, o efeito da decomposição da enzima começa a se fazer sentir, diminuindo o valor de κ quando a temperatura aumenta.

LEVENSPIEL (1974) avalia como o equilíbrio, a velocidade de reação e a distribuição de produtos são afetados por mudanças nas temperaturas e pressões de operação, permitindo com isso determinar o perfil de temperaturas ótimas: ao longo do tempo para reatores descontínuos, ao longo do comprimento para reatores contínuos, e de reator para reator em uma série de reatores.

Alguns autores ressaltam a importância dos equipamentos de medida e de fornecimento de calor aos fermentadores. A maior parte dos fermentadores comerciais e mesmo os de escala laboratorial são equipamentos com controle interno de temperatura, pois conforme DREW (1981) a temperatura da água de circulação (ou outro líquido) deve ser avaliada

por uma unidade de controle colocada no meio fermentativo. Por sua vez SIKYTA (1983) salienta a importância de se conhecer o tipo de equipamento usado para as medidas de temperatura, indicando os melhores, conforme o uso e como esses influenciam nos erros operacionais.

MONZONI (1975) evidencia que a manutenção de uma temperatura adequada é imprescindível nas fermentações industriais. Esse controle é normalmente automático e, em alguns casos, o instrumento é dimensionado para não permitir desvios maiores do que $0,5^{\circ}\text{C}$, pois algumas cepas industriais são extremamente sensíveis a variações de temperatura, podendo sofrer alterações em suas características.

A FAO (1975), em relação a produção de inoculante de rhizóbio, propõe que quando o fermentador utilizado não apresentar um controle termostático de temperatura deve-se incubar o caldo nutritivo em salas onde a temperatura seja controlada, ou ainda utilizar a aeração, conduzindo ar quente que pode ser aquecido eletronicamente.

A literatura sobre a influência da temperatura no desenvolvimento de rhizóbio é escassa e muitas vezes contraditória. Segundo VIERA (1986), o rhizóbio é uma bactéria quimiorganotrófica e cresce melhor em meios complexos entre 25 e 30°C , especialmente com extrato de levedura. BALATTI (1976) e JORDAN (1983), salientam respectivamente que essa faixa de temperatura é favorável para o desenvolvimento de rhizóbio em caldo nutritivo e especialmente para o gênero *Bradyrhizobium*.

Por sua vez, THOMPSON (1980) e BALATTI (1981) enfatizam que a melhor faixa de temperatura de incubação para o desenvolvimento de todas as espécies de rhizóbio com fins comerciais é usualmente entre 26 e 30°C.

Segundo DATE (1976) e VIDOR et alii (1983), a temperatura de incubação para rhizóbio não é crítica, e geralmente experiências sugerem a faixa de 26 até 28°C como conveniente para todas as cepas. Entretanto BURTON (1967) prefere 30 - 32°C como a melhor faixa de temperatura para o crescimento de rhizóbio. Posteriormente, esse autor (BURTON, 1979), indicou 28 - 30°C como sendo a faixa ótima de temperatura para o crescimento.

VINCENT (1974), salientando que os rhizóbios são organismos mesofílos, propõe que a faixa ótima de temperatura é de 20 a 30°C, lembrando que esses microrganismos não toleram temperaturas altas (a faixa máxima recomendada que permite o crescimento é de 30 a 42,5°C) perdendo rapidamente sua viabilidade a 40°C (tempo de redução decimal de duas a quatro horas de acordo com as espécies).

Estudando o efeito da temperatura em nove cepas de rhizóbio, ALLISON & MINOR (1940) citados por BURRIS & WILSON (1945), concluíram que a melhor faixa para esses organismos é entre 29 e 31°C, sendo que 28°C foi indicada como temperatura ideal para incubação. A FAO (1975), também propõe 28°C como ótima para todas as cepas de rhizóbio.

A variação na temperatura ótima de crescimento é mais significativa que a variação na temperatura ótima para

respiração; seis espécies de rhizóbio mostraram que a máxima transferência de oxigênio em glicose foi em $37,5 \pm 1^{\circ}\text{C}$ (BURRIS & WILSON, 1939 citados em BURRIS & WILSON, 1945).

O rhizóbio de crescimento rápido caracterizado culturalmente por KEYSER et alii (1985), apresentou um tempo de geração de 2,9 horas no meio extrato de levedura-manitol à uma temperatura de 28°C em comparação com rhizóbio de crescimento lento que possui um tempo de geração de 6 horas ou mais, nas mesmas condições. ROUGHLEY (1970) enfatiza que colônias de rhizóbio pertencentes ao grupo de crescimento rápido podem atingir uma concentração de 5×10^8 células viáveis por mililitro em 3 a 5 dias utilizando 28°C e o meio proposto por FRED et alii (1932). Em relação aos organismos de crescimento lento, é possível obter-se até 10^9 células/ml em 3 a 5 dias usando-se um meio a base de sacrose-extrato de levedura e incubando-os a 28°C (DATE, 1959 citado por ROUGHLEY, 1970).

Alguns autores excetua o *Rhizobium meliloti* das faixas de temperatura citadas anteriormente. ALLISON & MINOR (1940), BURTON (1979) e BURTON (1967) indicam 35°C como sendo a temperatura ótima para o desenvolvimento desse microrganismo. GRAHAM & PARKER (1964) concluíram que 39°C é ideal para distinguir o *Rhizobium meliloti* de outras espécies de crescimento rápido. Entretanto, MAZZA & BALATTI (1984) e ERTOLA et alii (1969), trabalhando com esse microrganismo utilizaram respectivamente 28°C e 30°C como temperaturas de operação em seus experimentos.

A maioria dos trabalhos relacionados com a produção de rhizóbio, utiliza a temperatura operacional de 30°C. MAZZA et alii (1976), estudando o comportamento de *Rhizobium japonicum* em fermentadores sem agitação mecânica, utilizaram essa temperatura tanto para a preparação dos inóculos como para as operações fermentativas. LOPRETO et alii (1973a), também trabalharam com essa temperatura para estudar a influência do fornecimento do oxigênio na velocidade de crescimento de *Rhizobium japonicum*, produzindo os inóculos em frascos agitados.

BOIARDI et alii (1983) obtiveram, a partir de um inóculo com $1,5 \times 10^8$ células/ml, concentrações de até $1,2 \times 10^{10}$ células/ml de *Rhizobium phaseoli* em frascos agitados a uma temperatura de 30°C. Trabalhando nas mesmas condições, CRUZ et alii (1986) alcançaram $1,0 \times 10^9$ células/ml desses microrganismo em 15 horas de processo, e LOPRETO et alii (1971) chegaram a uma concentração de $1,8 \times 10^{10}$ células de *Rhizobium japonicum* por mililitro após 140 horas.

LOPRETO et alii (1973b) e LOPRETO et alii (1975), trabalhando em frascos agitados, e BALATTI & MAZZA (1979) em fermentador de bancada, estudaram a produção de cultivos celulares de *Rhizobium japonicum* para impregnação em turfa, utilizando 30°C como temperatura de operação. GARAT et alii (1980) estudaram a melhor fonte de nitrogênio para cepas de rhizóbio, mantendo essa temperatura em um quarto termostaticado onde foram conduzidos todos os experimentos.

GEBHARDT et alii (1984) avaliaram o crescimento de

cepas de *Rhizobium* sp. em fermentador contínuo, operando a 30°C. BOIARDI & ERTOLA (1985), comparando o comportamento de diversas estirpes de rhizóbio em fermentação contínua e em batelada, obtiveram concentrações de até $1,1 \times 10^{10}$ células/ml para o *Rhizobium japonicum* usando 300 rpm; 0,3 vvm e 30°C como parâmetros operativos; e BONOMI (1986) utilizou essa mesma temperatura, trabalhando também com frascos agitados.

COZZI et alii (1985) e COZZI & BENINTENDE (1987) estudaram, respectivamente, o crescimento de cepas de *Rhizobium phaseoli* em meio líquido e a sobrevivência de *Bradyrhizobium japonicum* em turfa não estéril, utilizando a temperatura de 29°C para produção desses organismos. GONZÁLEZ (1984), entretanto, trabalhou com frascos agitados a uma temperatura de 28°C, determinando a resistência de estirpes de *Rhizobium japonicum* a antibióticos, fungicidas e herbicidas. Mostrando assim, outras temperaturas de operação que foram utilizados com sucesso.

2.2 Competitividade entre estirpes de rhizóbio

A especificidade hospedeira de uma estirpe de rhizóbio é representada pela habilidade desta estirpe em induzir a nodulação e/ou fixar o nitrogênio quando ocorrer uma associação com cultivares ou espécies hospedeiras. Um exemplo disto, são as cultivares de soja que apresentam uma especificidade considerável em relação às estirpes de *Bradyrhi-*

zobium japonicum mesmo antes de iniciarem o processo de fixação simbiótica do nitrogênio. A especificidade pode manifestar-se durante o processo de infecção, de formação de nódulos e também durante o estabelecimento da fixação do nitrogênio (DATE, 1976).

Nem todas as cultivares de soja nodulam eficientemente com a mesma estirpe de *Bradyrhizobium japonicum*. Em função disto, vários pesquisadores ressaltam que a eficiência e a ineficiência na fixação do nitrogênio não são relevantes se não for levado em consideração a especificidade hospedeira existente entre as estirpes de rhizóbio e as espécies e/ou cultivares da leguminosa hospedeira (DOBEREINER et alii, 1966; FREIRE & VIDOR, 1970; VINCENT, 1974 e VIDOR, 1977).

Muitos pesquisadores têm estudado as possíveis causas que explicariam a maior ou menor eficiência na fixação simbiótica do nitrogênio. DOBEREINER et alii (1970) evidenciaram a existência de estirpes de *Rhizobium japonicum* de alta eficiência as quais formaram nódulos com taxas de fixação superiores à das estirpes normais, entretanto, não justificaram a causa dessa eficiência. HAVELKA & HARDY (1976) explicaram que os diferentes graus de eficiência simbiótica estariam relacionados com as diferentes capacidades apresentadas pelas estirpes em utilizarem a energia proveniente de produtos da fotossíntese por miligrama de nitrogênio fixado, resultando em diferentes taxas de nitrogênio fixado por unidade de massa nodular.

Para FREIRE & VIDOR (1971), o sucesso da simbiose rhizóbio-leguminosa depende de uma boa nodulação, e esta é influenciada por fatores ligados à planta, à bactéria e à interação destes. Segundo VINCENT & WATERS (1953), a seleção preferencial da leguminosa por determinadas estirpes e/ou a indução desta seleção pela bactéria, nem sempre é direcionada para a estirpe mais efetiva.

Em relação aos grupos de efetividade, a FAO (1984) cita que estes reúnem diferentes espécies pertencentes a um mesmo gênero que conseqüentemente apresentam resposta positiva à infecção e à fixação de nitrogênio atmosférico por uma mesma estirpe de rhizóbio.

Uma importante característica das estirpes de rhizóbio é a de competir entre si por sítios de infecção nodular, sendo que diferenças significativas, como citado anteriormente, foram demonstradas por DATE (1976).

TRINICK (1982) ressalta que esta competição envolve características da planta hospedeira e do rhizóbio, tais como, a influência da planta no processo de infecção, o número de estirpes do inoculante que vão competir na superfície da raiz, o estágio fisiológico do rhizóbio no momento da inoculação, a taxa de crescimento das estirpes que estão competindo pelo sítio, a temperatura, a umidade e os níveis dos nutrientes no solo.

Conforme inúmeros autores, a competição por sítios de nodulação pode ser modificada pela influência das cultivares, das estirpes e das linhagens da leguminosa que será

infectada (OLIVEIRA & VIDOR, 1984; ROUGHLEY et alii, 1980; RUSSEL & JONES, 1975 e BROMFIELD & JONES, 1980).

Segundo os trabalhos de DATE (1976), VIDOR et alii (1986) e VIDOR (1977), a competitividade poderá ser afetada pela presença de uma população de rhizóbio naturalizada no solo inoculado. Assim, IRELAND & VINCENT (1968) mostraram que as plantas somente formaram nódulos com estirpes introduzidas quando a concentração do inoculante foi significativamente aumentada. Outros autores, como CALDWELL & VEST (1970); HAM et alii (1971); VEST (1973); BROMFIELD & JONES (1980); VOSS (1981); McLAUGHLIN & DUNICAN (1981) e DIONISIO (1985) confirmam a superioridade das estirpes naturalizadas em relação às estirpes introduzidas no solo.

Entretanto, BROCKWELL et alii (1982) encontraram resultados contraditórios, ou seja, as estirpes de *Rhizobium trifolli* introduzidas no solo predominaram sobre as estirpes nativas na formação dos nódulos. McLAUGHLIN & DUNIGAN (1981) estabelecem como causa desta contradição as diferenças entre os tipos de solo, entre os tipos de rhizóbio e as concentrações de células no inóculo.

Vários trabalhos atribuem à lectina a responsabilidade pelo mecanismo de especificidade entre a planta e o *Rhizobium* (MARX, 1977), caso não haja diferenças entre as estirpes quanto à infectividade, migração e crescimento da rizosfera (OLIVEIRA, 1982).

Inoculantes para soja elaborados com estirpes eficientes de *R. japonicum*, quando utilizados em concentrações

normalmente recomendadas (6000 a 7000 células/semente) em solos contendo alta população de rhizóbio, demonstraram pouco sucesso destas estirpes em competirem efetivamente na formação de nódulos com as estirpes naturalizadas (JOHNSON et alii, 1965; WEAVER & FREDERICK, 1974; DATE, 1976 e VIDOR, 1977). VOSS (1981), avaliando a capacidade competitiva por sítios de infecção nodular de três estirpes de *Rhizobium phaseoli* em solos com população estabelecida deste microrganismo, constatou que as estirpes nativas foram mais competitivas que as estirpes introduzidas.

JOHNSON & MEANS (1964) avaliaram a habilidade nodulífera de 299 estirpes de *R. japonicum* em soja cultivada em casa-de-vegetação. Foi constatado que apenas 13 estirpes foram mais competitivas por sítios de infecção nodular do que a estirpe USDA 76. Estudando a competitividade por sítios de infecção nodular das estirpes 38, 76 e 110 de *R. japonicum*, CALDWELL (1969) observou que a estirpe 110 ocorreu em 98% dos nódulos quando utilizada em mistura com a estirpe 38 e 76% quando misturada com a estirpe 76. VIDOR (1977) também notou a dominância da estirpe 110 quando utilizada em mistura com as estirpes 123, 532c e 586, verificando que a competitividade por sítios de infecção nodular no campo e em câmara de crescimento foi bastante semelhante. VIDOR et alii (1978) evidenciaram a grande importância da competitividade por sítios de infecção nodular, estudando a habilidade nodulífera de seis estirpes de *R. japonicum* em nove cultivares de soja. Constataram que a estirpe 29w

ocorreu em mais de 98% dos nódulos em sete das cultivares, sendo que nas outras duas cultivares ela ocorreu em menos de 92% dos nódulos.

Estudando o efeito de doses e métodos de aplicação de inoculantes turfosos, JOHNSON et alii (1965) utilizando estirpes de *R. japonicum* observaram que a percentagem de nódulos induzidos por todas as estirpes no nível padrão (5 g/kg de semente) foi em média 5%. Aumentando 25 vezes o nível padrão, a recuperação das estirpes nos nódulos foi de aproximadamente 5 vezes superior ao nível padrão. Avaliando a importância da relação entre a concentração de células no inoculante e a competição por sítios de infecção nodular entre estirpes de *R. japonicum*, PERES & VIDOR (1980) observaram que a utilização das estirpes na mesma concentração (1:1), a percentagem de recuperação das estirpes nos nódulos foi semelhante. Entretanto, a percentagem de nódulos induzidos pelas duas estirpes esteve em torno de 80 e 20 quando a concentração de uma foi 10 vezes superior à da outra. A percentagem da ocorrência foi superior a 90 de uma estirpe sobre a outra, quando a concentração entre as estirpes foi igual ou superior a 100 vezes. Em função destes resultados, os autores verificaram que a competição por sítios de infecção nodular pode ser modificada quando se utilizam diferentes relações de concentração entre estirpes de alta competitividade. Segundo SKRDLETA & KARIMOVA (1969) e PEREIRA (1983), nem sempre a ocorrência das estirpes nos nódulos está relacionada com suas concentrações no inoculante; as estirpes

mais competitivas tendem a dominar mesmo quando utilizadas em concentrações mais baixas do que as de menor competição. ELLIS et alii (1984) observaram que altas taxas da estirpe USDA 110 no inoculante, não alterou significativamente a sua distribuição nos nódulos de soja, por um período de 2 anos.

ROBINSON (1969), MARQUES PINTO et alii (1974), LABANDERA & VINCENT (1975), RUSSEL & JONES (1975) e Mc LAUGHLIN & DUNICAN (1981) compararam a competitividade de estirpes efetivas e inefetivas de *R. trifolli*, observando que as efetivas são mais competitivas do que as inefetivas.

MEANS et alii (1961) demonstraram que uma estirpe eficiente e competitiva, apresentando uma população de apenas 1,1% no inoculante em mistura com outras estirpes, ocorreu em 85% dos nódulos. Isto mostra que não só a concentração celular de rhizóbio no inoculante é responsável por diferenças na competitividade por sítios de infecção nodular, existindo outros fatores envolvidos neste processo. PEREIRA (1983) coloca que a variação da capacidade competitiva entre as estirpes por sítios de nódulos é também dependente de boas condições fisiológicas apresentadas pela leguminosa hospedeira e da influência dos fatores adversos do solo.

Bacteriófagos podem induzir flutuações na população do rhizóbio, tendo como consequência a redução na formação dos nódulos pela estirpe introduzida no solo. Segundo BRUCH & ALLEN (1975) e BARNET (1980), existem indicações de que as estirpes apresentam sensibilidade diferencial em

relação a estes parasitas.

O envolvimento do hospedeiro na competitividade por sítios de nódulos tem sido ressaltado por vários pesquisadores (KOSSLACK et alii, 1983; TRINICK, 1982; VIDOR et alii, 1986 e MOROTE, 1989). A exposição prévia de plântulas com a estirpe influencia a competição. Em função disto, KOSSLACK & BOHLOOL (1985) verificaram que a estirpe USDA 110 aumentou a percentagem de ocupação de nódulos de 2 para 55% e da USDA 123 de 7 para 33% em solos que já apresentavam outras estirpes, após 72 horas de exposição a estas duas estirpes.

O fenômeno da dupla infecção nos nódulos por estirpes de rhizóbio, em geral, não apresenta alta ocorrência em condições normais. Entretanto, é citada por ELLIS et alii (1984) em *R. japonicum*, LABANDERA & VINCENT (1975) e por MARQUES PINTO et alii (1974) em *R. trifolii*. Em nódulos de feijão, LOVATO (1984) sugere que as altas concentrações de células foram responsáveis pela ocorrência de infecções duplas.

FREIRE et alii (1983) ressaltam que na recomendação de estirpes de rhizóbio para a produção de inoculantes formados por duas ou mais estirpes, ou quando o solo já possui uma população estabelecida, deve-se considerar além da efetividade a capacidade da estirpe de competir na formação de nódulos bem como colonizar e sobreviver no solo.

2.3 Comportamento e sobrevivência de rhizóbio em turfa

A utilização de um suporte adequado é fundamental na preparação de um inoculante de alta qualidade. Conforme VINCENT (1970), ROUGHLEY (1976) e SICARDI (1984) para o inoculante ser produzido em grande escala, três pontos devem ser bem definidos: a seleção da estirpe de rhizóbio; o crescimento desta em meio líquido e a impregnação da cultura no suporte previamente selecionado e tratado.

A maioria dos inoculantes para leguminosas é composto de um cultivo rhizobiano impregnado em um suporte pulverulento que atua como suporte do mesmo. A turfa é atualmente o suporte mais utilizado na elaboração deste tipo de produtos, devido a suas amplas vantagens em relação aos demais suportes (LOPRETO et alii, 1975; KOLLING et alii, 1984; STRIJDOM & DESCHODT, 1976; SPARROW & HAM, 1983; DATE, 1970; DATE, 1969; FREIRE, 1967; PACZKOWSKY & BERRYHILL, 1979 e SAITO et alii, 1985). Entretanto, ARAUJO (1985) e ROUGHLEY & VINCENT (1967) salientam a baixa qualidade de depósitos, dificultando assim a seleção da fonte de turfa a ser usada na produção dos inoculantes.

Em relação às características que um bom suporte deve apresentar, alguns autores citam: abundância, baixo custo, favorecimento da sobrevivência do microrganismo durante o armazenamento e distribuição do inoculante, servir como meio nutritivo e não apresentar elementos que possam

inibir o crescimento (DATE & ROUGHLEY, 1977; BURTON, 1981; URIO & CHOWDHURY, 1981; SICARDI, 1984 e EL-HADDAD, 1985).

Entre os fatores que afetam a sobrevivência do rhi-zóbio, a mais drástica é a temperatura (ROUGHLEY, 1968; VAN SCHREVEN, 1970; SOMASEGARAN et alii, 1984; KREMER et alii, 1982; KREMER & PETERSON, 1983; SIMS et alii, 1984 e URIO & CHOWDHURY, 1981). Além da temperatura, SAITO et alii (1985) citam o conteúdo de umidade e a presença de organismos competitivos.

Numerosos trabalhos demonstram e recomendam o emprego de suportes estéreis na preparação do inoculante, sendo que estes asseguram uma maior concentração celular em função do tempo de armazenamento (HEDLIN & NEWTON, 1948; VAN SCHREVEN, 1970; ROUGHLEY, 1970; ROUGHLEY & VINCENT, 1967 e VINCENT, 1970). ROUGHLEY & VINCENT (1967) ressaltam que existem poucos dados bibliográficos sobre ensaios realizados com inoculantes elaborados a partir de turfas não estéreis.

Após a coleta da turfa, esta deve ser drenada e seca. ROUGHLEY (1970) sugere que este processo ocorra ao ambiente enquanto que DATE & ROUGHLEY (1977) sugerem um fluxo de ar forçado. Posterior a esta etapa, a turfa deve conter entre 5 e 10% de umidade, sendo moída e peneirada em malha de 100 a 200 mesh, facilitando assim a aderência desta às sementes, no momento da inoculação (WEAVER, 1985 e VIDOR et alii, 1983). Segundo MATERSON & WEAVER (1985), se o suporte não for esterilizado, deve então sofrer uma matu-

ração de 5 a 10 dias, após a impregnação. O período da maturação varia de acordo com as características de cada estirpe, como por exemplo, o tempo de geração (VIDOR et alii, 1983).

Em relação ao armazenamento, LOCHEAD & THEXTON (1947) comprovam que a melhor temperatura para a preservação das células foi a de 4°C. NEWBOULD (1951), FREIRE & JONES (1963) e GUNNING (1954) indicaram 5°C como sendo superior à temperatura ambiente para o armazenamento do inoculante. Segundo FREIRE & JONES (1963) o inoculante conservado sob refrigeração apresenta, após nove meses, um número suficiente de células para uma inoculação efetiva.

Muitos pesquisadores têm se preocupado em estabelecer a conveniência do uso da esterilização prévia da turfa. Existem vários métodos de esterilização, entre eles a aplicação de óxido de etileno ou brometo de metila (DESCHODT & STRIJDOM, 1974), radiação gama (ROUGHLEY & VINCENT, 1967) e autoclavagem.

A capacidade de absorção de água do suporte afeta diretamente o conteúdo de umidade do inoculante. Conforme BURTON (1967), uma umidade relativa de 35-40% no inoculante seria adequada para a sobrevivência do rhizóbio. ROUGHLEY (1970), por sua vez, recomenda 45-50% indicando a existência de uma relação entre a perda de umidade do inoculante e a morte do rhizóbio.

A qualidade dos inoculantes refere-se basicamente ao número de células de rhizóbio específico e efetivo no

suporte (ROUGHLEY, 1985). Quando se trabalha com turfa esterilizada, WILLIAMS (1984) recomenda que o controle seja feito através de contagens do número de células ou colônias em placa com meio agarizado.

Atualmente os inoculantes comerciais utilizam, segundo BURTON (1981), DATE (1969), PACZKOWSKY & BERRYHILL (1979) e ROUGHLEY (1976), turfa finamente moída e impregnada com culturas de *Rhizobium*, com elevada concentração celular ($5,0 \times 10^8$).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos nos Laboratórios de Biotecnologia da Fundação de Ciência e Tecnologia do Estado do Rio Grande do Sul (CIENTEC) e nos Laboratórios de Microbiologia do Solo da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Foram estudadas as estirpes SEMIA 587 (isolamento 6/67-RS) e SEMIA 5019 (29w, EMBRAPA/CNPBS, Seropédica, km 47-RJ) de *Bradyrhizobium japonicum* pertencentes à coleção de culturas do Instituto de Pesquisa Agronômica (IPAGRO), Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado do Rio Grande do Sul.

3.1 Avaliação da influência da agitação no desenvolvimento da estirpe SEMIA 587 em caldo nutritivo

Os ensaios fermentativos foram conduzidos, com a estirpe SEMIA 587, em um fermentador New Brunswick modelo MF-102, de 5 litros com agitação mecânica, cedido pelo Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA) da UFRGS (Apêndice 6).

Estudou-se o crescimento microbiano com 2,5 litros de volume útil nas velocidades de agitação de 100, 150, 200,

230, 250, 270, 300, e 500 rpm (rotações por minuto). Utilizou-se o meio de cultivo recomendado por MAZZA et alii (1976), cuja formulação está descrita no Apêndice 1. O pH do meio foi ajustado em 7,2 com hidróxido de sódio e/ou ácido clorídrico 1,0 N. Após o ajuste do pH, o meio foi colocado no vaso de fermentação e esterilizado em autoclave vertical à 121°C e 1 atm de pressão por 45 minutos.

Em todos os ensaios a temperatura e a aeração foram mantidas constantes em $28 \pm 1^\circ\text{C}$ e 0,5 vvm (volume de ar por volume de meio por minuto), respectivamente.

A concentração celular do inóculo também foi mantida constante. Preparou-se o inóculo, inoculando-se com alga de platina em frascos erlenmeyers de 500 ml com 100 ml do mesmo meio utilizado no fermentador (BALATTI, 1981). Os frascos foram colocados em agitador climatizado a 30°C, 230 rpm e 2,5 cm de excentricidade (LOPRETO et alii, 1973) por 96 horas. Aliquotas de 25 ml foram colocadas em tubos de cultura, o que corresponde a 1% do volume útil do fermentador (THOMPSON, 1980). Os tubos foram armazenados em freezer a -18°C até o momento de serem usados. Em cada ensaio utilizaram-se dois tubos, um como inóculo e o outro como referência da concentração celular.

Para cada velocidade de agitação estudada, foram realizadas quatro repetições. Em espaços de tempo de 0, 6, 12, 24, 36, 60, 72, 84, 108 e 120 horas, retiraram-se amostras para a determinação da concentração celular e do pH. O pH foi determinado em pHmetro digital, e a concentração ce-

lular foi avaliada através da contagem de células viáveis em placas de Petri pelo método de diluições sucessivas, empregando-se solução fisiológica como diluente (Apêndice 2). Alíquotas de 0,1 ml das diluições 10^{-1} até 10^{-10} foram plaqueadas, em triplicata, no mesmo meio utilizado no fermentador (Apêndice 1), sendo as placas incubadas a 28°C por 8 dias (MILIAN, 1984 e LANARA, 1981).

Obteve-se as curvas de crescimento e a partir destas determinou-se, para cada velocidade de agitação, o tempo de geração do microrganismo, aplicando-se a equação utilizada por MURDOCK e HATCHER (1975), cuja expressão é:

$$G = \frac{\log 2 \cdot (t_1 - t)}{\log N_1 - \log N}$$

onde:

G = tempo de geração em horas;

N_1 = número de células no tempo t_1 ; e

N = número de células no tempo t.

Para o cálculo do tempo de geração considerou-se somente a fase de crescimento logarítmica ou exponencial, devido ao fato de que nesta fase a população microbiana duplicou-se a intervalos constantes de tempo (MOAT, 1979).

A duração da fase de crescimento exponencial foi determinada utilizando-se o coeficiente de correlação linear como critério para defini-la (BONOMI et alii, 1986). Este valor foi obtido substituindo os dados até a obtenção da melhor correlação, em grupos iguais ou superiores a três pontos. A taxa de crescimento da fase exponencial e a velo-

cidade específica de crescimento máximo foram obtidas através do programa proposto por LEDUY & ZAJIC (1973). O erro experimental que afeta os valores das velocidades específicas de crescimento e da concentração celular foi calculado pelas equações apresentadas por BORZANI (1980) e descritas no Apêndice 3.

Outro parâmetro determinado para cada agitação foi a produtividade máxima (LEVEAU & BOUIX, 1984), calculada pela equação:

$$P_m = \frac{N_m - N_o}{t_m}$$

onde:

- P_m = produtividade máxima;
- N_m = número máximo de células;
- N_o = número inicial de células; e
- t_m = tempo necessários para obter-se N_m.

3.2 Avaliação da influência da temperatura no desenvolvimento da estirpe SEMIA 587 em caldo nutritivo

Os experimentos fermentativos foram conduzidos conforme descritos no item anterior, também utilizando-se a estirpe SEMIA 587, realizando-se quatro repetições para cada ensaio. A aeração foi mantida constante em 0,5 vvm, a agitação em 230 rpm e variou-se a temperatura em 22, 26, 28, 30,

34 e 38°C. Igualmente a concentração celular do inóculo foi mantida constante. Sua preparação obedeceu aos mesmos critérios estabelecidos no item 3.1.

Tanto nesta etapa quanto na etapa anterior (influência da agitação), além da determinação do pH e da concentração celular nos tempos de 0, 6, 12, 36, 60, 72, 84, 108, e 120 horas, foram realizados testes de pureza nas respectivas amostras. Utilizaram-se os testes de coloração Gram (Apêndice 4) e o de ausência de crescimento de contaminantes em Agar-Glicose-Peptona (Apêndice 5), conforme descritos por MILIAN (1984).

Conhecendo-se as curvas de crescimento para as temperaturas estudadas determinou-se, em função de cada uma delas, o tempo de geração, a duração da fase de crescimento exponencial, a velocidade específica de crescimento máxima, a taxa de crescimento na fase exponencial e produtividade máxima.

3.3 Estudo da competição das estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 em caldo nutritivo

Antes da realização dos ensaios sobre a competição entre as estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019, foi necessário o estudo de cada uma dessas cepas isoladamente. Foram efetuados quatro repetições em todos os experimentos desta etapa.

Os ensaios fermentativos foram realizados da mesma forma que nas etapas anteriores. A aeração foi mantida

constante em 0,5 vvm, a temperatura em $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e a agitação em 230 rpm.

A concentração celular dos inóculos também foi mantida constante em todos os ensaios. Sua preparação seguiu o mesmo procedimento citado no item 3.1. com o objetivo de comparação entre os tratamentos, os inóculos foram equalizados medindo-se a densidade ótica a 600 nm (ERTOLA et alii, 1965).

Nos ensaios de competição, o inóculo utilizado foi obtido misturando-se, na proporção de 1:1 os inóculos das duas cepas produzidas isoladamente. Com isto, a concentração celular inicial em todos os ensaios foi mantida aproximadamente constante.

Foram retiradas amostras em intervalos de 0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas, determinando-se o número de células viáveis e o pH. Além destas determinações, realizaram-se as medidas de consumo de substrato (glicerol), segundo o método elaborado pelo IPT/DQEQ (1982) e descrito no Apêndice 7. Foram elaboradas as curvas de crescimento para as cepas cultivadas isoladamente e também quando crescidas em conjunto.

Conforme a metodologia descrita no item 3.1, determinaram-se: o tempo de duração e a taxa de crescimento da fase exponencial, a produtividade máxima e a velocidade específica de crescimento máxima. Nessa etapa calculou-se também a conversão do substrato em produção celular, segundo a equação a seguir (BONOMI et alii, 1986):

$$Y = \frac{X_f - X_o}{S_o - S_f}$$

onde:

Y = taxa de conversão do substrato em células;

Xf = concentração de células no tempo tf;

Xo = concentração de células no tempo to;

So = concentração de substrato no tempo to; e

Sf = concentração de substrato no tempo tf.

Utilizou-se a análise sorológica como método de determinação da proporção de cada uma das cepas nas amostras estudadas, através da técnica de aglutinação, tipificando-se as colônias obtidas. Essas colônias foram repicadas para tubos contendo o meio descrito no Apêndice 1, acrescido de 3 ml de uma solução alcoólica a 1,6% de púrpura de bromocresol por litro de meio. O corante foi utilizado com o objetivo de identificar alguns possíveis contaminantes (MILIAN, 1984).

Para a realização das análises sorológicas, empregou-se à metodologia comumente usada pela Seção de Microbiologia do Solo do IPAGRO e descrita por VINCENT (1975). Os antissoros para a identificação das estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 foram fornecidos, também, pelo IPAGRO com títulos de 1:400 e 1:800, respectivamente.

3.4 Avaliação da capacidade competitiva das estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 por sítios de nodulação em areia e solução nutritiva em soja

As estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019, foram testadas quanto à capacidade competitiva, em casa de vegetação, empregando-se soja da cultivar Bragg. Utilizaram-se vasos de Leonard contendo areia e carvão na proporção de 3:1, para neutralizar a toxidez de manganês da areia. Os vasos foram esterilizados em autoclave horizontal a 121°C e 1,5 atm de pressão por duas horas. Esse procedimento é o normalmente utilizado pelo Setor de Microbiologia do Solo do Departamento de Solos - UFRGS.

Semearam-se cinco sementes pré-germinadas de soja por vaso, previamente desinfestadas em álcool etílico 95°GL durante 4 minutos e por 2 minutos em uma solução aquosa (acidificada) a 0,1% de cloreto de mercúrio ($HgCl_2$) efetuando-se sete lavagens posteriores com água destilada esterilizada, durante 8 horas, e após em papel toalha para germinação (ANDRADE, 1986).

Quinze dias após o transplante das plântulas, fez-se o desbaste para duas plantas por vaso. Em todos os vasos, adicionou-se solução nutritiva completa, sem nitrogênio, de SPECHT et alii (1956), descrita no Apêndice 8. Periodicamente a solução foi repostada, alternando-se com água esterilizada.

O delineamento experimental foi em blocos completos

casualizados com 5 repetições. Os seis tratamentos utilizados foram representados pelas duas estirpes citadas anteriormente, inoculadas individualmente e em mistura (TF1, TP1, TP2 e TP3), acrescentando-se dois tratamentos sem inoculação como testemunhas; um sem e outro com nitrogênio mineral. O nitrogênio foi aplicado sob a forma de uma solução a 2% de nitrato de amônio (NH_4NO_3), e posteriormente mais 700 mg distribuído em intervalos de três a quatro dias durante o período experimental (DIONISIO, 1985).

O tratamento TF1 foi obtido do cultivo em conjunto realizado na etapa anterior após 120 horas de processo fermentativo. As demais misturas utilizadas como inóculos foram compostas a partir da mescla das culturas isoladas, produzidas em frascos erlenmeyer e agitador climatizado. Os tratamentos TP1, TP2 e TP3 foram elaborados, respectivamente, com: a mesma proporção de TF1, a proporção de 1:1 e a proporção inversa de TF1. A relação percentual de cada uma das estirpes, nestes tratamentos, encontra-se no Apêndice 9.

A concentração celular dos inóculos foi equalizada por turbidimetria, usando-se como parâmetro de referência o inóculo do tratamento TF1. A inoculação dos vasos foi realizada um dia após o plantio, com 2 ml de inóculo por vaso.

As plantas foram colhidas 85 dias após o plantio, para avaliação do número de nódulos, peso seco da parte aérea e dos nódulos, nitrogênio total da parte aérea e ocorrência dos sorogrupos.

A determinação do peso da matéria seca da parte aérea e dos nódulos foi realizada após secagem em estufa a 65°C por 72 horas. O nitrogênio total da parte aérea foi avaliado pelo método do semi-micro-Kjeldahl-modificado (TEDESCO et alii, 1985). A avaliação da ocorrência dos sorogrupos foi realizada através da técnica de aglutinação, tipificando-se 60 nódulos em média para cada tratamento. Os nódulos foram macerados em tubos contendo volume variável de solução fisiológica (Apêndice 2) em função do seu tamanho. Essas suspensões sofreram o mesmo tratamento que as suspensões produzidas com as colônias no item 3.3.

3.5 Avaliação da competição e sobrevivência das estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 em turfa esterilizada

Foram avaliados quatro tratamentos, representados pelas estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019, inoculadas individualmente, pela mistura dessas estirpes na proporção de 1:1 e pela mistura obtida na fermentação em conjunto (tratamento TF1).

A preparação e o ajuste da concentração celular desses inóculos foi realizada conforme a técnica apresentada no item 3.3.

Utilizou-se como veículo para a produção do inoculante, turfa coletada na localidade de Boa Vista, Município de Viamão, Rio Grande do Sul (Brasil). Esta turfa foi colo-

cada em casa de vegetação, onde sofreu um processo de secagem à temperatura ambiente por três semanas, conforme recomendado por ROUGHLEY & VINCENT (1967), posteriormente foi moída em um moinho de martelos pertencente a Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado do Rio Grande do Sul. Nos Apêndices 10 e 11 estão contidos, respectivamente, informações sobre a granulometria e a composição de uma amostra da turfa moída, cujas análises foram realizadas no Departamento de Química da CIENTEC.

Após a cominuição, a turfa foi tamizada em um agitador rotatório, separando-se os finos correspondentes a uma malha de 200 mesh (VIDOR et alii, 1983). Ajustou-se o pH em 6,5 com carbonato de cálcio, de uso industrial, fornecido pela NITRIFLEX S.A. Indústria e Comércio, seguindo-se a técnica descrita por SOMASEGARAN & HOBEN (1985).

A turfa já tratada foi envasada em saquinhos de polipropileno de 15 μ m de espessura que permitem, segundo ROUGHLEY (1968), uma boa permeabilidade ao oxigênio. Os pacotes, com 100 gramas de turfa cada, foram selados com resistência elétrica e posteriormente esterilizados (tindalizados) em autoclave a 121°C e 1 atm de pressão por 25 minutos em três dias consecutivos.

Antes da impregnação, os inóculos foram resfriados a 5°C para compensar o aumento de temperatura gerado neste processo (ROUGHLEY & VINCENT, 1967). Para que o inoculante possuísse um conteúdo final de umidade entre 40 e 50% (LOPRETO et alii, 1975), o volume de caldo adicionado foi es-

timado após a determinação da capacidade de absorção de água. Essa foi estimada pelo método descrito por SOMASEGARAN & HOBEN (1985), e confirmada pelo método empírico descrito no Apêndice 12. Com uma amostra do inoculante, avaliou-se a perda de umidade ao longo do tempo de armazenagem. Conhecendo-se o seu peso inicial (turfa + caldo + invólucro) foram feitas pesagens sucessivas determinando-se uma equação que expressa a perda de umidade em função do tempo. A amostra foi mantida a temperatura ambiente durante todo o ensaio.

A introdução do caldo nos pacotes foi feita com seringa e agulha estéreis conforme descrição feita por ALVA-REZ (1984). Os furos originários da impregnação foram fechados com etiquetas autoadesivas, esterilizadas com radiação ultravioletas.

Os inoculantes, após preparados, foram armazenados em sala com temperatura controlada. Usou-se temperatura próxima à ambiente, entre 24 e 26°C.

As determinações do número de células viáveis foram realizadas pelo método de contagem por diluições sucessivas em placas de Petry. Para obter-se a percentagem de células viáveis da estirpe SEMIA 587 em relação à estirpe SEMIA 5019, nos tratamentos onde utilizou-se a mistura das cepas, como inóculo, empregou-se a mesma técnica de avaliação de sorogrupos descrita no item 3.3.

As amostragens foram realizadas em intervalos de 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias após a inoculação. Se-

lecionou-se ao acaso, para cada tratamento, quatro pacotes de inoculantes obtendo-se assim quatro repetições por amostragem.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Avaliação da agitação ótima para o crescimento da estirpe SEMIA 587 em fermentador

A influência da agitação sobre o desenvolvimento da estirpe SEMIA 587 de *B. japonicum* pode ser visualizada no Apêndice 13. A concentração celular foi expressa em logaritmo do número de células viáveis por mililitro de meio, nos respectivos tempos de desenvolvimento. Observou-se que os valores referentes à agitação 100 rpm são significativamente semelhantes aos valores encontrados para 150 rpm. Da mesma forma os valores obtidos com 200, 230, 250, 270 e 300 rpm, foram também semelhantes entre si. Em função disto, foram representados na Figura 1, somente as curvas de crescimento para as agitações de 100, 230 e 500 rpm.

Analisando o comportamento destas curvas, notou-se que com o aumento da velocidade de agitação, a concentração celular máxima também aumentou, até 230 rpm. A partir desta velocidade de agitação, os valores da concentração máxima diminuíram (Figura 2).

A evolução das curvas referentes às agitações de 100, 150 e 500 rpm é característica dos processos microbiológicos que apresentam alguma limitação para o desenvolvi-

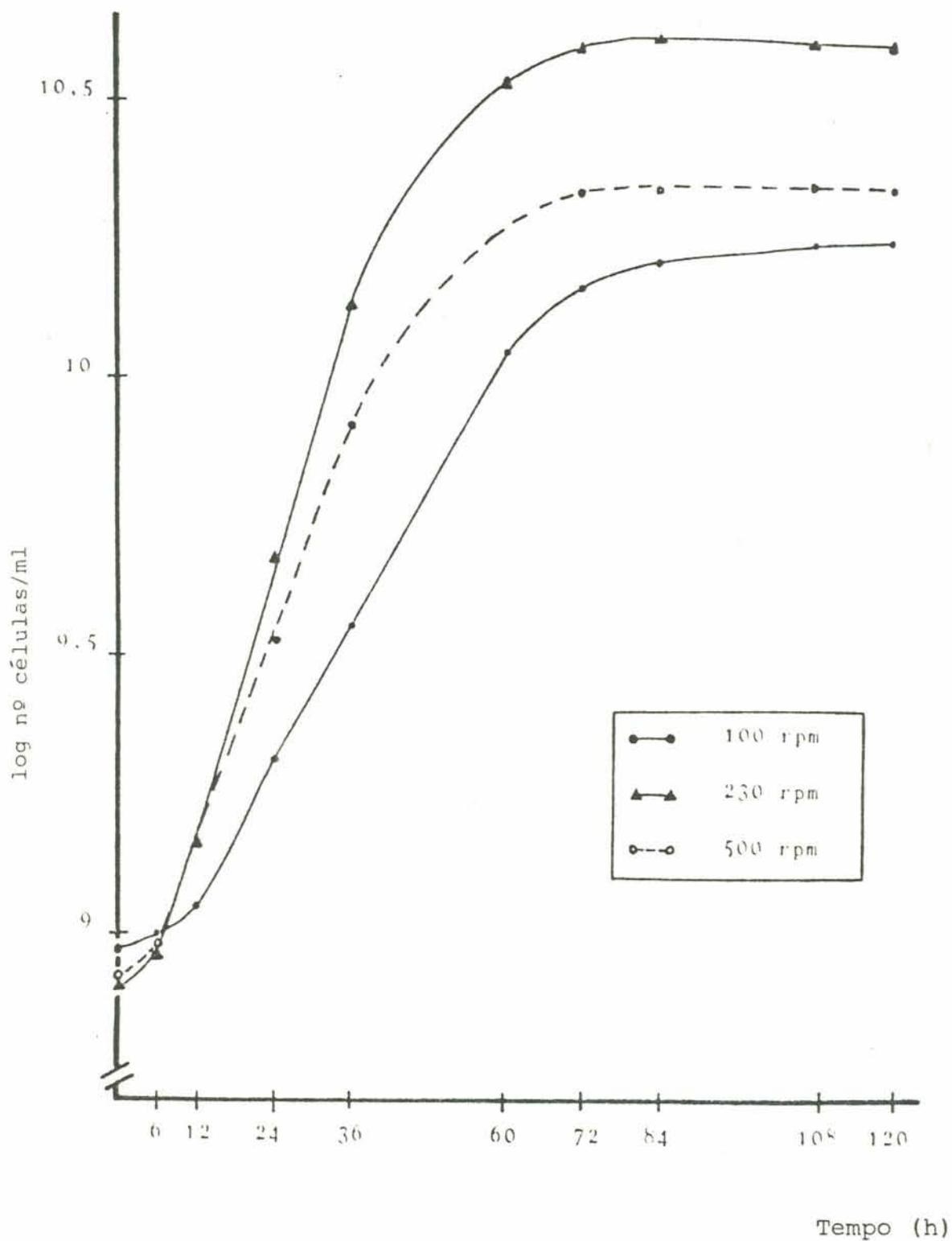


FIGURA 1 - Curvas de crescimento em fermentador da estirpe SEMIA 587 de *Bradyrhizobium japonicum* nas agitações de 100, 230 e 500 rpm. Média de quatro repetições.

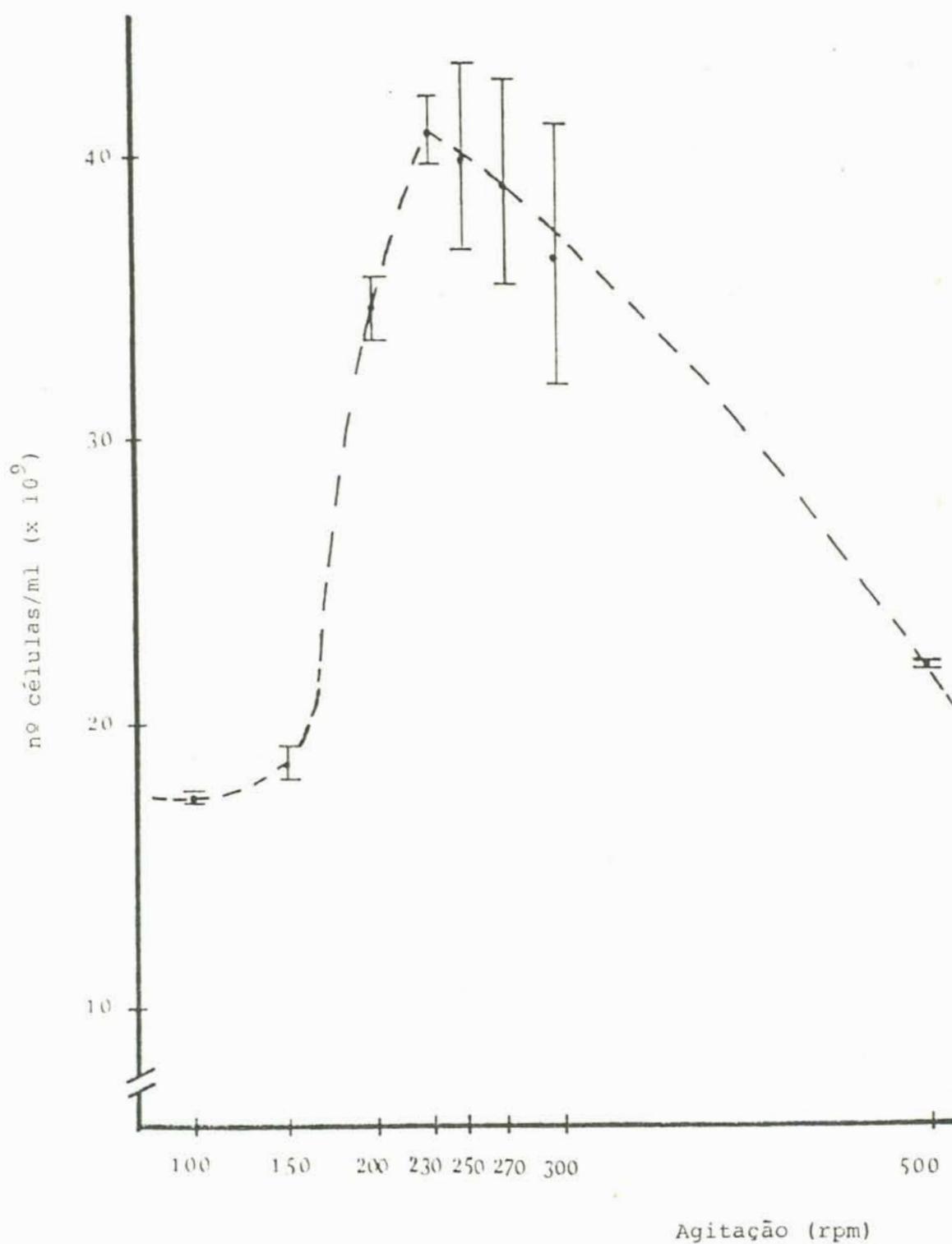


FIGURA 2 - Influência da agitação na concentração celular máxima, obtida durante as 120 horas de processo, para a estirpe SEMIA 587 de *Bradyrhizobium japonicum*. Média de quatro repetições.

mento. LOPRETO et alii (1973a) atribuem, para as baixas agitações, que essas limitações se devem à uma conseqüente diminuição na transferência nutricional. Já para as altas agitações, BRUNELLO & CONCONE (1975) colocam que ocorre uma deficiência no suprimento de oxigênio decorrente do vórtice formado, sendo isto justificado pelo fato do fermentador não apresentar chicanas.

Outras suposições que podem ser levantadas, para a deficiência do crescimento a 500 rpm, são a formação de uma grande quantidade de pequenas bolhas, devido a partição destas pelas palhetas do agitador, ocasionando assim um bloqueio no contato dos microrganismos com os nutrientes, ou ainda a da oxidação destes nutrientes decorrente do alto valor do oxigênio dissolvido no meio.

Observando-se ainda os resultados do crescimento microbiano (Apêndice 13 e Figura 1), notou-se que todas as curvas seguiram a mesma tendência nas 12 primeiras horas de processo, ou seja, atingiram concentrações celulares próximas a $1,5 \times 10^9$ células/ml independente da agitação utilizada. A partir deste período (12 horas) as curvas de 230, 250, 270 e 300 rpm apresentaram um crescimento mais acentuado do que as demais.

Na Tabela 1 são apresentados os valores do tempo de duração da fase exponencial, para as diferentes velocidades de agitação estudadas, determinados a partir da correlação existente entre as concentrações celulares e o tempo de desenvolvimento. Contudo, foi observado que não ocorreram di-

TABELA 1 - Duração da fase de crescimento exponencial em horas e a taxa de crescimento nesta fase (v) em número de células por mililitro e por hora, da estirpe SEMIA 587 de *Bradyrhizobium japonicum*, em fermentador, para as diferentes velocidades de agitação estudadas. Média de quatro repetições.

AGITAÇÃO (rpm)	INÍCIO (h)	TÉRMINO (h)	DURAÇÃO (h)	r^{**}	$v \times 10^8$ (nº cel/ml.h)
100	20,57	60,86	40,29 a*	0,9999	2,39 b*
150	12,00	45,00	33,00 ab	0,9999	1,96 b
200	7,67	37,67	30,00 ab	0,9993	3,20 b
230	8,83	36,43	27,60 ab	0,9993	4,80 b
250	9,33	42,33	33,00 ab	0,9978	13,47 a
270	6,90	27,33	20,43 bc	0,9976	2,99 b
300	15,67	30,33	14,66 c	0,9973	4,85 b
500	7,29	37,29	30,00 ab	0,9999	2,60 b

* Os valores seguidos com a mesma letra não diferem significativamente ($P > 0,05$) de acordo com a prova de amplitude múltipla de Duncan. As análises de variância encontram-se nos Apêndices 14 e 15.

** O valor do coeficiente de correlação foi utilizado como critério para definir a duração da fase de crescimento. (BONOMI et alii, 1986).

ferenças significativas entre a maioria dos tratamentos. Os valores foram menores do que os encontrados por BONOMI et alii (1986). De uma maneira geral, o tempo de duração diminuiu com o aumento da velocidade de agitação. O valor correspondente a 500 rpm (30 horas) pode ser explicado devido ao fato desta curva apresentar um comportamento na fase exponencial, similar ao da curva de 200 rpm.

Outro parâmetro que pode ser observado indiretamente, na Tabela 1 é a duração da fase de latência. A maioria dos tratamentos apresentaram um período de adaptação de aproximadamente 8 horas. Entretanto, em baixas velocidades de agitação (100 e 150 rpm) a fase de latência foi mais longa (20,57 e 12,00 horas). Estes valores também foram inferiores aos encontrados por BONOMI et alii (1986).

Os valores da taxa de crescimento (ν) apresentados na Tabela 1 não mostraram diferenças significativas, apenas para 250 rpm obteve-se um valor bem acima dos demais ($13,5 \times 10^8$ células/ml.h). Isto demonstra que apesar dos diferentes tempos de duração da fase exponencial, a taxa de crescimento manteve uma média de $3,3 \times 10^8$ células/ml.h, (excluindo ν para 250 rpm). A correlação destes dois parâmetros é bastante baixa quando se inclui os valores referentes a 250 rpm ($r = 0,0304$), e excetuando estes valores a correlação aumenta ($r = 0,6685$).

Na Tabela 2 estão representados os valores da produtividade máxima (Pm). Estes valores foram os que apresentaram maiores correlações com os demais parâmetros estuda-

TABELA 2 - Produtividade máxima em número de células por litro e por hora, em fermentador, da estirpe SEMIA 587 de *Bradyrhizobium japonicum* para as diferentes velocidades de agitação estudadas. Média de quatro repetições.

AGITAÇÃO (rpm)	PRODUTIVIDADE MÁXIMA (células/l.hora)
100	$1,52 \times 10^{11}$ c*
150	$1,64 \times 10^{11}$ c
200	$3,13 \times 10^{11}$ abc
230	$4,75 \times 10^{11}$ ab
250	$4,65 \times 10^{11}$ ab
270	$4,53 \times 10^{11}$ ab
300	$4,93 \times 10^{11}$ a
500	$2,51 \times 10^{11}$ bc

* Os valores seguidos com a mesma letra não diferem significativamente ($P > 0,05$) de acordo com a prova de amplitude múltipla de Duncan. A análise de variância encontra-se no Apêndice 16.

dos: $r = -0,9503$ para G , $r = 0,8427$ para m , $r = -0,7227$ para o tempo de duração e $r = 0,5517$ para v . Observou-se que com o aumento da velocidade de agitação, até o valor de 230 rpm, ocorreu um incremento na produtividade máxima e a partir desta agitação diminuiu o valor de P_m . Também observou-se que utilizando 300 rpm a P_m apresentou um comportamento distinto da tendência anteriormente citada, ou seja, obteve-se $4,93 \times 10^{11}$ células/l.h quando o esperado era um valor entre $4,5 \times 10^{11}$ e $2,5 \times 10^{11}$ células/l.h. Provavelmente isto é devido aos valores da concentração celular obtida após 72 horas de processo fermentativo, que se manteve constante a partir deste período. Conseqüentemente, o valor do intervalo de tempo usado no cálculo de P_m foi inferior aos usados para as outras velocidades de agitação.

A Figura 3 e a Tabela 3, mostram a variação da velocidade específica de crescimento máxima (μ_m) em função das diferentes agitações estudadas. O comportamento de m é semelhante ao do P_m ($r = 0,8427$), ou seja, com o aumento da agitação até 250 rpm ocorreu um aumento significativo em μ_m (de 0,044 para 0,098 horas⁻¹). Ultrapassando-se essa agitação ocorreu uma diminuição na velocidade específica, porém não tão brusca quanto o crescimento descrito anteriormente (de 0,098 para 0,063 horas⁻¹), apesar de que a variação da agitação foi maior. Provavelmente, a partir de uma determinada agitação, mantendo-se todos os demais parâmetros constantes, μ_m tende a estabilizar. Os valores de μ_m avaliados nestes ensaios mostraram-se reprodutíveis dentro de uma mar-

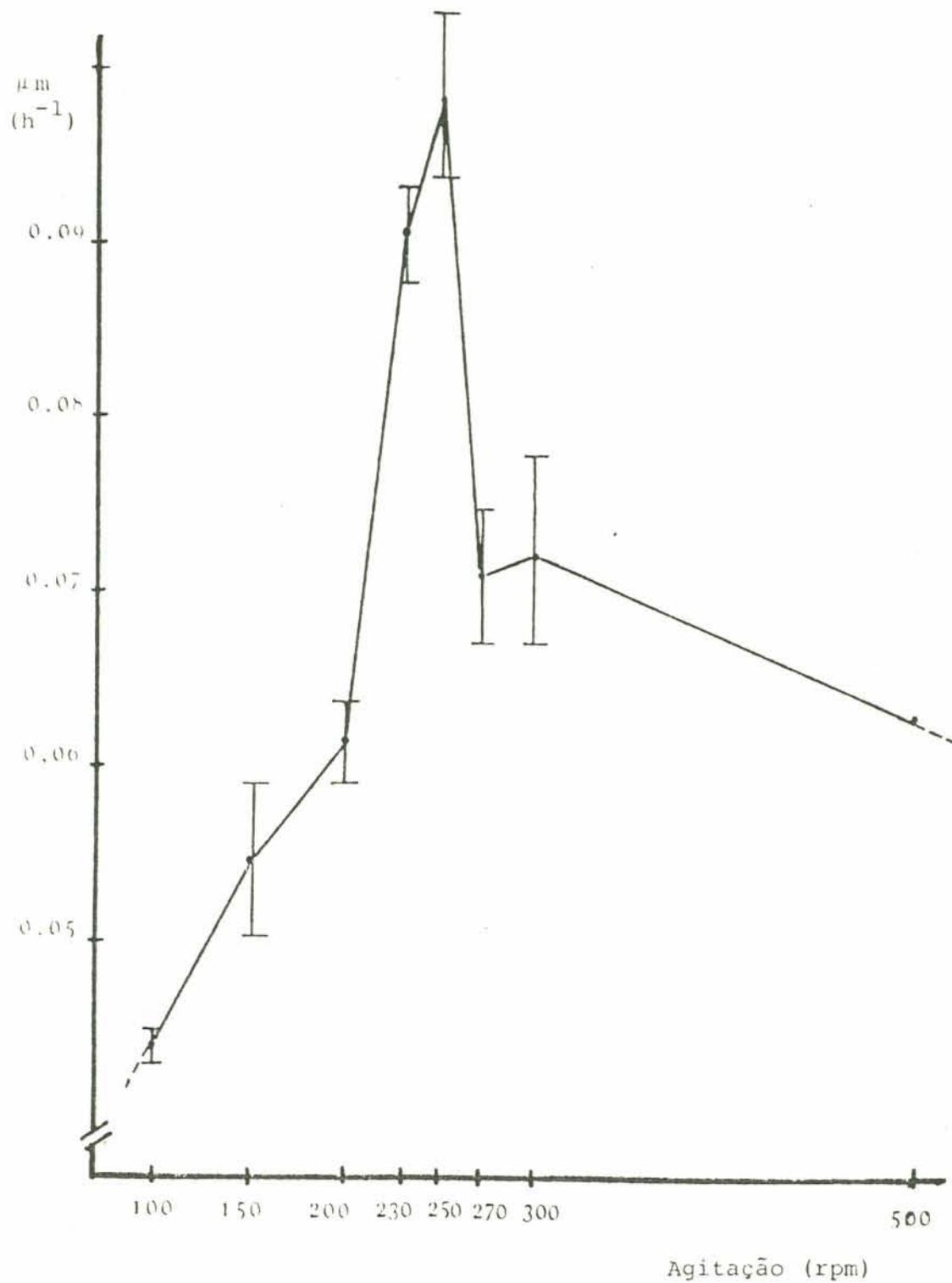


FIGURA 3 - Influência da agitação na velocidade específica de crescimento máxima da estirpe SEMIA 587 de *Bradyrhizobium japonicum*. Média de quatro repetições.

gem de erro experimental (Tabela 3). Os resultados de μ m para 100, 150, 200 e 500 rpm foram semelhantes aos encontrados por BONOMI et alii (1986), que trabalharam com 230 rpm. Os demais valores se aproximaram aos mostrados por LOPRETO et alii (1973b). Os resultados obtidos por ASTURIAS (1989) foram significativamente superiores aos encontrados neste trabalho.

Em relação ao tempo de geração (Tabela 4) verificou-se que para 100 e 150 rpm este valor foi bastante elevado; 14,83 e 14,74 horas respectivamente. Os demais valores de G foram significativamente semelhantes entre si, e aproximadamente iguais aos valores encontrados por LOPRETO et alii (1975). O menor resultado encontrado para G foi com 250 rpm; 6,5 horas. Constatou-se, também, que com o aumento da agitação ocorreu uma diminuição de G, sendo que acima de 250 rpm G torna a elevar-se. O tempo de geração apresentou uma ótima correlação com os valores de Pm ($r = -0,9503$).

Além da concentração celular, determinou-se também a evolução do pH para as diferentes velocidades de agitação. Os valores do pH para cada tempo de desenvolvimento estão mostrados no Apêndice 19. As variações do pH ficaram compreendidas entre 6,91 e 8,00. De uma maneira geral, observou-se que aumentando a velocidade de agitação, os cultivos tenderam a alcalinizar-se mais rapidamente (Tabela 5), confirmando a afirmação feita por LOPRETO et alii (1973b).

Relacionando os valores do pH, da agitação e do lo-

TABELA 3 - Velocidade específica de crescimento máxima (μ_m), erro absoluto que afeta ($\Delta\mu$) e erro relativo que afeta a concentração celular (α) da estirpe SEMIA 587 de *Bradyrhizobium japonicum*, em fermentador, para as diferentes velocidades de agitação estudadas.

AGITAÇÃO (rpm)	μ_m^{**} (h^{-1})	$\Delta\mu$ (h^{-1})	α (%)
100	0,0440 c*	0,0019	2,32
150	0,0546 c	0,0090	8,04
200	0,0613 c	0,0048	5,78
230	0,0903 ab	0,0058	6,95
250	0,0983 a	0,0191	17,06
270	0,0708 abc	0,0163	19,33
300	0,0723 abc	0,0222	25,89
500	0,0628 bc	0,0013	1,13

* Os valores seguidos com a mesma letra não diferem significativamente ($P > 0,05$) de acordo com a prova de amplitude múltipla de Duncan. A análise de variância encontra-se no Apêndice 17.

** Média de quatro repetições

TABELA 4 - Tempo de geração em horas da estirpe SEMIA 587 de *Bradyrhizobium japonicum*, em fermentador, para as diferentes velocidades de agitação estudadas. Média de quatro repetições.

AGITAÇÃO (rpm)	TEMPO DE GERAÇÃO (h)
100	14,83 a*
150	14,74 a
200	9,37 b
230	7,52 b
250	6,51 b
270	7,19 b
300	7,09 b
500	9,70 ab

* Os valores seguidos com a mesma letra não diferem significativamente ($P > 0,05$) de acordo com a prova de amplitude múltipla de Duncan. A análise de variância encontra-se no Apêndice 18.

garitmo da concentração celular, obteve-se a equação:

$$\hat{Y} = 4,79 \times 10^{-2} + 1,51 \times 10^{-6} \cdot X' + 1,32 \cdot X''$$

onde \hat{Y} representa o logaritmo do número de células viáveis por mililitro, X' a agitação utilizada e X'' o pH encontrado. Estes três parâmetros apresentaram uma correlação de 0,7548, sendo que a diferença entre a soma de todos os valores da concentração celular e de todos \hat{Y} obtidos, foi inferior a 0,01%. A análise estatística desta regressão está representada no Apêndice 21.

O melhor desenvolvimento celular para a estirpe SEMIA 587 de *B. japonicum*, em função dos resultados obtidos, foi alcançado quando se trabalhou com a velocidade de agitação de 230 rpm. Nesta agitação, utilizando-se um inóculo com uma concentração celular de $8,0 \times 10^8$ células/ml, pôde-se obter, aproximadamente, $4,0 \times 10^{10}$ células/ml em 72 horas de processo, sendo esta concentração superior à recomendada para a impregnação do inoculante (VIDOR et alii, 1983).

É importante lembrar que esta agitação é indicada somente para as características operacionais estudadas, ou seja, fermentação em batelada em um fermentador de 5 litros com 2,5 litros de volume útil. Possivelmente, com a variação do volume de operação ou do modo de condução do processo, a agitação deverá ser alterada para obter-se um bom rendimento celular. Para a otimização, seria necessário o mesmo estudo para diferentes volumes de operação.

TABELA 5 - Valores de pH obtidos após 12 horas de fermentação da estirpe SEMIA 587 de *Bradyrhizobium japonicum* para as diferentes velocidades de agitação estudadas. Média de quatro repetições.

AGITAÇÃO (rpm)	pH
100	7,18 c*
150	7,23 c
200	7,30 bc
230	7,33 bc
250	7,34 bc
270	7,47 ab
300	7,54 a
500	7,44 ab

* Os valores seguidos com a mesma letra não diferem significativamente ($P > 0,05$) de acordo com a prova de amplitude múltipla de Duncan. A análise de variância encontra-se no Apêndice 20.

4.2 Avaliação da temperatura ótima para o crescimento da estirpe SEMIA 587 em fermentador

O crescimento microbiano, mostrado no Apêndice 22 e representado na Figura 4, sofreu uma maior influência com a variação da temperatura do que com a variação da agitação (item 4.1). Nenhum dos tratamentos apresentou semelhança significativa entre si, com exceção das temperaturas de 28 e 30°C. Em função desta semelhança a curva correspondente a temperatura de 30°C não foi representada na Figura 4. Observou-se que, com o aumento da temperatura até 28°C, ocorreu um incremento no desenvolvimento celular, e a partir dessa temperatura um decréscimo (Figura 5).

Verificou-se, também, que as curvas referentes às temperaturas de 26, 28, 30 e 34°C (Apêndice 22 e Figura 4), mostraram uma evolução semelhante até 24 horas de processo. O mesmo ocorreu entre as curvas de 22 e 28°C. A concentração celular obtida após 120 horas, apresentou um coeficiente de variação de $\pm 1,5 \times 10^{10}$ células/ml, indicando assim significativas diferenças na concentração, decorrido este período. A maior concentração de *B. japonicum* obtida foi de $4,1 \times 10^{10}$ células/ml, para 28°C em 84 horas de fermentação.

As curvas correspondentes às temperaturas de 22 e 38°C, apresentaram um declínio no crescimento celular nas primeiras horas do processo, provavelmente devido à mudança drástica da temperatura entre o inóculo e o meio fermentativo. Posterior a este período de adaptação, elas demons-

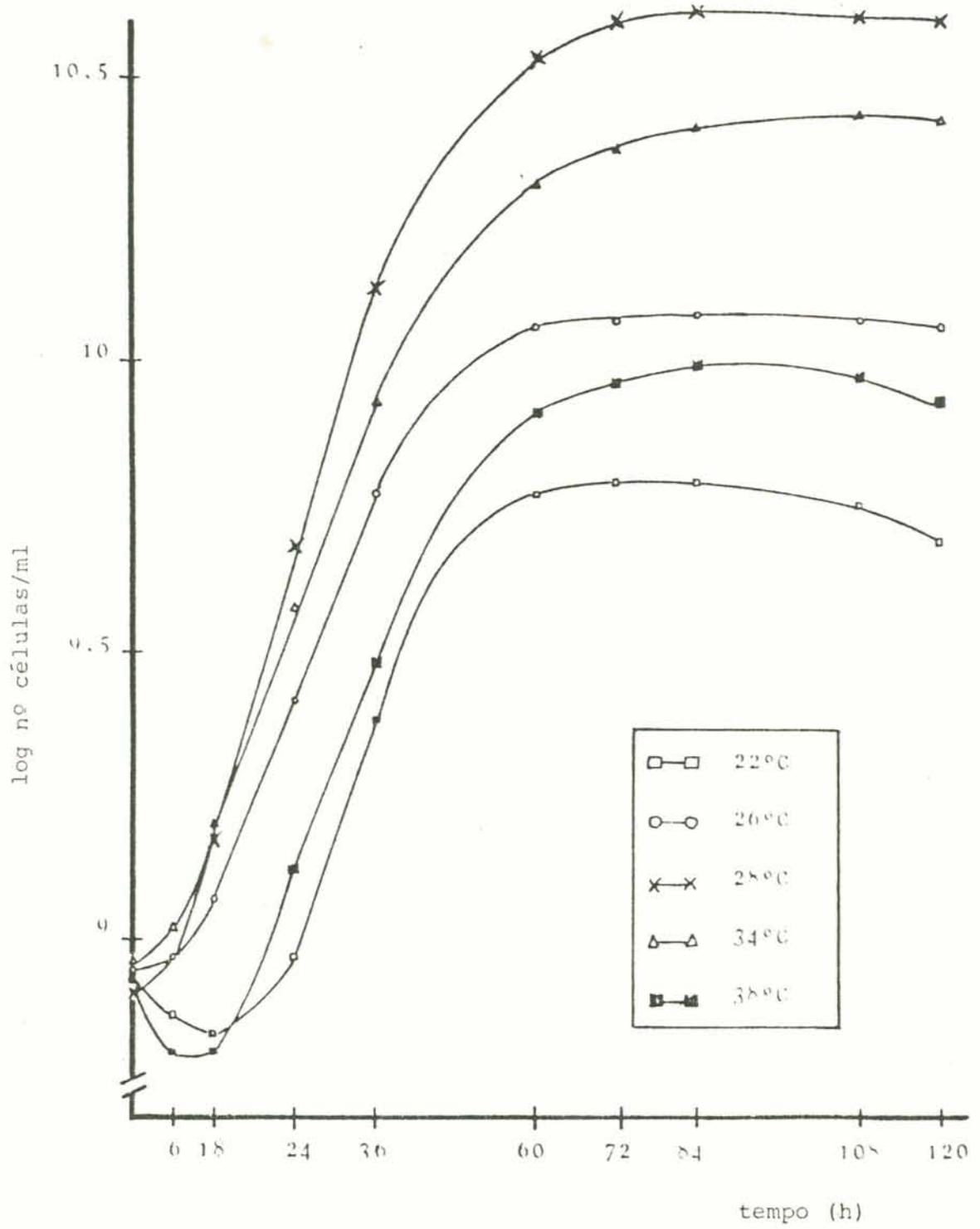


FIGURA 4 - Curvas de crescimento em fermentador da estirpe SEMIA 587 de *Bradyrhizobium japonicum* para as temperaturas de 22, 26, 28, 34 e 38°C. Média de quatro repetições.

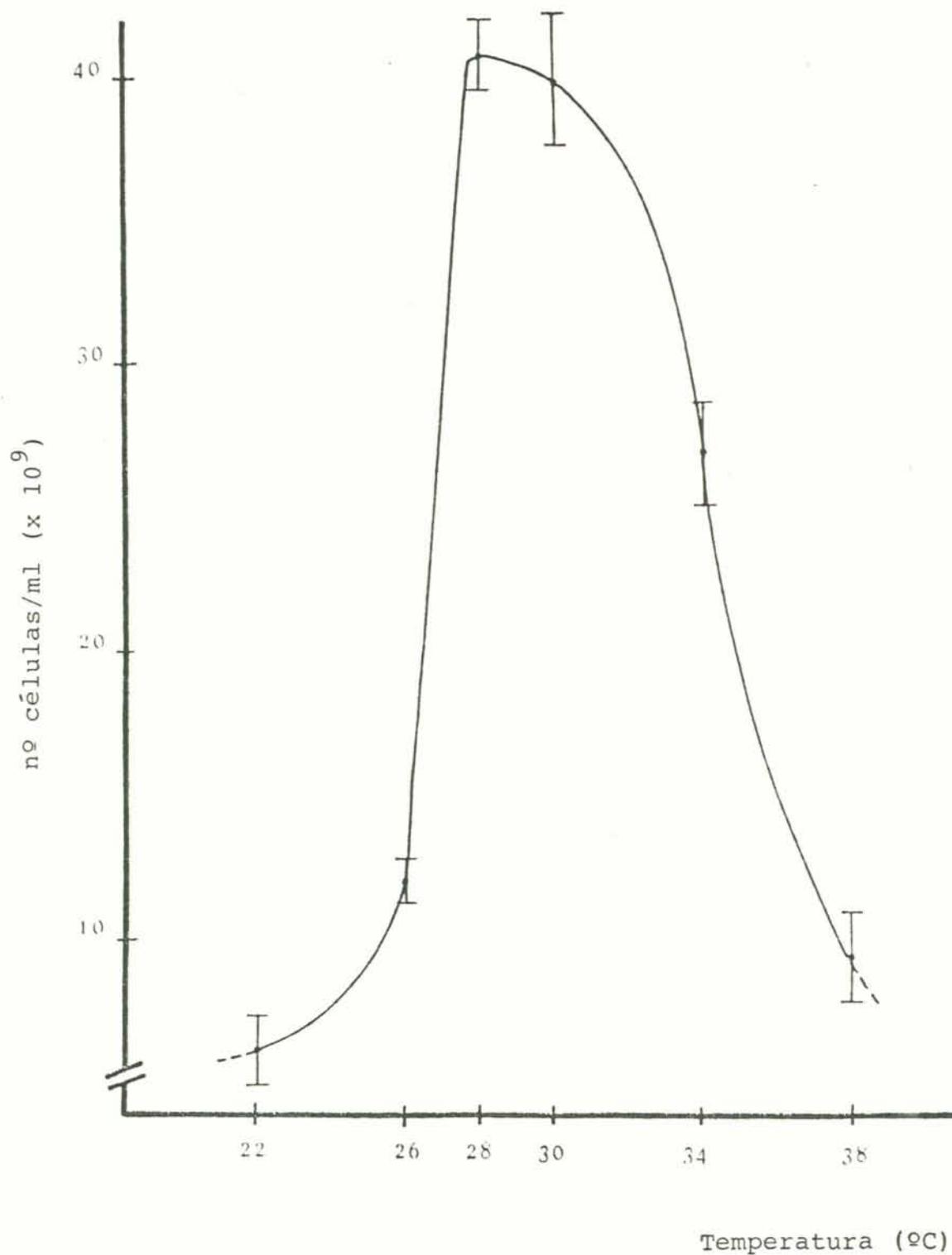


FIGURA 5 - Influência da temperatura na concentração celular máxima, obtida durante as 120 horas de processo, para a estirpe SEMIA 587 de *Bradyrhizobium japonicum*. Média de quatro repetições.

traram um comportamento semelhante às demais curvas.

A produtividade máxima (Tabela 6) aumentou significativamente de $7,4 \times 10^{10}$ para $4,8 \times 10^{11}$ células/l.h, quando a temperatura passou de 22 para 28°C. A partir de 28°C os valores de Pm diminuíram simultaneamente com o aumento da temperatura.

Os valores correspondentes à taxa de crescimento (v) da fase exponencial (Tabela 7) demonstraram um comportamento semelhante aos valores de Pm ($r = 0,9655$). Isso significa que com o aumento da temperatura ocorreu, primeiramente, um aumento e depois um decréscimo nos valores de v . Entretanto, apesar de não apresentarem diferenças significativas, o valor máximo obtido ($6,1 \times 10^8$ células/ml.h) não foi a 28°C, como na produtividade máxima, mas sim a 30°C. Isso se deve ao fato de que, para o cálculo de v , utilizou-se as concentrações celulares (inicial e final) da fase de crescimento exponencial, sendo que a 30°C estes valores foram mais elevados do que a 28°C.

A análise dos dados referentes ao tempo de duração da fase de crescimento exponencial (Tabela 7), mostrou que, para as temperaturas de 28, 30 e 34°C, tanto o início como o término da fase exponencial foram significativamente semelhantes, apresentando uma duração de 27,86 horas em média. Para 22 e 38°C, os dados também foram significativos entre si. Nessas duas últimas temperaturas a fase de latência foi mais prorrogada do que as demais, em 22 e 20 horas respectivamente. O valor referente ao início da fase expo-

TABELA 6 - Produtividade máxima em número de células por litro e por hora da estirpe SEMIA 587 de *Bradyrhizobium japonicum* para as diferentes temperaturas de operação estudadas em fermentador. Média de quatro repetições.

TEMPERATURA (°C)	PRODUTIVIDADE MÁXIMA (células/l.h)
22	7,35 x 10 ¹⁰ b*
26	1,33 x 10 ¹¹ b
28	4,75 x 10 ¹¹ a
30	4,64 x 10 ¹¹ a
34	2,41 x 10 ¹¹ ab
38	1,04 x 10 ¹¹ b

* Os valores seguidos com a mesma letra não diferem significativamente ($P > 0,05$) de acordo com a prova de amplitude múltipla de Duncan. A análise de variância encontra-se no Apêndice 23.

TABELA 7 - Duração da fase de crescimento exponencial em horas e a taxa de crescimento nesta fase (v) em número de células por mililitro e por hora da estirpe SEMIA 587 de *Bradyrhizobium japonicum* para as diferentes temperaturas de operação estudadas em fermentador. Média de quatro repetições.

TEMPERATURA (°C)	INÍCIO (h)	TÉRMINO (h)	DURAÇÃO (h)	r^{**}	$v \times 10^8$ (n°cel/h.ml)
22	22,00	41,33	19,33 b*	0,9792	1,47 c*
26	10,67	43,00	32,33 a	0,9978	2,27 bc
28	8,83	36,43	27,60 ab	0,9993	4,80 ab
30	9,67	39,33	29,66 a	0,9970	6,08 a
34	9,67	36,00	26,33 ab	0,9997	2,75 bc
38	20,33	40,67	20,34 b	0,9980	1,48 c

* Os valores seguidos com a mesma letra não diferem significativamente ($P > 0,05$) de acordo com a prova de amplitude múltipla de Duncan. As análises de variância encontram-se nos Apêndices 24 e 25.

** O valor do coeficiente de correlação foi utilizado como critério para definir a duração da fase de crescimento exponencial (BONOMI et alii, 1986).

nencial, para a temperatura de operação de 26°C, foi intermediário aos valores discutidos anteriormente, entretanto, para essa temperatura o tempo de duração foi o mais elevado (32,33 horas).

O tempo de geração (Tabela 8) foi o parâmetro que apresentou maiores diferenças significativas entre os tratamentos. O valor de G variou de 7,52 horas (para 28°C) até 10,85 horas (para 26°C), não seguindo uma tendência lógica para os resultados, entretanto, esses valores se assemelham aos encontrados por LOPRETO et alii (1972) e LOPRETO et alii (1975). De uma maneira geral, G aumentou com a temperatura, apresentando uma correlação muito baixa com o tempo de duração ($r = 0,0425$), e média para com os demais parâmetros: $r = -0,7957$ com Pm, $r = -0,8713$ com μm e $r = -0,7727$ com v .

Os resultados obtidos para a velocidade específica máxima (μm), mostrados na Tabela 9, não apresentaram diferenças significativas entre si. Foram levemente superiores aos encontrados por BONOMI et alii (1986), que trabalhou a 30°C, e também aos encontrados por LOPRETO et alii (1973b), nesta mesma temperatura. Da mesma forma que no item 4.1, os valores de μm estão limitados por uma margem de erro experimental ($\Delta\mu$), também mostrado na Tabela 9. De certa forma μm seguiu a mesma tendência dos valores de v ($r = 0,9446$), ou seja, com o aumento da temperatura até 28°C ocorre um acréscimo em μm . A partir dessa temperatura μm decresce, porém mais lentamente (Figura 6).

TABELA 8 - Tempo de geração em horas da estirpe SEMIA 587 de *Bradyrhizobium japonicum* para as diferentes temperaturas de operação estudadas em fermentador. Média de quatro repetições.

TEMPERATURA (°C)	TEMPO DE GERAÇÃO (h)
22	8,83 abc*
26	10,85 a
28	7,52 c
30	7,70 bc
34	9,89 ab
38	10,35 a

* Os valores seguidos com a mesma letra não diferem significativamente ($P > 0,05$) de acordo com a prova de amplitude múltipla de Duncan. A análise de variância encontra-se no Apêndice 26.

TABELA 9 - Velocidade específica de crescimento máxima (μ_m), erro absoluto que afeta μ ($\Delta\mu$) e erro relativo que afeta a concentração celular (α) da estirpe SEMIA 587 de *Bradyrhizobium japonicum* para as diferentes temperaturas de operação estudadas, em fermentador.

TEMPERATURA (°C)	μ_m^{**} (h ⁻¹)	$\Delta\mu$ (h ⁻¹)	α (%)
22	0,0534 a*	0,0115	20,44
26	0,0528 a	0,0057	6,85
28	0,0903 a	0,0058	6,95
30	0,0858 a	0,0159	14,21
34	0,0629 a	0,0075	6,70
38	0,0513 a	0,0129	15,45

* Os valores seguidos com a mesma letra não diferem significativamente ($P > 0,05$) de acordo com a prova de amplitude múltipla de Duncan. A análise de variância encontra-se no Apêndice 27.

** Média de quatro repetições.

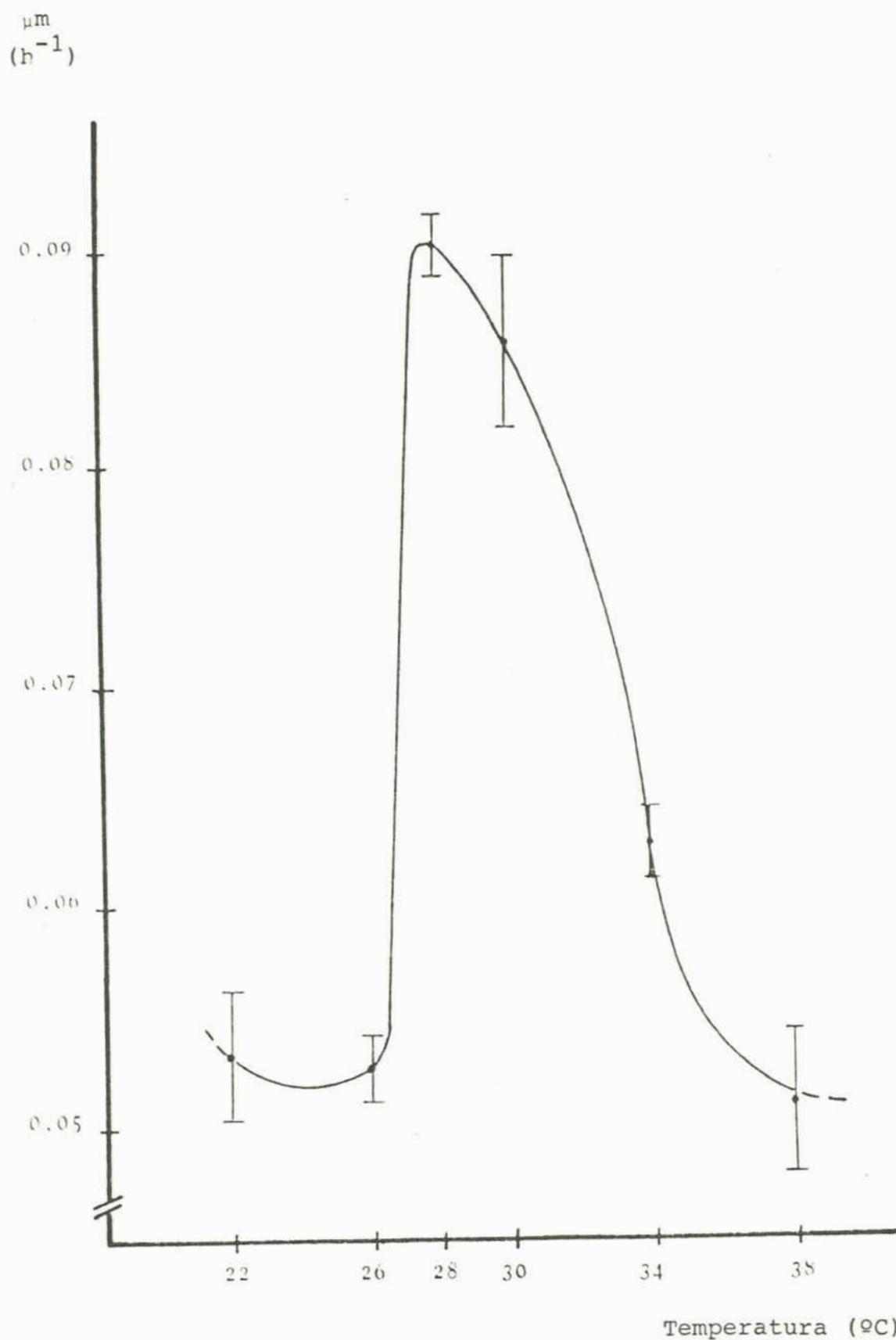


FIGURA 6 - Influência da temperatura na velocidade específica de crescimento máxima da estirpe SEMIA 587 de *Bradyrhizobium japonicum*. Média de quatro repetições.

Como no item anterior, também avaliou-se o comportamento do pH ao longo do processo fermentativo, para as diferentes temperaturas estudadas (Apêndice 28). O comportamento do pH em relação às diferentes temperaturas foi semelhante ao observado para as diferentes agitações (item 4.1). Ao aumentar a temperatura de operação, notou-se que o meio alcalinizou mais rapidamente (Tabela 10).

Relacionando-se o pH (X''), com a temperatura (X') e o logaritmo da concentração celular (\hat{Y}), obteve-se a equação abaixo, que apresentou um coeficiente de correlação de 0,7316:

$$\hat{Y} = -4,60 - 0,04.X' + 2,09.X''$$

A variação observada entre a soma dos resultados experimentais da concentração celular e a soma dos resultados obtidos utilizando-se a equação acima, foi inferior a 0,0004%. A análise estatística da regressão, está descrita no Apêndice 30.

Através da análise dos resultados obtidos neste experimento pode-se evidenciar que a melhor temperatura, para o desenvolvimento da estirpe SEMIA 587 de *Bradyrhizobium japonicum*, foi a de 28°C. Este valor coincide com os valores descritos por ALLISON & MINOR (1940) citados por BURRIS & WILSON (1945), DATE (1959) citado por ROUGHLEY (1970), FAO (1975), BALATTI (1976), BURTON (1979), THOMPSON (1980), BALATTI (1981), GONZÁLEZ (1984), JORDAN (1986) e VIERA (1986)

TABELA 10 - Valores de pH obtidos após 12 horas de fermentação da estirpe SEMIA 587 de *Bradyrhizobium japonicum* para as diferentes temperaturas de operação estudadas. Média de quatro repetições.

TEMPERATURA (°C)	pH
22	7,16 d*
26	7,23 c
28	7,33 b
30	7,36 b
34	7,46 a
38	7,34 b

* Os valores seguidos com a mesma letra não diferem significativamente ($P > 0,05$) de acordo com a prova de amplitude múltipla de Duncan. A análise de variância encontra-se no Apêndice 29.

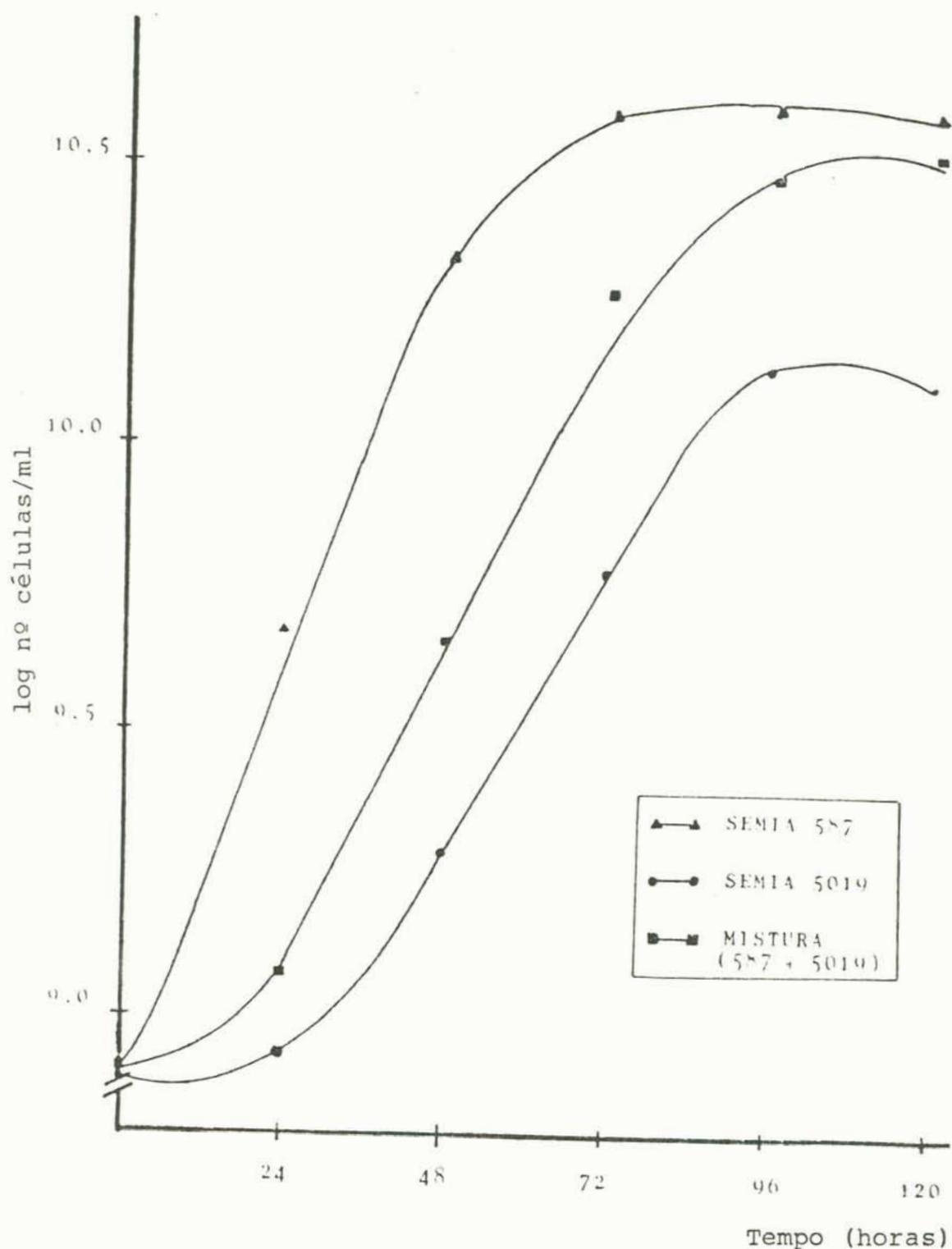


FIGURA 7 - Curvas de crescimento em fermentador de *Bradyrhizobium japonicum* correspondentes aos tratamentos com a estirpe SEMIA 587, com a estirpe SEMIA 5019 e com a mistura (587 + 5019). Média de quatro repetições.

para a incubação desse microrganismo.

4.3 Avaliação da capacidade competitiva entre as estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 em caldo nutritivo

Com base nas curvas de crescimento obtidas em 120 horas de processo fermentativo (Apêndice 31 e Figura 7), observou-se que o tratamento com a estirpe SEMIA 587 apresentou uma maior produção celular. Esse tratamento e o tratamento com a mistura das duas cepas não diferiram significativamente entre si, entretanto, mostraram resultados estatisticamente superiores ao tratamento com a estirpe SEMIA 5019. Pôde-se observar também, que as maiores concentrações foram obtidas pela estirpe SEMIA 587 ($3,98 \times 10^8$ células viáveis/ml), e que o tratamento mistura mostrou valores intermediários aos tratamentos com as estirpes isoladas. Este comportamento, entre os tratamentos, é também confirmado através dos dados expressos nas Tabelas 11, 12 e 13.

Quanto à duração da fase de crescimento exponencial, o tratamento com a estirpe SEMIA 587 foi o que apresentou um menor intervalo (27,66 horas) e também a fase de latência mais curta (18,67 horas). O tratamento com a mistura apresentou valores intermediários aos tratamentos com as estirpes isoladas. Isso indica a influência da estirpe SEMIA 587 no crescimento celular da mistura.

O tratamento que apresentou a maior taxa de cresci-

mento correspondeu ao da estirpe SEMIA 587 (Tabela 11), não diferindo estatisticamente do tratamento mistura. Esses dois tratamentos diferiram ao da estirpe SEMIA 5019, que mostrou o menor valor.

Os valores da velocidade específica máxima (μm), apresentados na Tabela 12, mostram-se reprodutíveis dentro da margem de erro experimental ($\Delta\mu$). As diferenças entre os valores de μm nos ensaios fermentativos devem-se basicamente à existência de condições distintas entre os tratamentos. A estirpe SEMIA 587 demonstrou como no item 4.1 e 4.2, para as mesmas condições operativas (28°C; 0,5 vvm e 230 rpm), um valor de μm elevado. Esse foi o único parâmetro em que não predominou o comportamento da estirpe SEMIA 587 no tratamento mistura. Provavelmente, pelo fato deste valor ser determinado nas primeiras horas de processo, e neste período a estirpe SEMIA 587 ainda não havia predominado sobre a estirpe SEMIA 5019 na mistura.

Os tempos de geração (Tabela 13), apesar de diferirem significativamente, encontram-se dentro de uma faixa de 8,18 a 15,00 horas. A estirpe SEMIA 587, novamente apresentou o melhor resultado (8,18 horas). Vários autores encontraram valores semelhantes, como LOPRETO et alii (1972), LOPRETO et alii (1973b), LOPRETO et alii (1975) e MAZZA et alii (1976).

Os diferentes valores da produtividade máxima (P_m), encontrados neste trabalho através de medidas da concentração celular, podem ser justificados pelo erro experimental

TABELA 11 - Duração da fase de crescimento exponencial e taxa de crescimento (v) para os tratamentos com as estirpes SEMIA 587, SEMIA 5019 e com a mistura das duas em fermentador. Média de quatro repetições.

PARÂMETROS	TRATAMENTOS		
	SEMIA 587	SEMIA 5019	MISTURA (587+5019)
INÍCIO (horas)	18,67	29,33	24,00
TÉRMINO (horas)	46,33	92,67	73,00
DURAÇÃO (horas)	27,66 c*	63,34 a	49,00
COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO ^{1/} $v \times 10^{+8}$	0,9988	0,9961	0,9998
(nº células/ml.h)	4,13 a	1,85 b	3,73 a

1/ O valor do coeficiente de correlação foi utilizado como critério para definir a duração da fase de crescimento exponencial (BONOMI, 1986).

* Médias por linha, seguidas com a mesma letra, não diferem significativamente ($P > 0,05$) de acordo com a prova de amplitude múltipla de Duncan. As análises de variância encontram-se nos Apêndices 32 e 33.

TABELA 12 - Velocidade específica de crescimento máxima (μ_m), erro absoluto que afeta μ ($\Delta\mu$) e erro relativo que afeta a concentração celular (α) para os tratamentos com as estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 isoladamente, e com a mistura das duas, em fermentador.

TRATAMENTOS	$\mu_m^{1/}$	$\Delta\mu$	α
	(horas ⁻¹)		(%)
SEMIA 587	0,0806 a*	0,0058	13,73
SEMIA 5019	0,0337 b	0,0062	14,85
MISTURA (587+5019)	0,0360 b	$9,7 \times 10^{-11}$	$2,3 \times 10^{-7}$

1/ Média de quatro repetições.

* Os valores seguidos com a mesma letra, não diferem significativamente ($P > 0,05$) de acordo com a prova de amplitude múltipla de Duncan. A análise de variância encontra-se no Apêndice 34.

TABELA 13 - Tempo de geração (G) e produtividade máxima (Pm) para os tratamentos com as estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 isoladamente, e com a mistura das duas, em fermentador. Média de quatro repetições.

TRATAMENTOS	G (horas)	Pm (nº células/l.h)
SEMIA 587	8,18 c*	4,06 x 10 ¹¹ a
SEMIA 5019	15,00 a	1,36 x 10 ¹¹ c
MISTURA (587+5019)	10,14 b	2,69 x 10 ¹¹ b

* As médias por coluna seguidas com a mesma letra, não diferem significativamente (P>0,05) de acordo com a prova de amplitude múltipla de Duncan. As análises de variância encontram-se nos Apêndices 35 e 36.

intrínseco a esta medida (BONOMI, 1987). A maior produtividade foi obtida pela estirpe SEMIA 587, sendo significativamente diferente dos outros dois tratamentos.

Outro parâmetro avaliado foi o consumo do substrato (glicerol), em função do tempo de desenvolvimento do processo (Apêndice 37 e Figura 8, 9 e 10). Através dele pôde-se calcular o valor do rendimento celular em relação ao substrato (Tabela 14). As curvas de consumo de substrato mostram um comportamento inverso, mas proporcional às de formação de biomassa. Observa-se no Apêndice 37, que tanto no tratamento com a estirpe SEMIA 587 quanto no tratamento com a mistura das estirpes, o substrato foi praticamente todo consumido, em 120 horas de processo. Entretanto estes tratamentos não são significativamente semelhantes. Isso, se deve ao fato de que a estirpe SEMIA 587, isoladamente, consumiu mais rapidamente o glicerol do que quando misturada com a estirpe SEMIA 5019 (Figuras 8 e 10). A estirpe SEMIA 5019 consumiu apenas 57% do substrato, enquanto que a estirpe SEMIA 587 e a mistura consumiram 90 e 87%, respectivamente.

Para o cálculo do rendimento celular em função do substrato (Y), foi necessária a avaliação da concentração celular inicial e final em gramas de rhizóbio por litro de meio. Os valores de Y foram semelhantes aos encontrados por BONOMI et alii (1986), que por sua vez explica que os elevados valores obtidos, podem ser decorrentes do consumo do extrato de levedura utilizado como fonte de carbono prefe-

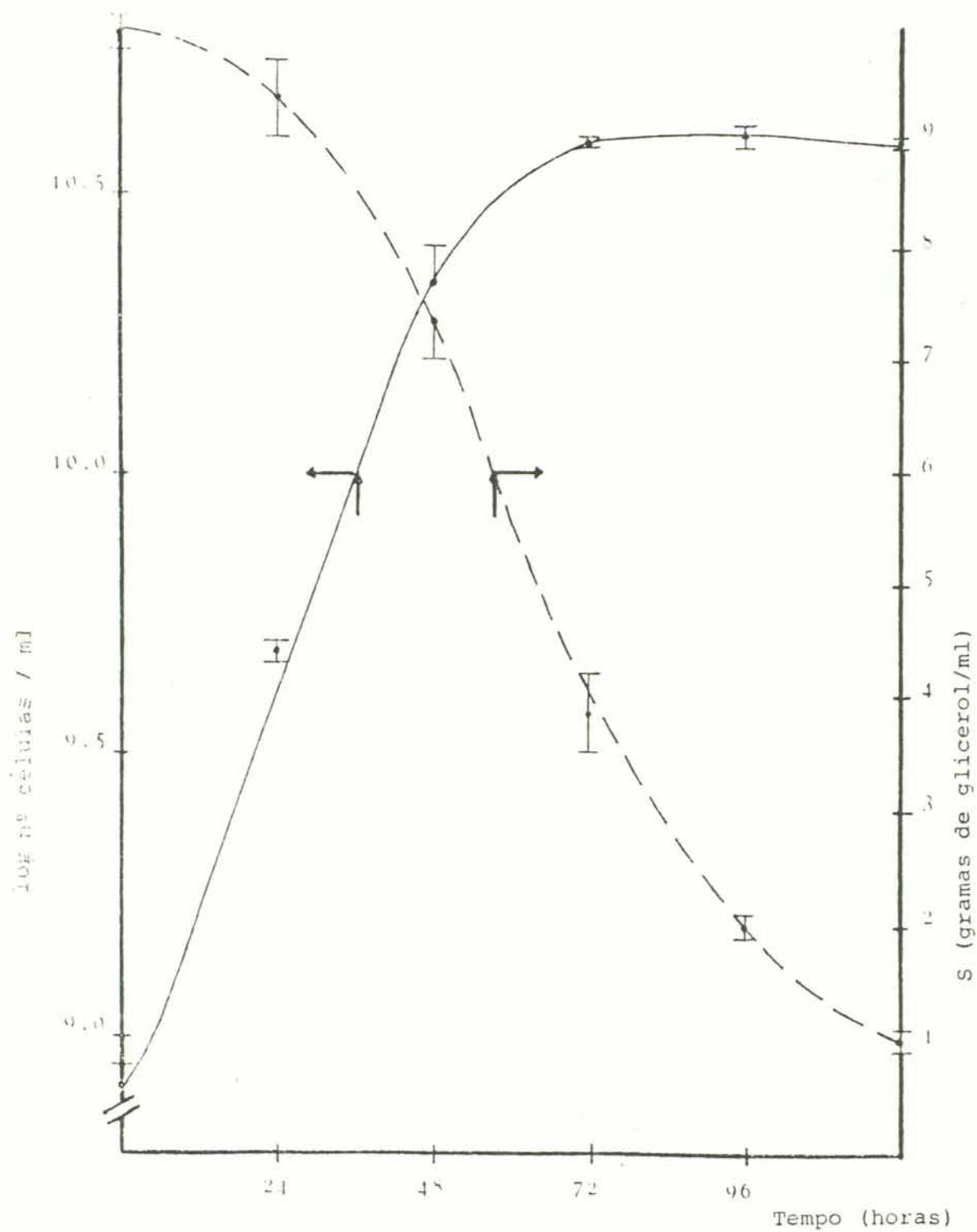


FIGURA 8 - Curva de crescimento celular (—) e de consumo de substrato (---) para o tratamento com a estirpe SEMIA 587 de *Bradyrhizobium japonicum* em fermentador. Média de quatro repetições.

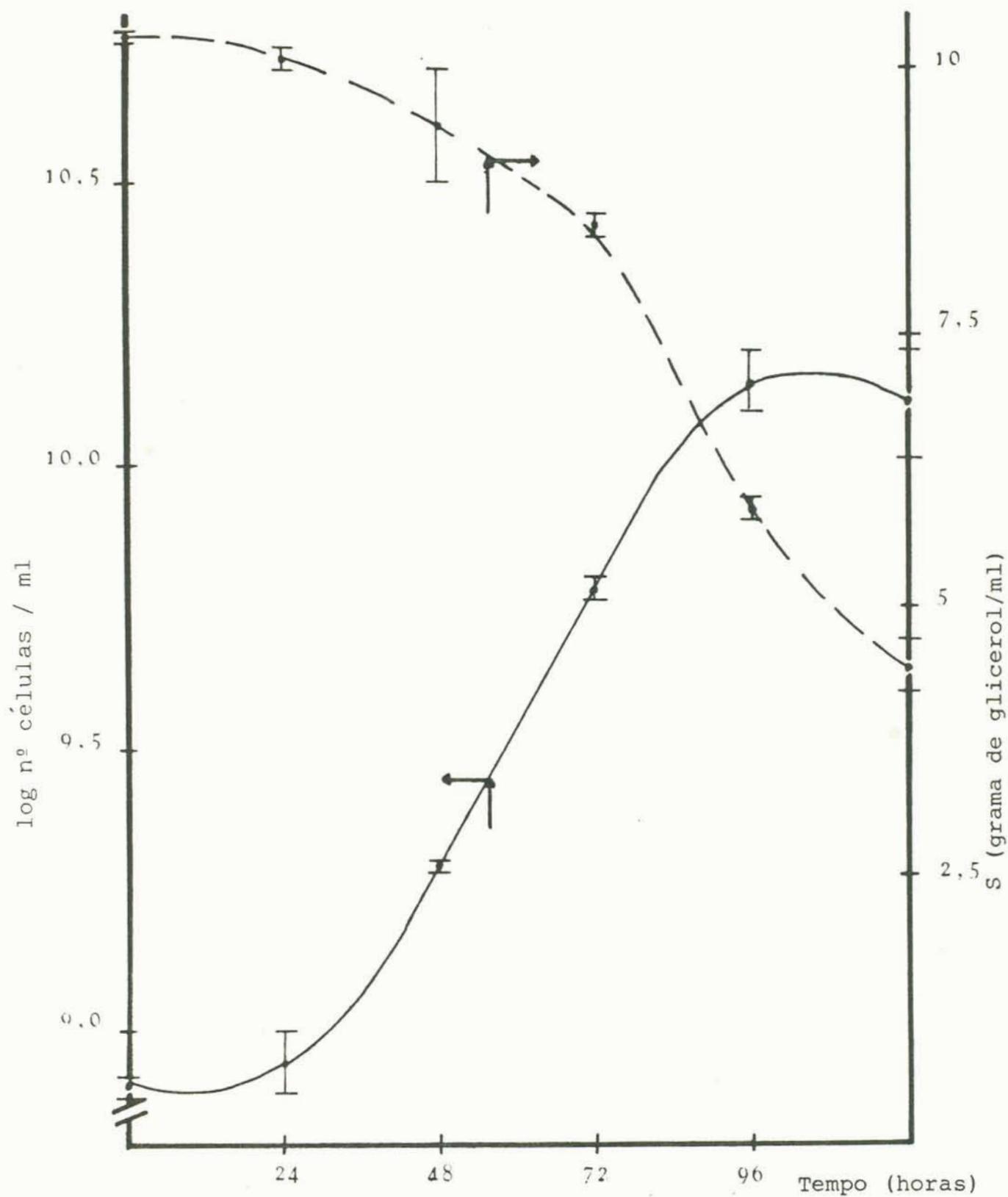


FIGURA 9 - Curva de crescimento celular (—) e de consumo de substrato (---) para o tratamento com a estirpe SEMIA 5019 de *Bradyrhizobium japonicum*, em fermentador. Média de quatro repetições.

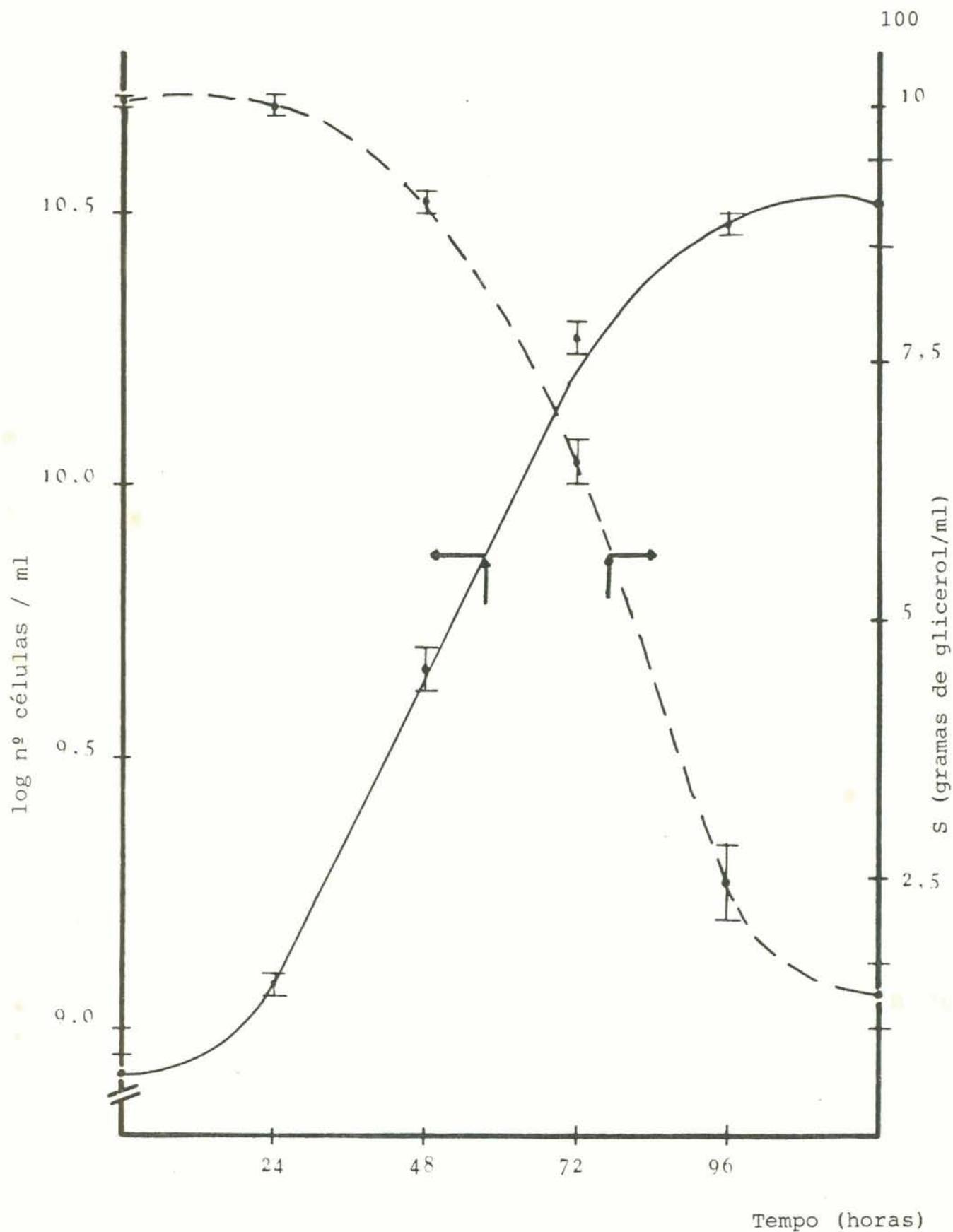


FIGURA 10 - Curva de crescimento celular (—) e de consumo de substrato (---) para o tratamento com a mistura (587 + 5019) de *Bradyrhizobium japonicum*, em fermentador. Média de quatro repetições.

TABELA 14 - Valor inicial e final da concentração celular em gramas por litro e os valores do rendimento celular em função do substrato (Y) para os tratamentos com as estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 isoladamente, e com a mistura das duas em fermentador. Média de quatro repetições.

TRATAMENTOS	CONCENTRAÇÃO (g/l)		Y (g cél/g glic)
	INICIAL	FINAL	
SEMIA 587	1,66	6,82	0,578 a*
SEMIA 5019	1,65	5,29	0,620 a
MISTURA (587+5019)	1,66	6,04	0,501 a

* As médias por coluna seguidas com a mesma letra não diferem significativamente ($P > 0,05$) de acordo com a prova de amplitude múltipla de Duncan. A análise de variância encontra-se no Apêndice 38.

rencial ao glicerol. Para os três tratamentos, os valores de Y foram significativamente semelhantes.

Relacionando todos esses parâmetros obteve-se altas correlações entre o tempo de duração da fase exponencial e os demais: $r = -0,9333$ para μ_m , $r = 0,9382$ para G e $r = -0,9944$ para Pm. Outras relações que apresentaram valores elevados de correlação foram: v com Pm ($r = 0,9326$), v com o tempo de geração ($r = -0,9926$) e o tempo de geração com a produtividade máxima ($r = -0,9695$). Entretanto, houve uma baixa correlação de Y com os demais parâmetros, r variou de 0,1235 até 0,6583, demonstrando que a avaliação da cinética de crescimento através do rendimento celular em função do substrato pode induzir a erros de interpretação, principalmente a nível de dimensionamento do processo.

Como nas etapas anteriores, determinou-se também a variação do pH em função do tempo de processo. Os valores do pH para cada tratamento estão apresentados no Apêndice 39 e representados na Figura 11. Através do gráfico pH versus tempo (Figura 11), observou-se que a estirpe SEMIA 5019 alcalinizou mais rapidamente o meio fermentativo do que os demais tratamentos. A mistura das estirpes proporcionou os menores valores de pH no decorrer do processo fermentativo. Segundo LOPRETO et alii (1972), à medida que o processo avança o valor do pH tende a elevar-se, alcalinizando o meio. Entretanto, independente do tratamento, pôde-se observar nas curvas de evolução do pH que os três cultivos tenderam a valores compreendidos entre 7,65 e 7,73 ao final

pH

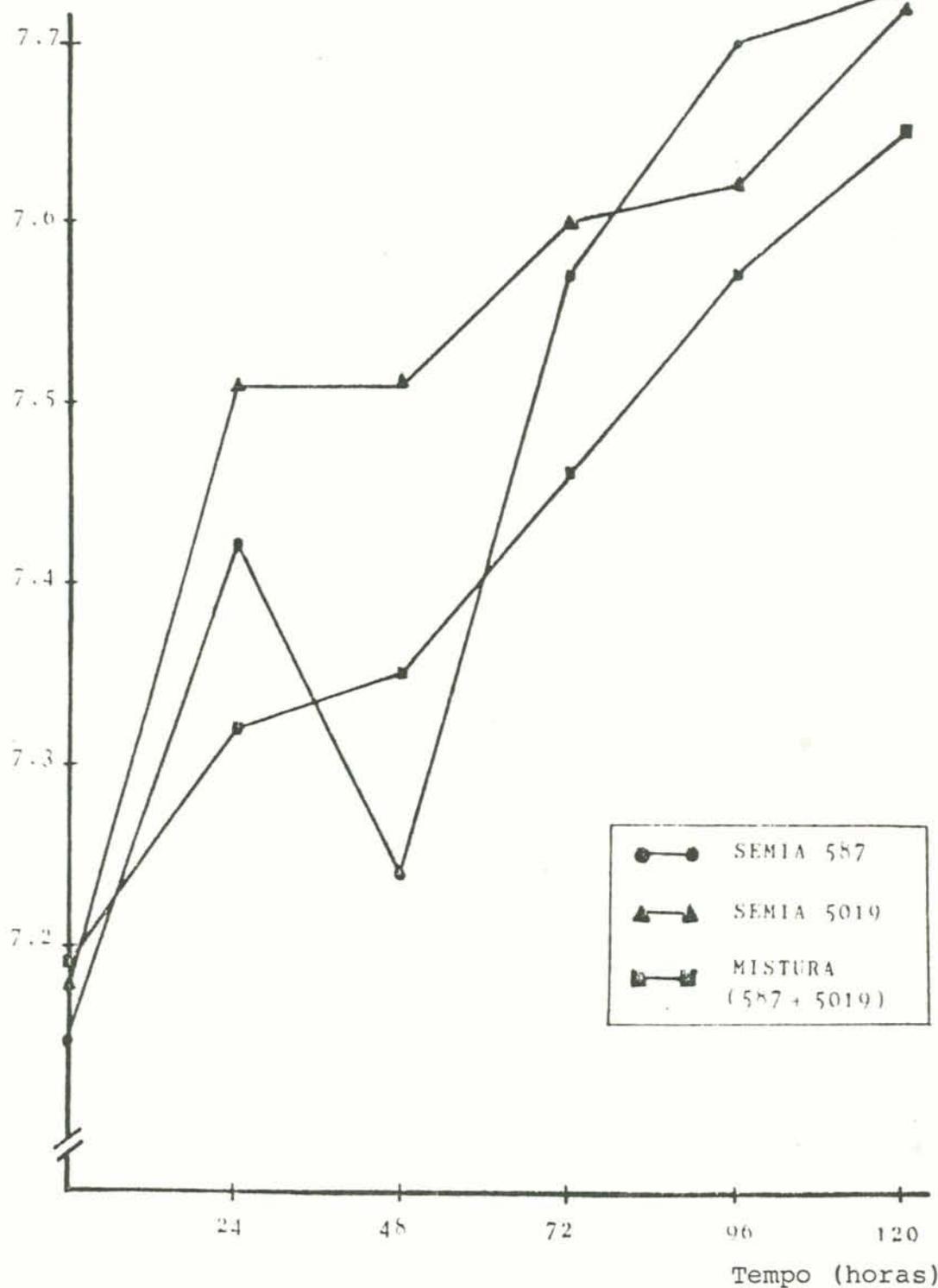


FIGURA 11 - Curvas de variação do pH em função do tempo de processamento para os tratamentos com a estirpe SEMIA 587, com a estirpe SEMIA 5019 e com a mistura (587+5019) de *Bradyrhizobium japonicum* em fermentador. Média de quatro repetições.

do processo. LOPRETO et alii (1975) notaram o mesmo comportamento para diversas cepas de *Rhizobium japonicum*, salientando o intervalo de pH entre 7,6 e 7,8 após 100 horas de processo.

A identificação sorológica das colônias no tratamento mistura das estirpes indicou que no decorrer da fermentação a estirpe SEMIA 587 sobrenumerou a estirpe SEMIA 5019. As percentagens de cada sorogrupo em função do tempo de desenvolvimento estão indicadas na Tabela 15. Não realizou-se análise no instante inicial (tempo 0) porque a concentração das duas estirpes foi ajustada em uma proporção de 1:1. Observa-se na Figura 12 que a estirpe SEMIA 587 aumenta sua proporção de 50 para 69,07% em 120 horas de processo, ao passo que a estirpe SEMIA 5019 diminuiu de 50 para 30,93%. O diagrama de barras mostra, para cada tempo de desenvolvimento, a relação percentual de cada estirpe. Cada barra corresponde a concentração celular num dado instante, sendo a parte escura a percentagem da estirpe SEMIA 5019 e a clara, da estirpe SEMIA 587. Esse diagrama mostra visualmente o aumento crescente, da estirpe SEMIA 587, descrito no Apêndice 31.

A diminuição percentual da ocorrência da estirpe SEMIA 5019, não significa que esta tenha reduzido sua concentração celular ao longo da fermentação, indica porém, que apresentou um desenvolvimento menor em relação a estirpe SEMIA 587. Provavelmente este efeito de sobrenumeração se deve ao fato da estirpe SEMIA 587 ser mais competitiva e

TABELA 15 - Número e percentagem de ocorrência das estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 nas colônias tipificadas, para os respectivos tempos de desenvolvimento, em fermentador.

TEMPO (h)	NÚMERO DE COLÔNIAS TIPIFICA- DAS	SOROGRUPOS				
		NÚMERO DE COLÔNIAS			%	
		SEMIA 587	SEMIA 5019	SEM REAÇÃO	SEMIA 587	SEMIA 5019
24	1066	565	498	3	53,15	46,85
48	694	366	320	8	53,35	46,65
72	614	356	254	4	58,36	41,64
96	940	610	328	2	65,03	34,97
120	1680	1157	518	5	69,07	30,93

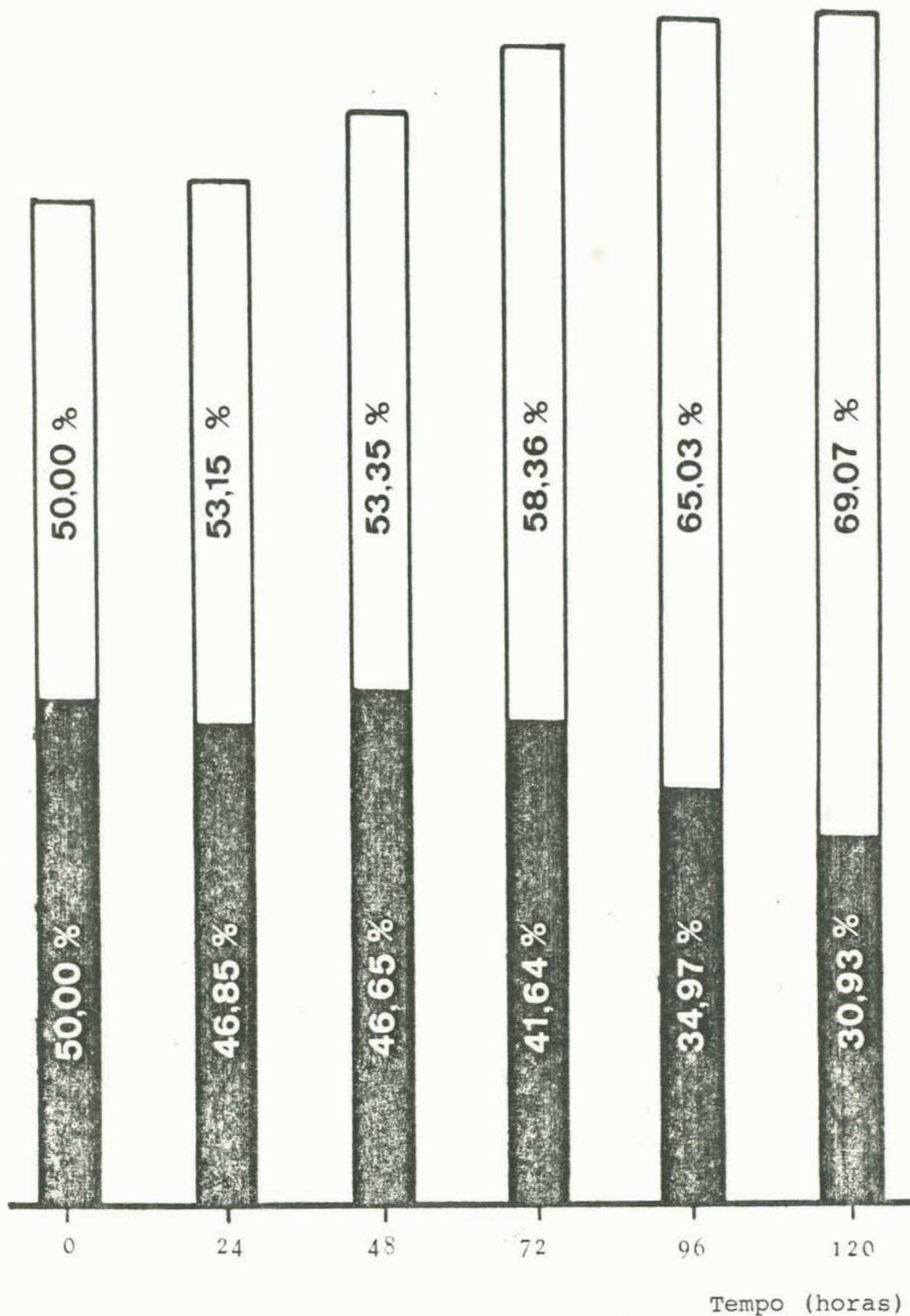


FIGURA 12 - Representação do logaritmo da concentração celular do tratamento mistura (587+5019) para os diferentes tempos de desenvolvimento em fermentador, indicando a percentagem da estirpe SEMIA 587 () em relação a estirpe SEMIA 5019 ().

mais eficiente no crescimento, ou ainda devido a formação de alguma substância inibidora para o crescimento da estirpe SEMIA 5019, também pode-se evidenciar a diferença significativa entre os tempos da geração das duas estirpes. Entretanto, como já foi observado anteriormente, a estirpe SEMIA 5019 apresentou um desenvolvimento inferior ao da estirpe SEMIA 587, mesmo quando desenvolvida isoladamente. No Apêndice 39 são mostrados os valores da concentração celular para cada estirpe em relação ao tratamento mistura, os valores estão expressos pelo logaritmo do número de células viáveis por mililitro. As curvas referentes a estes dados estão representadas na Figura 13. Observa-se que a curva do tratamento mistura difere significativamente das curvas correspondentes a estirpe SEMIA 587 e SEMIA 5019, entretanto, estas duas não diferem entre si. Outro ponto a ser levantado é que o comportamento das duas estirpes se mantem semelhante até atingir-se aproximadamente 55 horas de processo, a partir de então a estirpe SEMIA 587 desenvolve-se rapidamente enquanto que a estirpe SEMIA 5019 praticamente estabiliza seu crescimento.

4.4 Avaliação do potencial de fixação de nitrogênio e capacidade competitiva por sítios de nodulação

A efetividade simbiótica das estirpes foi determinada pelos parâmetros: produção de matéria seca na parte

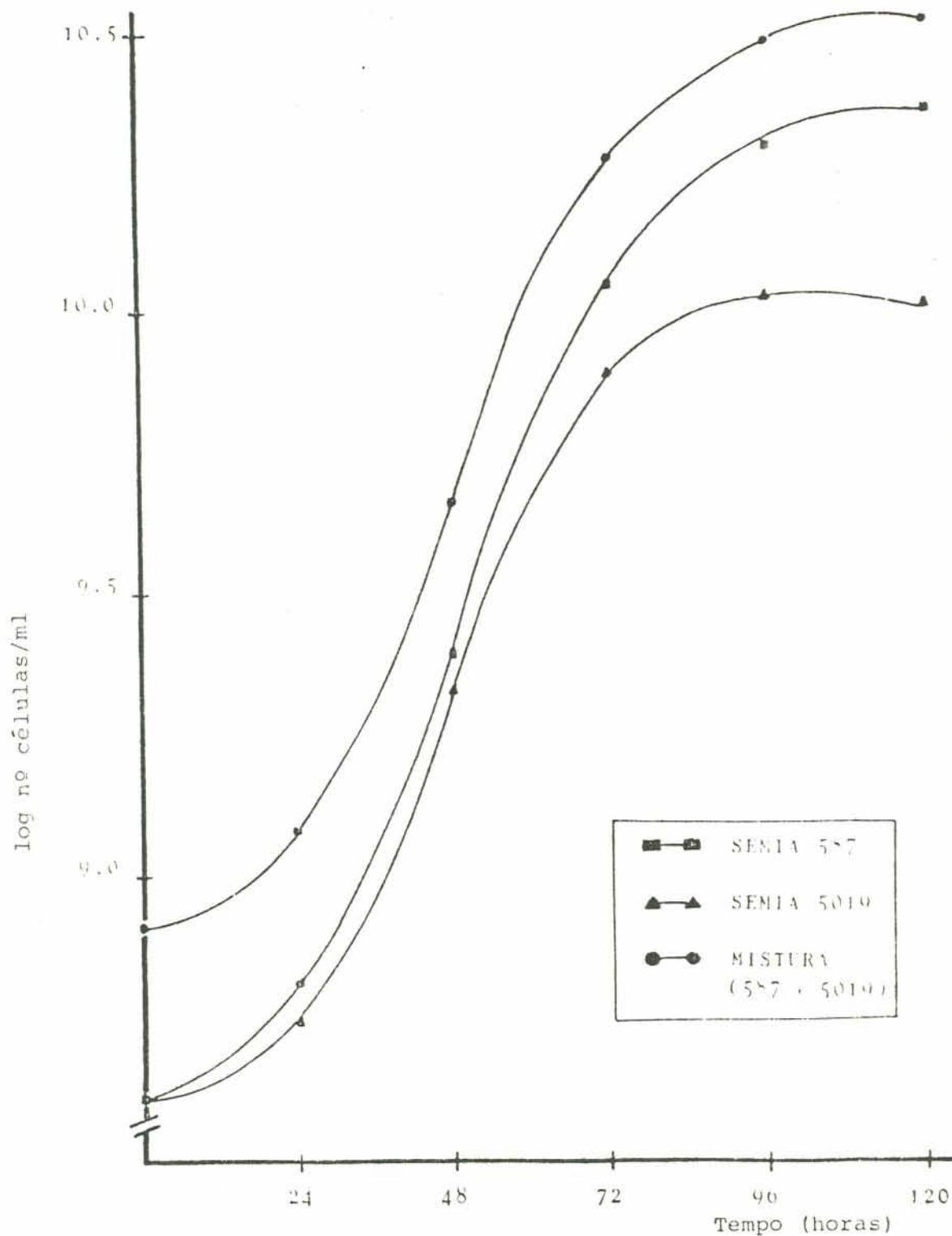


FIGURA 13 - Curvas de crescimento das estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 de *Bradyrhizobium japonicum* correspondentes ao percentual de cada uma em relação ao tratamento mistura (587+5019), em fermentador.

aérea, número de nódulos e peso de nódulos secos, sendo os dados médios apresentados na Tabela 16.

A capacidade das estirpes de fixar nitrogênio atmosférico, não correspondeu com a habilidade das mesmas de formar massa nodular. Estes resultados concordam com os obtidos por ANDRADE (1986), que trabalhou com diversas cepas de *Rhizobium leguminosarum* biovar, *trifolii*, e por PERES & VIDOR (1980), onde a estirpe de *Rhizobium japonicum* SEMIA 5020, mesmo nodulando razoavelmente bem, em quatro cultivares de soja, determinou baixo nitrogênio total e baixo peso de matéria seca nas plantas inoculadas.

O nitrogênio total apresentou alta correlação com o rendimento de matéria seca da parte aérea ($r = 0,9881$), concordando com os resultados obtidos por LOPES et alii (1976); OLIVEIRA (1982); PEREIRA (1983) e DIONISIO (1985). Entretanto, a correlação do peso de nódulos com esses parâmetros foi menor, $r = 0,7232$ para matéria seca e $r = 0,7723$ para o nitrogênio total; demonstrando, de certa maneira, que a avaliação das estirpes em fixar nitrogênio através do peso de nódulos (DOBEREINER et alii, 1966) pode induzir a alguns erros de interpretação. A correlação do número de nódulos com os demais parâmetros foi significativamente menor que as correlações anteriores, $r = 0,5647$ para o nitrogênio total, $r = 0,4824$ para o peso de nódulos e $r = 0,3670$ para a matéria seca.

Relacionando o número e o peso de nódulos, observa-se que para os tratamentos com as estirpes isoladas,

TABELA 16 - Número de nódulos, peso dos nódulos, rendimento de matéria seca da parte aérea e nitrogênio total na parte aérea de soja, da cultivar Bragg, inoculada com diferentes suspensões bacterianas das estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 de *Bradyrhizobium japonicum* em areia e solução nutritiva. Média de cinco repetições.

TRATAMENTOS	NÚMERO DE NÓDULOS POR VASO	PESO DOS NÓDULOS (mg/vaso)	MATÉRIA SECA (g/vaso)	NITROGÊNIO TOTAL (mg/vaso)
SEMIA 587	88 c*	296 ab	4,12 b	124 b
SEMIA 5019	130 ab	311 a	3,86 b	113 b
TF1**	151 a	282 ab	4,54 b	142 b
TP**	92 c	201 bc	4,28 b	126 b
TP2**	106 bc	254 ab	4,17 b	119 b
TP3**	95 c	120 c	2,64 bc	64 bc
SEM INOCULAÇÃO E SEM N ₂	0	0	1,27 c	16 c
SEM INOCULAÇÃO E COM N ₂	0	0	6,69 a	251 a

* Médias por coluna seguidas pela mesma letra não diferem significativamente ($P > 0,05$), pelo teste de Duncan. As análises de variância estão apresentadas nos Apêndices 41, 42, 43 e 44.

** Especificação dos tratamentos no Apêndice 9.

apesar de ter-se uma nodulação menos significativa com a estirpe SEMIA 587 (88 nódulos por vaso), esta apresentou rendimento de 3,36 mg por nódulo, enquanto que a estirpe SEMIA 5019 obteve 2,39 mg por nódulos. Este fato ressalta a melhor eficiência da estirpe SEMIA 587 em relação a SEMIA 5019, justificando também os resultados obtidos para a matéria seca e o nitrogênio total nesses dois tratamentos. Esses resultados mostram, também, que o número de nódulos não é um bom parâmetro para indicação da eficiência de fixação do nitrogênio, assemelhando-se as observações feitas por outros pesquisadores (RIBEIRO et alii, 1986; VIDOR et alii, 1972 e MOROTE, 1989).

Nos dados médios referentes à matéria seca da parte aérea, os maiores resultados corresponderam ao tratamento testemunha nitrogenada e ao tratamento com a mistura TF1 (69,07% da estirpe SEMIA 587 e 31,93% da estirpe SEMIA 5019) com 6,69 e 4,54 g de matéria seca por vaso, respectivamente. Os menores valores foram obtidos com o tratamento testemunha não nitrogenada e com a mistura TP3 (30% da estirpe SEMIA 587 e 70% da estirpe SEMIA 5019). Em relação aos tratamentos com as estirpes isoladas, apesar de não ter sido observado diferença estatisticamente significativa, houve um maior rendimento na inoculação com a estirpe SEMIA 587 do que com a SEMIA 5019. Com a estirpe SEMIA 587 obteve-se 4,12 g de matéria seca por vaso e com a estirpe SEMIA 5019, 3,86 g de matéria seca por vaso. Pode-se observar, na Tabela 16, que o rendimento de matéria seca entre os trata-

mentos com as estirpes isoladas e nas misturas (TF1, TP1, TP2 e TP3), não apresentou diferença significativa quando analisado estatisticamente. Entretanto, avaliando-se o comportamento dos resultados numéricos, nota-se que os bons pesos de matéria seca obtidos no tratamento com a mistura TF1 devem estar relacionados com a eficiência competitiva da estirpe SEMIA 587 e também com o fato dessa mistura ter sido obtida através de uma fermentação em conjunto. Nota-se, também, que aumentando a concentração da estirpe SEMIA 587 de 30 para 70% nos tratamentos TP3, TP2 e TP1 respectivamente (obtidos sem ter havido um crescimento conjunto em fermentador, com a estirpe SEMIA 5019), aumenta também o rendimento de matéria seca de 2,64 para 4,28 g por vaso.

Analisado os dados sobre nitrogênio total no tecido (Tabela 16), verifica-se que esses apresentaram um comportamento semelhante aos da matéria seca em relação aos tratamentos efetuados. Os tratamentos com as estirpes isoladas e com as misturas TF1, TP1, TP2 e TP3 não diferiram significativamente entre si, somente com os tratamentos testemunhas (nitrogenado e não nitrogenado). Apenas a mistura TP3 (30% SEMIA 587 + 70% SEMIA 5019) apresentou semelhança significativa com a testemunha não nitrogenada. As diferenças no potencial das estirpes em fixar nitrogênio podem ser explicadas pelas características da própria estirpe de rizóbio, como a taxa de fixação ou o período real de fixação do nitrogênio (VOSS, 1981).

Como já foi visto anteriormente, o tratamento com a

mistura TF1 obteve os melhores resultados para matéria seca e nitrogênio total (excluindo o tratamento testemunha nitrogenado), contudo esse tratamento teve uma baixa relação entre o peso e o número de nódulos (1,87 mg por nódulo).

A identificação sorológica dos nódulos (Tabela 17) indicou que a maioria foi induzida pela estirpe SEMIA 587, que ocupou um mínimo de 42,21% no tratamento com a mistura TP3 e um máximo de 97,67% com a mistura TF1, enquanto que a estirpe SEMIA 5019 obteve um máximo de 57,79% com a mistura TP3. A alta percentagem de ocupação dos nódulos pela estirpe SEMIA 587, no tratamento TF1, explicaria a semelhança de rendimentos de matéria seca e nitrogênio total ao obtido com a inoculação individualizada da estirpe SEMIA 587. Pode-se observar, também na Tabela 17, que existe uma relação entre a concentração das estirpes nos inóculos e o efeito de nodulação. Ocupações de 75% dos nódulos, segundo SINGLETON e STOCKINGER (1983) citado por MOROTE (1989), pela estirpe efetiva é suficiente para proporcionar até 95% de acumulação de nitrogênio pela planta. Comparando-se os resultados dos tratamentos TF1 e TP1, a percentagem da estirpe SEMIA 587 foi superior no primeiro, provavelmente devido ao fato deste inóculo ter sido produzido em uma fermentação conjunta, possibilitando uma maior adaptabilidade da estirpe SEMIA 587 sobre a estirpe SEMIA 5019.

A presença de mais de um sorogrupo de rhizóbio no mesmo nódulo, tem sido demonstrada por vários trabalhos (BROCKWELL et alii, 1977; BROMFIELD & JONES, 1980; PEREIRA,

TABELA 17 - Número e percentagem de ocorrência das estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* nos nódulos de soja, da cultivar Bragg, semeada em areia e caldo nutritivo, em resposta à inoculação com as estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 individualmente e com a mistura destas (TF1, TP1, TP2 e TP3).

TRATAMENTOS	NÚMERO DE NÓDULOS TIPIFICADOS	SOROGRUPOS				
		OCUPAÇÃO DOS NÓDULOS			%	
		SEMIA 587	SEMIA 5019	SEM REAÇÃO	SEMIA 587	SEMIA 5019
SEMIA 587	124	114	0	10	100,0	0,0
SEMIA 5019	51	0	43	8	0,0	100,0
TF1*	103	84	2	15	97,7	2,3
TP1*	140	108	24	7	81,8	18,2
TP2*	312	176	122	14	59,1	40,9
TP3*	165	65	89	11	42,2	57,8

* Especificação dos inóculos nos tratamentos TF1, TP1, TP2 e TP3, encontra-se no Apêndice 9.

1983; LOVATO, 1984 e LINDEMANN et alii, 1974), entretanto não foram considerados nos cálculos pois a percentagem de infecções múltiplas foi muito pequena, na ordem de 1,9% com a mistura TP1. Os demais tratamentos não apresentaram esse tipo de comportamento.

A mistura TF1, se não for considerada a análise estatística, foi o tratamento que apresentou maior efetividade, mas foi menos significativo na formação de nódulos. A estirpe SEMIA 587 apresentou uma boa competitividade quando misturada com a estirpe SEMIA 5019, e uma boa capacidade de fixar nitrogênio tanto isoladamente quanto em mistura (Tabela 16 e 17). Estatisticamente os tratamentos TF1, TP1, TP2 e TP3 não apresentaram diferenças significativas quanto ao peso de matéria seca e ao nitrogênio total.

4.5 Avaliação da sobrevivência e competição em turfa esterilizada

A capacidade de absorção de água, na turfa já tratada, foi de aproximadamente 65%, tanto utilizando-se o método proposto por SOMASEGARAN & HOBEN (1985), ou pelo método empírico descrito no Apêndice 12. Através deste resultado e do valor da umidade contida na turfa (9,8%) determinou-se o volume de inóculo necessário para se obter uma umidade final próxima à 40%. Outro parâmetro importante a ser discutido, é a perda de umidade do inoculante armazenado. A Figura 14 mostra uma curva que relaciona esse parâmetro com

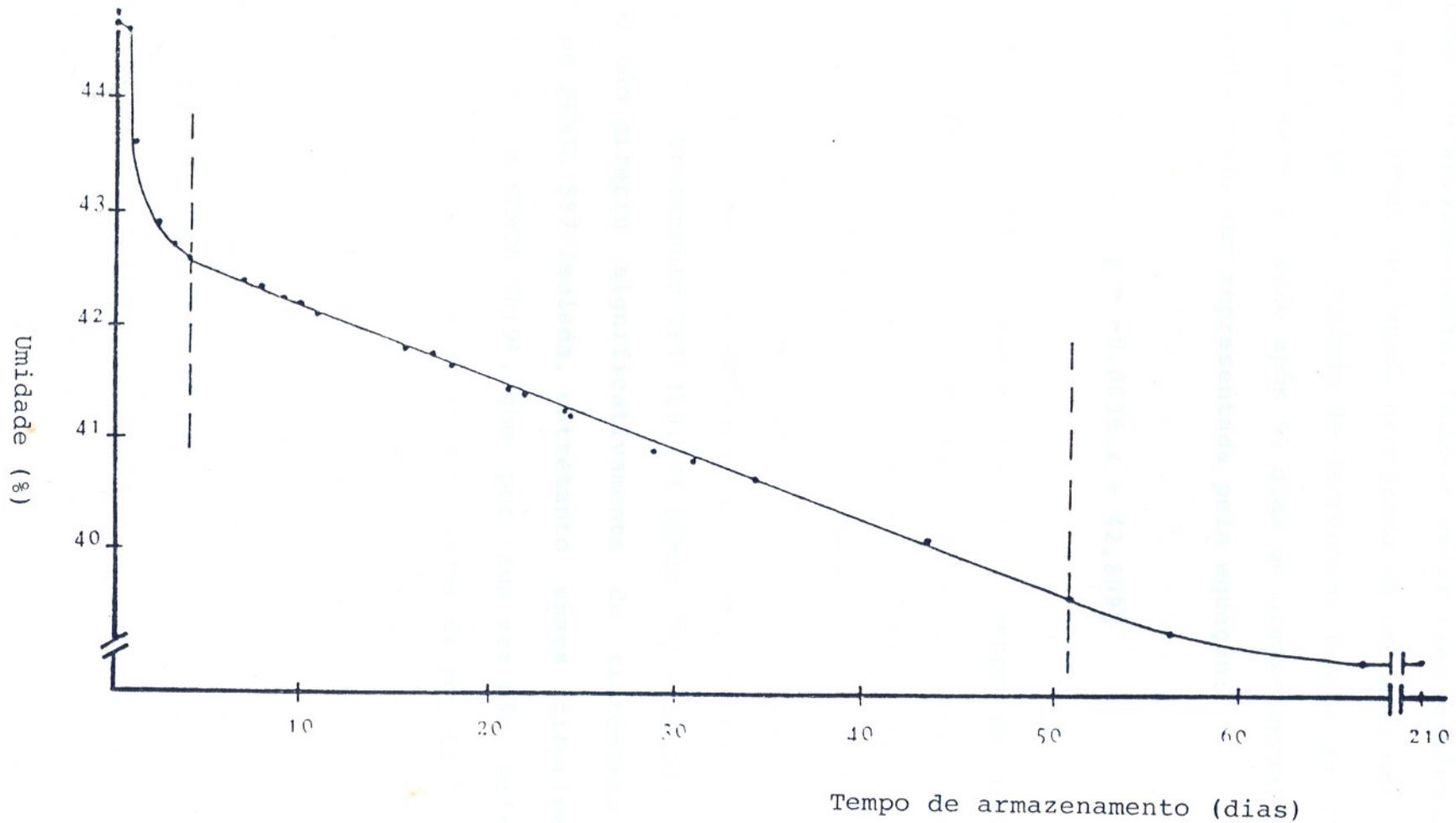


FIGURA 14 - Curva representativa da perda de umidade em função do tempo de armazenamento, à temperatura ambiente, do inoculante à base de turfa esterilizada.

o tempo de armazenamento. Pode-se notar três regiões distintas nessa curva: uma queda acentuada da umidade nos quatro primeiros dias, um período de decréscimo linear de 47 dias e uma de estabilização após 51 dias de armazenamento. A fase linear pode ser representada pela equação:

$$y = -0,0636.x + 42,8092$$

onde y é a umidade em percentagem e x o tempo de armazenamento em dias. Para os dados analisados obteve-se uma correlação bastante significativa ($r = 0,9989$), acarretando em uma perda de umidade semanal de 0,381%.

Os dados de sobrevivência do rhizóbio em turfa estéril encontram-se no Apêndice 45 e estão plotados na Figura 15. O tratamento TF1 (69,07% SEMIA 587 + 30,93% SEMIA 5019) não diferiu significativamente do tratamento com a estirpe SEMIA 587 isolada, entretanto esses diferiram dos demais (TP2 e SEMIA 5019), que por sua vez não diferiram entre si. Os declínios mais acentuados da população de *B. japonicum* foram obtidos no tratamento com a estirpe SEMIA 5019 e com o inóculo TP2, observando-se em 180 dias, um decréscimo em relação à população inicial de 89 e 82% respectivamente. O tratamento TF1 decresceu 46%, enquanto a estirpe SEMIA 587 ocasionou apenas um decréscimo de 37%. Contudo, nenhum dos tratamentos mostrou um declínio drástico na população, e a menor concentração celular obtida foi de $3,5 \times 10^8$ cel/g para o tratamento com a estirpe SEMIA 5019.

Como consequência, a taxa de multiplicação não é muito inferior à taxa de mortalidade, provocando declínios pouco acentuados da população microbiana.

Considerando-se ainda a Figura 15, observa-se que para todos os tratamentos, de um modo geral, ocorre um aumento na concentração celular no primeiro mês de incubação, um decréscimo acentuado nos dois meses seguintes e um decréscimo suave durante os outros três meses. A estirpe SEMIA 587 foi a que mais aumentou a população no primeiro mês de armazenagem, sendo este comportamento visivelmente significativo.

Para melhor avaliação desses resultados, os dados foram representados na Tabela 18 sob a forma de taxa semanal de mortalidade. Comparando-se esses resultados com os obtidos por FREIRE & JONES (1964), FREIRE & JONES (1963), VINCENT (1958) e DATE (1976), verifica-se que a taxa de mortalidade para os tratamentos TP2 e SEMIA 5019 foram significativamente maiores que os retratados na literatura. Entretanto, os valores da taxa de mortalidade (κ) para os tratamentos TF1 e SEMIA 587 foram bastante condizentes com os obtidos pelos pesquisadores anteriormente citados.

Os resultados da taxa de mortalidade acentuam o comportamento, já mencionado, da estirpe SEMIA 5019, ou seja, esta apresentou um maior declínio no número de células por grama de inoculante do que os outros tratamentos. Segundo DANSO & ALEXANDER (1974) estas diferenças podem estar relacionadas com possíveis efeitos protetores exercidos pe-

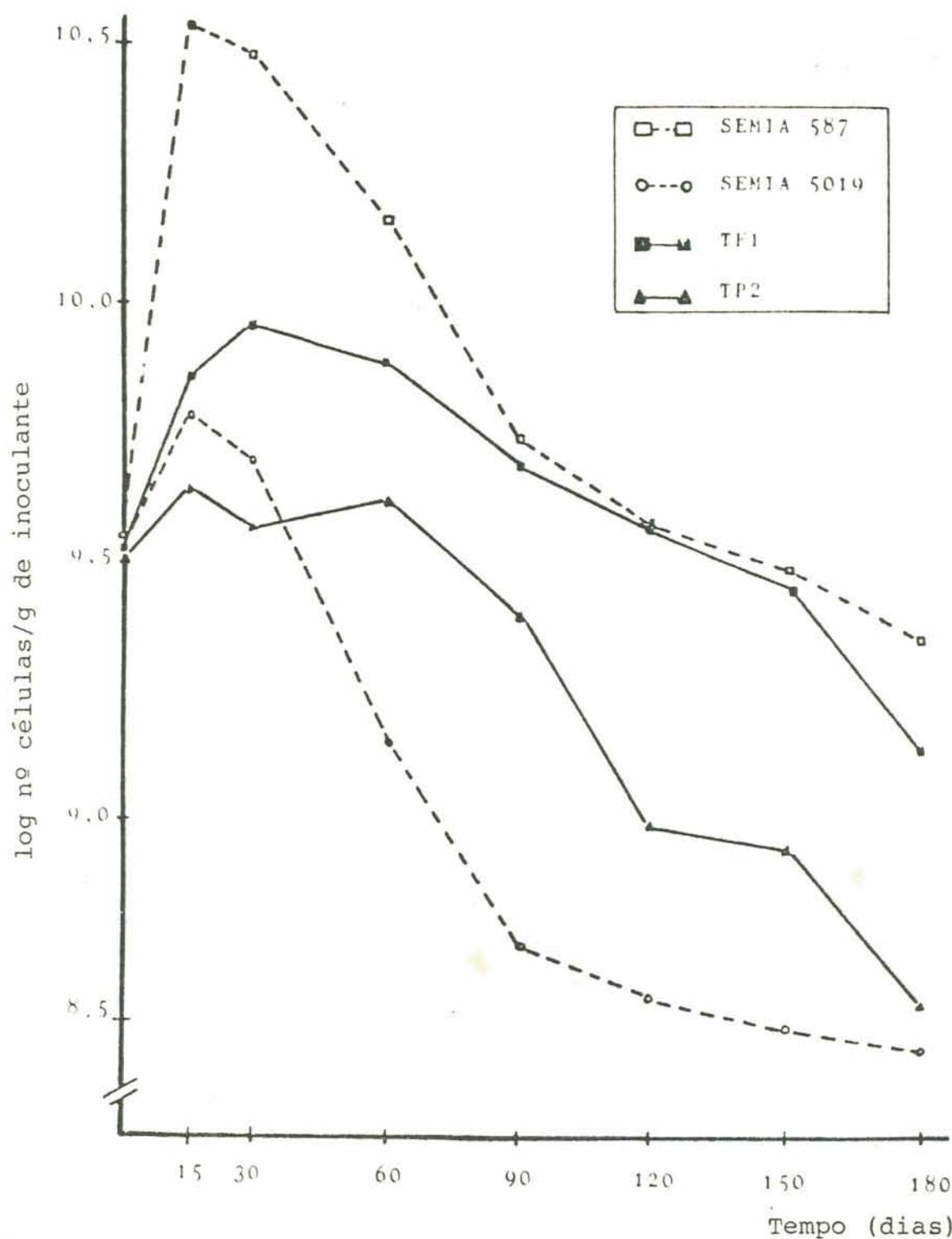


FIGURA 15 - Curvas de sobrevivência de *Bradyrhizobium japonicum* em turfa esterilizada, impregnada com os tratamentos TF1, (69% SEMIA 587 + 31% SEMIA 5019) TP2 (50% SEMIA 587 + 50% SEMIA 5019) e com as estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 isoladamente. Média de quatro repetições.

la turfa sobre a sobrevivência do *Bradyrhizobium*, em função do seu alto percentual de matéria orgânica.

Os dados referentes à competição das estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 nos tratamentos TF1 e TP2 estão representados nas Tabelas 19 e 20, nas Figuras 16, 17, 18 e 19 e nos Apêndices 49 e 50.

Em relação ao tratamento TF1, observou-se que a estirpe SEMIA 587 praticamente dominou a concentração celular no inoculante, após os seis meses de incubação. No tratamento TP2, essa estirpe também sobrenumerou a estirpe SEMIA 5019, porém não tão significativamente como no tratamento TF1. O percentual de cada estirpe em cada período de incubação está mostrado nas Figuras 16 e 17, sobre a forma de diagrama de blocos. A estirpe SEMIA 5019 apresentou um decréscimo de 82% na sua concentração celular para o tratamento TF1 e de 88% no tratamento TP2. Aparentemente essa avaliação contradiz o que foi citado anteriormente, entretanto apesar de ter ocorrido um maior declínio da concentração no tratamento TP2, a relação entre esta estirpe (SEMIA 5019) e a SEMIA 587 não é significativa (Tabela 19). Foi bastante similar, o comportamento das curvas de sobrevivência (Figuras 18 e 19) para as estirpes consideradas isoladamente, em relação à curva total dos respectivos tratamentos. Isso significa que além da competição já demonstrada, existe uma adequação das estirpes ao meio (turfa) e também ao próprio efeito competitivo.

Pode-se, a partir dos resultados sobre a competição

TABELA 18 - Taxa semanal de mortalidade (κ) dos inoculantes com *Bradyrhizobium japonicum* para os tratamentos com as estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 isoladamente, e as misturas TF1 (69% SEMIA 587 + 31% SEMIA 5019) e TP2 (50% SEMIA 587 + 50% SEMIA 5019). Média de quatro repetições.

TRATAMENTOS	TAXA DE MORTALIDADE (semanas ⁻¹)
SEMIA 587	0,033 b*
SEMIA 5019	0,161 a
TF1	0,044 ab
TP2	0,125 ab

* Os valores seguidos com a mesma letra não diferem significativamente ($P > 0,05$) de acordo com a prova de amplitude múltipla de Duncan. A análise de variância encontra-se no Apêndice 46.

TABELA 19 - Percentagem de ocorrência das estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 de *Bradyrhizobium japonicum* nas colônias tipificadas para o tratamento TF1 (69% SEMIA 587 + 31% SEMIA 5019) nos respectivos períodos de incubação.

PERÍODO DE INCUBAÇÃO (dias)	NÚMERO DE COLÔNIAS TIPIFICADAS	SOROGRUPOS				
		NÚMERO DE COLÔNIAS			%	
		SEMIA 587	SEMIA 5019	SEM REAÇÃO	SEMIA 587	SEMIA 5019
0	974	680	291	3	70,03	29,97
15	768	543	220	5	71,17	28,83
30	716	520	189	7	73,34	26,66
60	1044	813	224	7	78,40	21,60
90	1168	988	174	6	85,03	14,97
120	922	817	100	5	89,09	10,91
150	1002	888	107	7	89,25	10,75
180	810	719	82	9	89,76	10,24

TABELA 20 - Percentagem de ocorrência das estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 de *Bradyrhizobium japonicum* nas colônias tipificadas para o tratamento TP2 (50% SEMIA 587 + 50% SEMIA 5019) nos respectivos períodos de incubação.

PERÍODO DE INCUBAÇÃO (dias)	NÚMERO DE COLÔNIAS TIPIFICADAS	SOROGRUPOS				
		NÚMERO DE COLÔNIAS			%	
		SEMIA 587	SEMIA 5019	SEM REAÇÃO	SEMIA 587	SEMIA 5019
0	880	442	438	0	50,23	49,77
15	840	442	396	2	52,74	47,26
30	818	472	345	1	57,77	42,23
60	1148	696	447	5	60,89	39,11
90	654	412	240	2	63,19	36,81
120	778	497	280	1	63,96	36,04
150	1310	841	466	3	64,35	35,65
180	1004	653	348	3	65,23	34,77

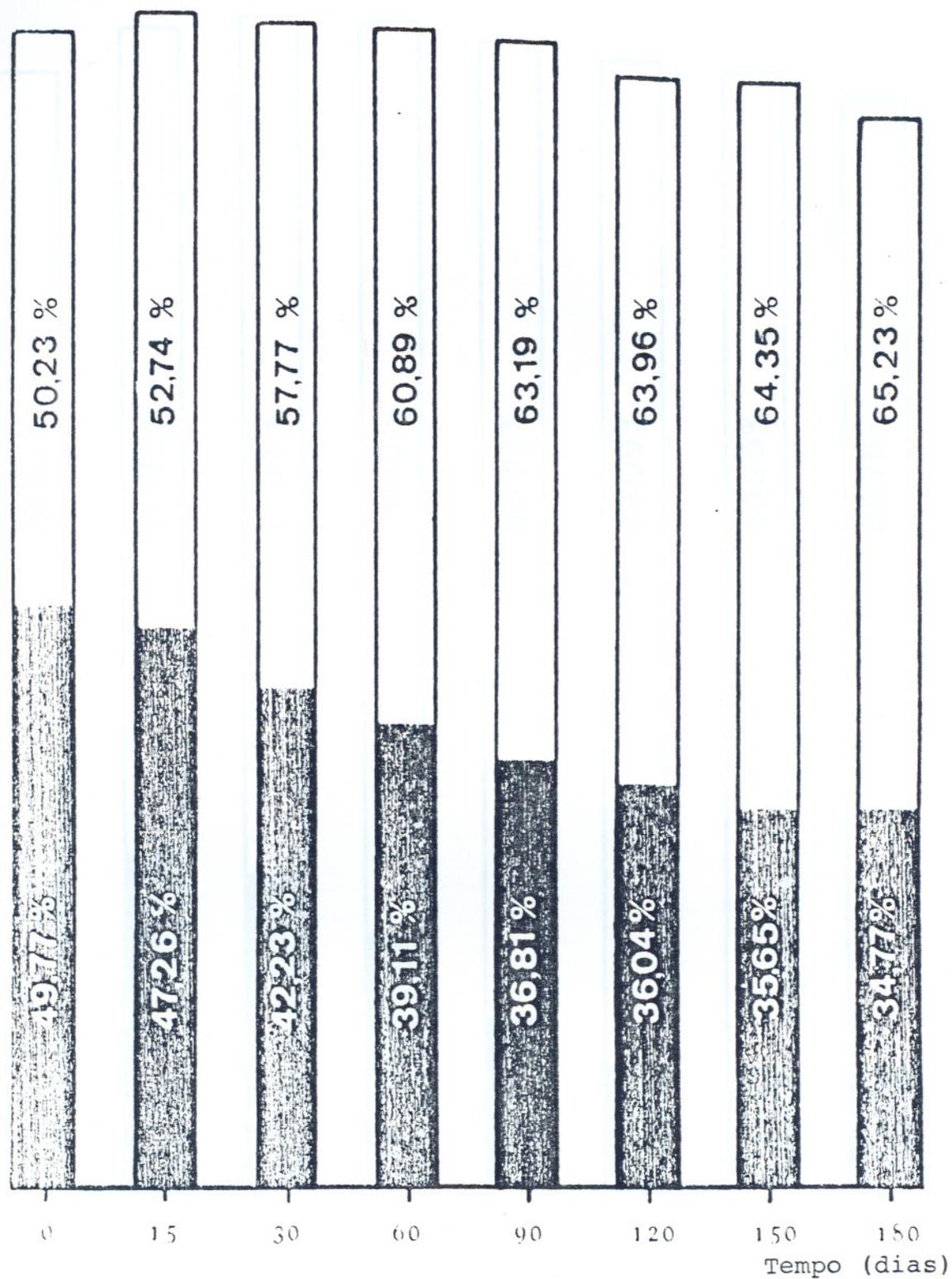


FIGURA 16 - Representação do logaritmo da concentração celular do tratamento TP2 para os diferentes períodos de incubação, indicando a percentagem da estirpe SEMIA 587 (□) em relação à estirpe SEMIA 5019 (▨).

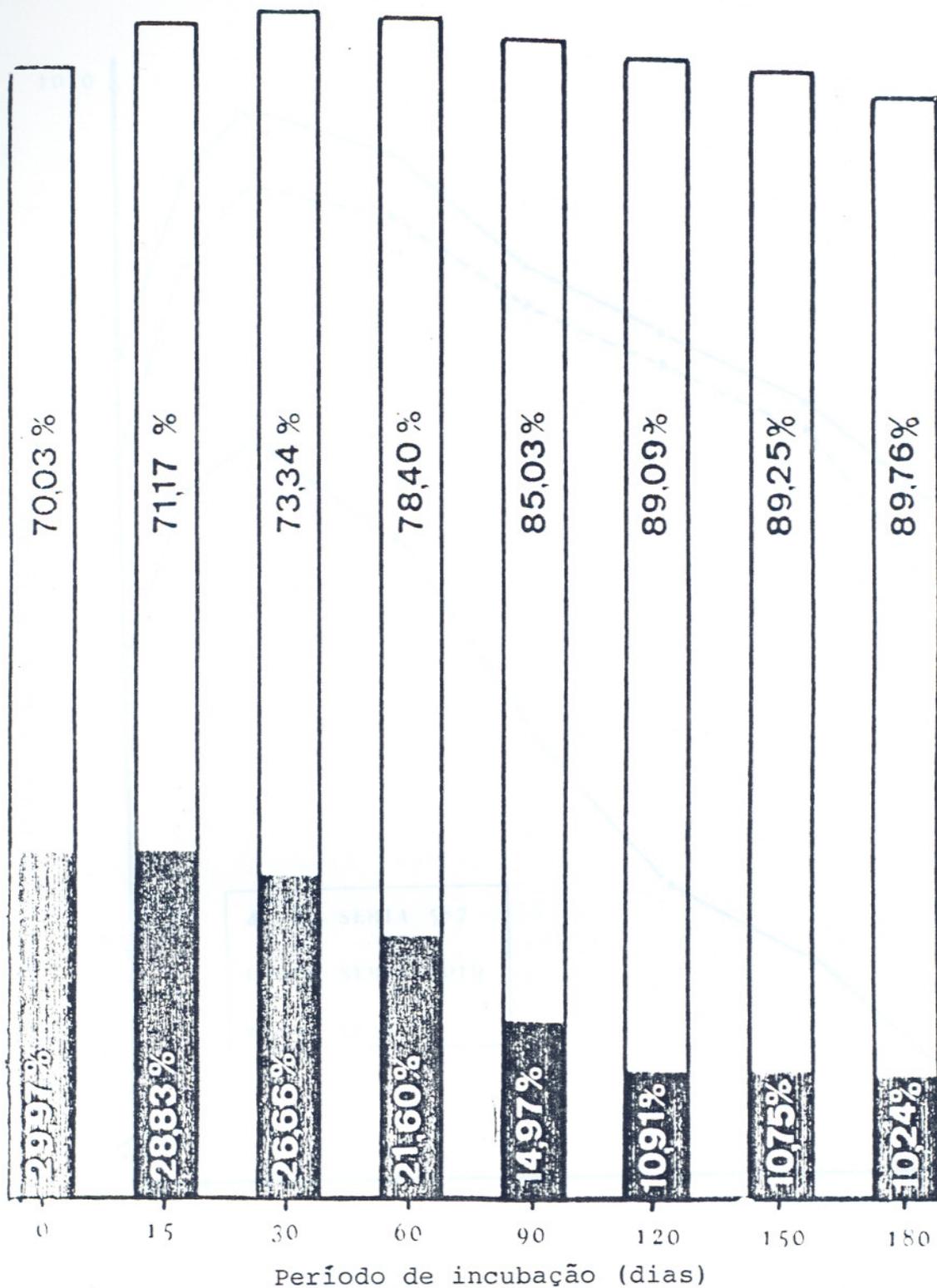


FIGURA 17 - Representação do logaritmo da concentração celular do tratamento TF1 para os diferentes períodos de incubação, indicando a percentagem da estirpe SEMIA 587 (□) em relação à estirpe SEMIA 5019 (■).

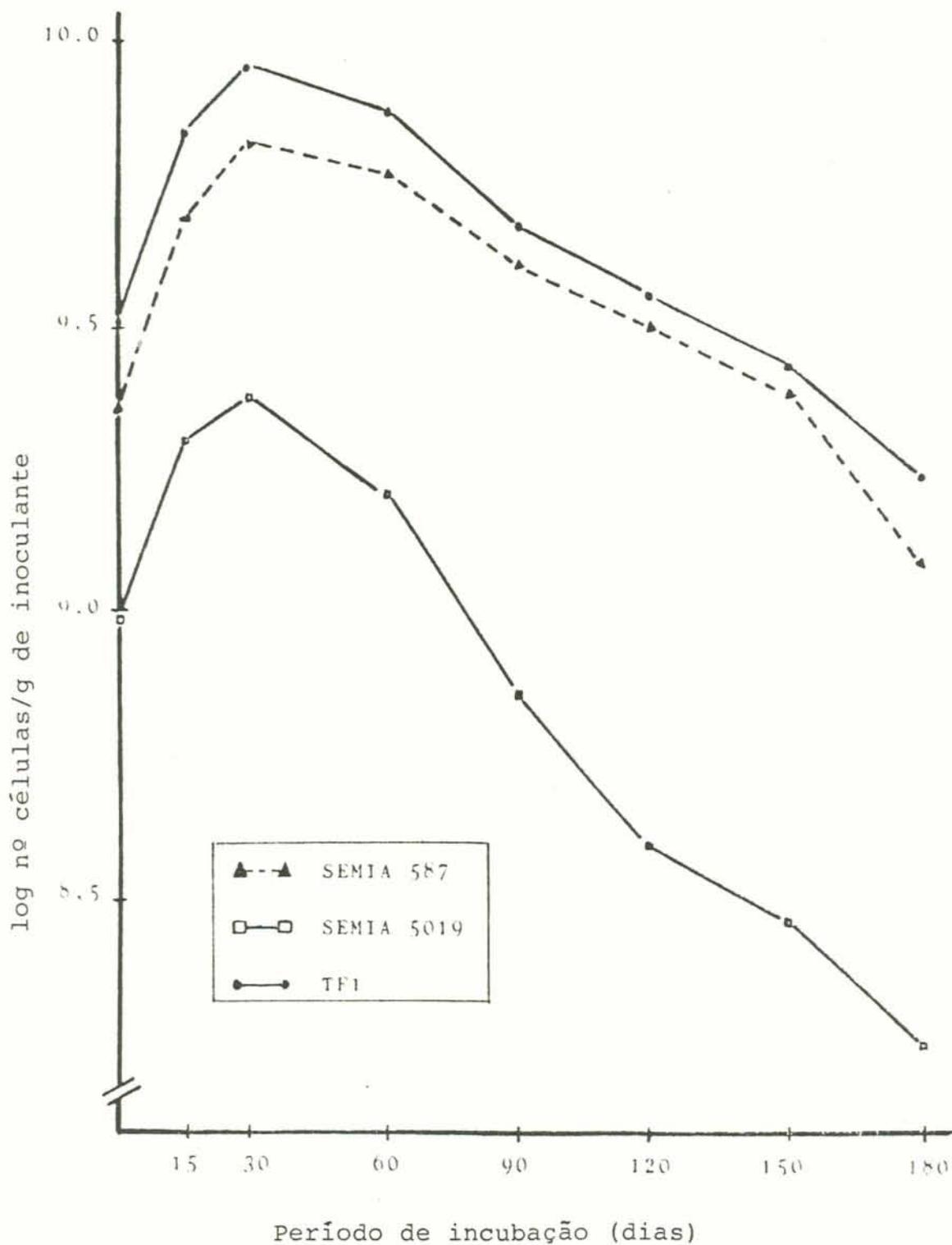


FIGURA 18 - Curvas de sobrevivência das estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 de *Bradyrhizobium japonicum* correspondentes ao percentual de cada uma em relação ao tratamento TF1 (69% SEMIA 587 + 31% SEMIA 5019).

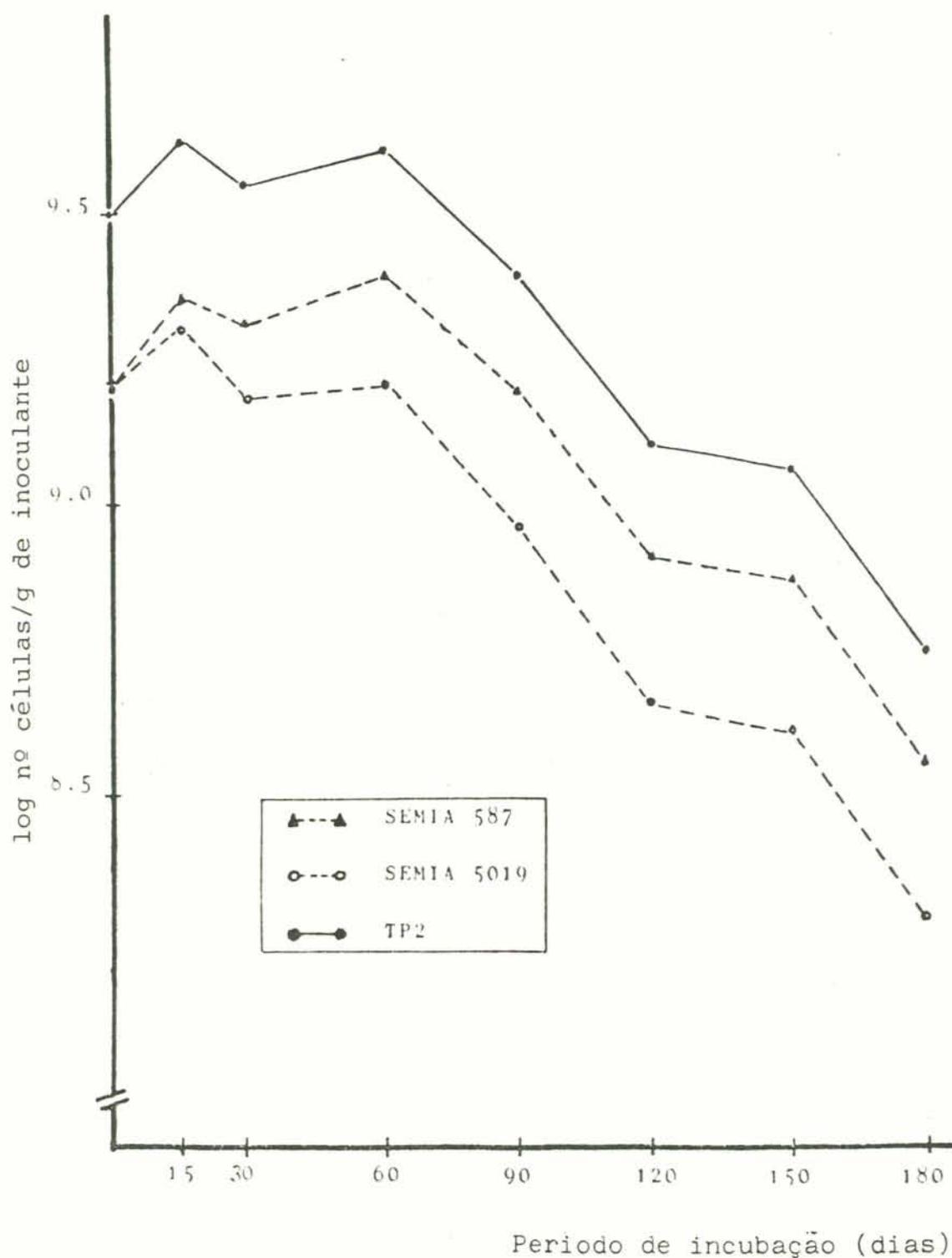


FIGURA 19 - Curvas de sobrevivência das estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 de *Bradyrhizobium japonicum* correspondentes ao percentual de cada uma em relação ao tratamento TP2 (50% SEMIA 587 + 50% SEMIA 5019).

no inoculante, justificar os valores encontrados para a taxa de mortalidade (Tabela 18). Como a estirpe SEMIA 587 predominou no tratamento TF1, este apresentou um valor de próximo ao da estirpe SEMIA 587 quando inoculada isoladamente. No tratamento TP2, essa estirpe também predominou, porém a diferença entre ela e a estirpe SEMIA 5019 foi bem menor, prevalecendo, então, o comportamento desta última estirpe. Logo a avaliação da taxa de mortalidade é significativa na análise da sobrevivência de *Bradyrhizobium* em turfa estéril.

Um outro ponto importante, a ser comentado, foi a eficiência da tindalização como método de esterilização da turfa. O uso desta técnica proporcionou uma perda, por contaminação, inferior a 1% (dos inoculantes produzidos).

5 CONCLUSÕES

Com base nos resultados e nas condições em que a pesquisa foi conduzida, pode-se concluir que:

1. O melhor desenvolvimento celular para a estirpe SEMIA 587 de *Bradyrhizobium japonicum*, ocorreu quando utilizou-se 28°C como temperatura de operação e 230 rpm como velocidade de agitação.
2. Aumentando-se a velocidade de agitação até 250 rpm ocorreu um acréscimo no crescimento celular da estirpe SEMIA 587 em fermentador, sendo que acima deste valor de agitação o crescimento é reduzido significativamente.
3. Acima e abaixo de 28-30°C, o crescimento celular da estirpe SEMIA 587 é prejudicado, diminuindo conseqüentemente a produção de biomassa.
4. Os valores da taxa de crescimento (μ), da produtividade máxima (P_m) e da velocidade específica máxima (μ_m) apresentaram a mesma tendência do crescimento celular tanto com a variação da agitação quanto com a variação da temperatura. O tempo de geração (G) e tempo de duração da fase exponencial apresentaram, por sua vez, um comportamento inverso.
5. A variação da temperatura afetou mais significativamente

o crescimento celular da estirpe SEMIA 587, no processo fermentativo, do que a variação da velocidade de agitação.

6. Tanto com o aumento da velocidade como com o aumento da temperatura, ocorre uma alcalinização mais rápida do meio fermentativo.
7. Existe uma boa correlação entre os valores obtidos para o logaritmo da concentração celular, o pH e a velocidade de agitação.
8. Existe, também, uma boa correlação entre os valores experimentais do logaritmo da concentração celular, o pH e a temperatura de operação.
9. O crescimento conjunto das estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 em caldo nutritivo é favorável à estirpe SEMIA 587 (70% da concentração celular em 120 horas de processo).
10. As condições ótimas de temperatura e agitação, para a estirpe SEMIA 587, aparentemente não são as mais indicadas para o crescimento da estirpe SEMIA 5019.
11. Em relação a competição por sítios de nodulação, a estirpe SEMIA 587 foi mais competitiva, ocorrendo em 42-98% dos nódulos, em relação a 2-58% de ocupação pela estirpe SEMIA 5019, em todos os tratamentos mistos, apesar que no tratamento TP2 (50% de cada uma das estirpes) e no tratamento TP3 (70% da estirpe SEMIA 5019 e 30% da estirpe SEMIA 587) as diferenças não foram estatisticamente significativas.
12. Os pesos de nódulos secos, da matéria seca da parte aé-

rea e do nitrogênio total do tecido foram superiores nos tratamentos inoculados com a mistura das estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019, obtida no fermentador após 120 horas de processo, sendo que estatisticamente todos os tratamentos mistos com execução do TP3 apresentaram valores superiores aos das estirpes inoculadas isoladamente.

13. Aos seis meses, o inoculante de *B. japonicum*, elaborado com turfa esterilizada e conservado à temperatura ambiente, apresentou número suficiente de células, superando a população mínima de $1,0 \times 10^7$ células/g de inoculante, requerida por lei.
14. A estirpe SEMIA 587 predominou mais no inoculante, do que a estirpe SEMIA 5019, atingindo até 90% da concentração celular no tratamento mistura obtido no fermentador após 120 horas de operação.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOUTBOUL, H.; KERZNER, A.L.; SCHMIDELL, W. 1988. Modelo matemático para fermentação alcoólica - Análise de parâmetros. *Revista Brasileira de Engenharia Química*, São Paulo, 11: 35-42.
- AIBA, S.; HUMPHREY, A.E.; MILLIS, N.F. 1973. *Biochemical Engineering*. 2. ed. New York, Academic Press. 434p.
- ALLISON, F.E. & MINOR, F.W. 1940. *J. Bact.*, London, 39: 365-371.
- ALVAREZ, A. 1984. *Producción de inoculantes*. Curso Regional sobre Producción, Control de Calidad y Uso de Inoculantes para Leguminosas. Montevideo. 20p.
- ANDRADE, D.S. 1986. *Seleção de estirpes de Rhizobium leguminosarum BIOVAR trifolii para Trifolium riograndense BURKART*. 93p. Dissertação (Mestr. Agro. - Solos) Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, 1986.
- ANDREYEVA, L.N. & BIRYUKOV, V.V. 1973. Analysis of Mathematical Models of the Effect of pH on Fermentation Processes and their use for Calculating Optimal Fermentation Conditions. *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, New York, 4: 61-76.
- ARAÚJO, S.C. 1985. Problems concerning production and use of inoculants in Brazil. In: FREIRE, J. & FALCÃO, P.C.B., Eds. *Proceedings of the workshop on Rhizobium/legume inoculants*. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. p. 31-35.
- ASTURIAS, R.C. 1989. *Utilização de aditivos em inoculantes à base de turfa não esteril de Bradyrhizobium japonicum estirpe SEMIA 587*. 125p. Dissertação (mestr. Agro. - Solos) Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, 1989.
- AYANABA, A. 1977. Toward better use of inoculants in the humid tropics. In: AYANABA, A. & DART, R.J., Eds. *Biological nitrogen fixation in farming systems of the Tropics*. Cichester, John Wiley. p. 181-187.
- BAJPAI, P.D.; GUPTA, B.R.; BALI, R. 1978. Studies on survival of *Rhizobium leguminosarum* as affected by moisture and temperature conditions. *Indian. J. Agric. Res.*, 12: 39-43.

- BAKER, K. 1978. Design, construction, and operation of some all-glass pilot-plant fermentors. *Biotechnol. Bioeng.*, New York, 20: 1345-1375.
- BALATTI, A.P. 1976. *Producción de inoculantes*. La Plata, Centro de Investigaciones y Desarrollo de Fermentaciones Industriales. Facultad de Ciencias Exactas. 32p. (Publicação Interna).
- _____. 1981. Culturing *Rhizobium* in large-scale fermentors. *BNF Technology for Tropical Agriculture*, p. 127-132.
- _____. 1985. Inoculants production. In: Workshop on *Rhizobium/legume inoculants*, Porto Alegre. Paper... Porto Alegre, UNEP/UNESCO/FAO/MIRCEN. p. 157-177.
- BALATTI, A.P. & MAZZA, L.A. 1979. Obtención de inoculantes para soja. *Rev. Arg. de Microbiol.*, La Plata, 11: 83-88.
- BANDYOPADHYAY, B.; HUMPHREY, A.E.; TAGUCHI, H. 1967. Dynamic measurement of the volumetric oxygen transfer coefficient in fermentation systems. *Biotechnol. Bioeng.*, New York., 9: 533-544.
- BARNET, Y.M. 1980. Bacteriophages of *Rhizobium trifolii*. I. Morphology and host range. *Journal General of Virology*, New York, 15: 1-5.
- BARNI, N.A.; KOLLING, J. & MINOR, H.C. 1977. Efeitos de níveis de nitrogênio sobre o rendimento de grãos, nodulação e características agrônômicas da soja (*Glycine max* (L) MERRIL). *Agron. Sulriograndense*, Porto Alegre, 13: 93-104.
- BARRAL, M.F. & SCHALCH NETO, J.A. 1986. Estudo preliminar de viabilidade econômica de produção de inoculantes para agricultura. *Fertilizantes*, São Paulo, 8: 10-13.
- BERGERSEN, F.J. 1961. The growth of *Rhizobium* in synthetic media. *Aust. J. Biol. Sci.*, Sidney, 14: 349-360.
- _____. 1971. The central reactions of nitrogen fixation. In: LIE, T.A. & MULDER, E.G., Eds. *Biological Nitrogen Fixation in Natural and Agricultural Habitats*, New York, p. 511-524.
- BIRYUKOV, V.V. & TARASOVA, S.S. 1973. Permeability criterion of microcolonies. *Biotechnol. & Bioeng. Symp.*, New York, 4: 573-579.
- BLAKEBROUGH, N. 1973. Fundamentals of fermenter design. *Biotechnol. & Bioeng. Symp.*, New York, 4: 295.

- BLAKEBROUGH, N. & MORESI, M. 1981. Scale-up of whey fermentation in a pilot-scale fermenter. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, London, 12: 173-178.
- BOIARDI, J.L.; BALATTI, A.P.; MAZZA, L.A. 1983. Obtención de *Rhizobium phaseoli* en cultivo discontinuo alimentado "Fed-Batch". *Rev. Lat. Amer. Microbiol.*, La Plata, 25: 235-241.
- BOIARDI, J.L. & ERTOLA, R.J. 1985. *Rhizobium* biomass production in batch and continuous culture with a maltsprouts medium. *MIRCEN Journal*, Madison, 1: 163-171.
- BONOMI, A. 1985. Technological development for *Rhizobium japonicum* growth a proposal. In: Workshop on *Rhizobium/legumime inoculants*, Porto Alegre, Paper... Porto Alegre, UNEP/UNESCO/FAO/MIRCEN. p. 263-272.
- _____. 1988. Technological development for the industrial production of *Rhizobium japonicum*. SIMPÓSIO ANUAL DA ACADEMIA DE CIÊNCIA DO ESTADO DE SÃO PAULO, 11., São Paulo. v. 1, p. 290-305.
- BONOMI, A.; BARRAL, M.F.; KOSHIMIZU, L.H.; MANTELATTO, P.E.; OHBA, M.S.; AFONSO, M. 1986. Desenvolvimento tecnológico para a produção industrial de *Rhizobium japonicum*. *Fertilizantes*, São Paulo, 8: 3-7.
- BONOMI, A.; CARVALHO, R.N.; OLIVEIRA, M.S.; PRADELLA, J.G.C.; SEVERO, R.; URENHA, L.C. 1987. Influência da aeração no crescimento de *Rhizobium japonicum* estirpe 587 em fermentador. (Trabalho apresentado no 1º Encontro Brasil, Argentina e Uruguai sobre inoculantes, Porto Alegre, RS).
- BORZANI, W. 1975. Cinética de Processos Fermentativos. In: BORZANI, W. et alii, Eds. *Engenharia bioquímica*. São Paulo. cap. 10, 3 v., p. 168-184.
- _____. 1980. Evaluation of the error that affects the maximum specific growth rate. *J. Ferment. Technol.*, New York, 58: 299-300.
- _____. 1985. Avaliação do erro que afeta o valor do rendimento calculado a partir de resultados experimentais. *Arq. Biol. Technol.*, Londres, 28: 581-584.
- _____. 1986. Cinética de processos fermentativos. *Revista Brasileira de Engenharia*. São Paulo, 3: 1-51.
- _____. 1988. Definições e cálculos de velocidades específicas em processos fermentativos. *Rev. Ensino Eng.*, São Paulo, 5: 1-17.

- BORZANI, W. & BARALLE, S.B. 1983. Correction of results obtained in laboratory-scale studies of batch fermentation kinetics. *Biotechnol. Bioeng.*, New York, 25: 3201-3206.
- BROCKWELL, J.; DIATTOFF, A.; ROUGHLEY, R.A.; DATE, R.A. 1982. Selection of rhizobia for inoculants. In: VINCENT, J.M., ed. *Nitrogen Fixation in Legumes*. Sidney, Academic Press. cap. 16, p. 173-191.
- BROCKWELL, J.; SCHWINGHAMER, E.A.; GAUT, R.R. 1977. Ecological studies of root-nodule bacteria introduced into field environment. V. A critical examination of the stability of antigenic and streptomycin-resistance markers for identification of strains of *Rhizobium trifolii*. *Soil Biol. Biochem.*, Oxford, 9: 19-24.
- BROMFIELD, E.S. & JONES, D.G. 1980. Studies on double strain occupancy of nodules and the competitive ability of *Rhizobium trifolii* on red white clover grown in soil and agar. *Ann. Appl. Biol.*, Warwick, 94: 51-59.
- BRUCH, C.W. & ALLEN, O.N. 1975. Description of two bacteriophages active against lotus rhizobia. *Soil Science Society of America Journal*, Madison, 19: 175-179.
- BRUNELLO, G. & CONCONE, B.R.V. 1975. Agitação e aeração em fermentadores. In: BORZANI, W. et alii, Eds. *Engenharia Bioquímica.*, São Paulo, Edgar Blucher. cap. 9, v. 3, p. 137-167.
- BRYANT, J. 1977. The characterization of mixing in fermenters. *Advances in Biochemical Engineering*, Washington, 8: 101.
- BURRIS, R.H. & WILSON, P.W. 1945. Biological Nitrogen fixation. *Annual Review of Biochemistry.* 14: 685-708.
- BURTON, J.C. 1967. *Rhizobium* culture and use. In: PEPPLER, H.J., ed. *Microbial Technology*. New York, Van Nostrand Reinhold. p.1-33.
- _____. 1975. Methods of inoculating seeds and their effect on survival of rhizobia. In: NUTMAN, P.S. *Symbiotic nitrogen fixation in plants*. Cambridge, Cambridge University Press. p. 175-189.
- _____. 1979. *Rhizobium* species. In: PEPPLER, M. & PERLMAN, D., Eds. *Microbial Technology*. New York, Van Nostrand Reinhold. p. 29-58.
- _____. 1981. Modern concepts in legume inoculation. In: GRAHAM, P.H. & HARRIS, S.C., Eds. *Biological Nitrogen Fixation, Technology for Tropical Agriculture*. Cali, Centro Internacional de Agricultura Tropical. p. 105-114.

- CALAM, C.T. 1969. The culture of microorganisms in liquid medium. In: NORRIS, J.R. & RIBBONS, D.W., Eds. *Methods in microbiology*. London, Academic Press. v. 1, 264 p.
- CALDWELL, B.E. 1969. Initial competition of root-nodule bacteria on soybeans in a field environment. *Agronomy Journal*, Madison, 61: 813-815.
- CALDWELL, B.E. & VEST, G. 1970 Effects of *Rhizobium japonicum* strains on soybeans yields. *Crop Science*, Madison, 10: 19-21.
- CHATEL, D.L. & PARKER, C.A. 1973. Survival of field-grown rhizobia over the dry summer periods in Western Australia. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, 10: 415-423.
- CHRISTIAN, J.H.B. & WALTHO, A. 1962. The water relation of staphylococci and micrococci. *Journal Applied Bacteriol.*, London, 25: 369-377.
- COLLINS, C.H. 1969. *Metodos Microbiologicos*. Zaragoza, Editorial Acribia. 410 p.
- CONCONE, B.R.V.; DOIN, P.A.; PINTO, A.G. 1978. Some major deviations for biomass determination by indirect method and estimation based on alkali consumption. *Journal Fermentation Technology*, New York, 56: 59-63.
- COONEY, C.L.; WANG, H.Y. & WANG, D.I.C. 1977. Computeraided material balancing for prediction of fermentation parameters. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, 19: 55-67.
- COOPER, C.M.; FERNSTROM, G.A.; MILLER, S.A. 1944. Performance of agitated, gas-liquid contactors. *Industrial and Engineering Chemistry*. New York, 36: 504-509.
- COSTILOW, R.N. 1981. Biophysical factors in growth. In: COSTILOW, R.N., ed. *Manual of Methods for General Bacteriology*. Washington, American Society for Microbiology. cap. 6, p. 66-78.
- COZZI, J.G.; BENINTENDE, G.; PERTICARI, A.; FARINA, L.O. 1985. Crescimento de cepas de *Rhizobium leguminosarum* biovar. *phaseoli* en medio liquido. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, Buenos Aires, 20: 35-47.
- COZZI, J.G. & BENINTENDE, G.B. 1987. *Supervivencia de Bradyrhizobium japonicum en turba no esteril*. Castelar, Departamento de Microbiologia. Castelar, INTA. 10 p. (Boletim interno).
- CRUZ, M.R.M.; VAIRO, M.L.R.; ALTERTHUM, F. 1988. Ensaio preliminares de crescimento de *Rhizobium phaseoli* utilizado como inoculante agricola. *SIMPÓSIO ANUAL DA ACADEMIA DE CIÊNCIA DO ESTADO DE SÃO PAULO*, 11. São Paulo, São Paulo. v. 2, p. 190-194.

- DANSO, S.K. & ALEXANDER, M. 1974. Survival of two strains of *Rhizobium* in soil. *Soil Science Society of America Journal*, Madison, 38: 86-89.
- DATE, R.A. 1969. A decade of legume inoculant quality control in Australia. *Journal of the Australian Institute of Agricultural Sciences*, Melbourne, 35: 27-37.
- _____. 1970. Microbiological problems in the inoculation and nodulation of legumes. *Plant and Soil*, The Hague, 32: 703-725.
- _____. 1976. Legume inoculant production. *Proceeding of the Indian National Science Academy. Section B*, Bangalore City, 40: 667-686.
- DATE, R.A. & ROUGHLEY, R.J. 1977. Preparation of legume inoculants. In: HARDY, R.W.F. & GIBSON, A.H., Eds. *A treatise on di-nitrogen fixation*, New York, John Wiley. p. 243-275.
- DAY, J.M.; ROUGHLEY, R.J.; EAGLESHAM, R.J.; DYE, M.; WHITE, S.P. 1978. Effect of high soil temperature on nodulation of cowpea, *Vigna unguiculata*. *Ann. Appl. Biol.*, Oxford, 88: 476-481.
- DIAS, J.M.C.S.; FACCIOTTI, M.C.R.; SCHMIDELL, W. 1988. Desenvolvimento do processo de produção de *Azospirillum brasilense*. I - Influência de micronutrientes e de extrato de levedura no crescimento em incubador rotativo. SIMPÓSIO ANUAL DA ACADEMIA DE CIÊNCIAS DO ESTADO DE SÃO PAULO, 11. São Paulo, São Paulo, v. 1, p. 362-381.
- DIATLOFF, A. 1970. Relationship of soil moisture, temperature and alkalinity to a soybean nodulation failure. *Queensl. J. Agric. Anim. Sci.*, Sidney, 27: 279-293.
- DIONISIO, J.A. 1985. Eficiência e competição de estirpes de *Rhizobium japonicum* na cultura de soja. 91 p. Dissertação (Mestr. Agron. - Solos) Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, 1985.
- DOBEREINER, J. 1985. Fixação biológica de nitrogênio. In: *Energia na Agricultura - Tecnologias Poupadoras de Insumos. Integração de Sistemas Energéticos - Produção de Alimentos*. Jaboticabal, São Paulo, p. 155-173.
- DOBEREINER, J.; ARRUDA, N.B.; PENTEADO, A.F. 1966. Especificidade hospedeira em variedades de soja na simbiose com *Rhizobium*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. Rio de Janeiro, 1: 207-210.
- DOBEREINER, J.; FRANCO, A.A.; GUZMAN, J. 1970. Estirpes de *Rhizobium japonicum* de excepcional eficiência. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Rio de Janeiro, 5: 155-161.

- DREW, S.W. 1981. Liquid culture. In: COSTILOW, R.N., ed. *Manual of Methods for General Bacteriology*. Washington, American Society for Microbiology. cap. 10, p. 151-178.
- DUDMAN, W.F. 1964. Growth and extracellular polysaccharide production by *Rhizobium meliloti* in defined medium. *Journal of Bacteriology*. London, 88: 640-645.
- EBOLI, F.C. 1975. Construção do equipamento. In: BORZANI, W. et alii, Eds. *Engenharia Bioquímica*. São Paulo, Edgar Blucher. v. 3, cap. 13, p.212-257.
- EL-HADDAD, M.E. 1985. The present situation of *Rhizobium* legume inoculant in Egypt. In: FREIRE, J.R.J. & FALCÃO, C.P.B., Eds. *Proceeding of the workshop on Rhizobium/legume inoculants*. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. p. 43-100.
- ELLIS, W.R.; HAM, G.E.; SCHMIDT, E.L. 1984. Persistence and recovery of *Rhizobium japonicum* inoculum in a field. *Soil Agron. Journal*, Madison, 76: 573-576.
- ELSWORTH, R.; WILLIAMS, V.; HARRIS-SMITH, R. 1957. The effect of oxygen supply on the rate of growth of *Aerobacter cloacae*. *Jornal Appl. Chem.*, 7: 269-274.
- ERICKSON, L.E.; MINKEVICH, I.G. & EROSHIN, V.K. 1978. Mass-energy balances in fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, 20: 1595-1621.
- ERICKSON, L.E.; SELGA, S.E. & VIESTURS, U.E. 1978. Application of mass and energy balance regulanties to product formation. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, 20: 1623-1638.
- EROSHIN, V.K. 1974. Biomass production and efficiency of substrate utilization. *Biotechnology and Bioengineering*. New York, 4: 995-1001.
- ERTOLA, R.J.; BALATTI, A.P.; MAZZA, L.A.; DAGUERRE, R. 1965. Estudios sobre un fermentador en columna. *Ind. Quím.*, Zaragoza, 24: 225-228.
- ERTOLA, R.J.; BALATTI, A.P.; CUEVAS, C.M. & DAGUERRE, R. 1969. Effect of composition of medium and oxygen supply rates on growth of *Rhizobium meliloti*. *Soil Science*, Baltimore, 108: 373-380.
- FANTI, O.D.; CERCOS, A.P.; COZZI, J.G.; DIEGUEZ, R.N. 1976. Producción de inoculantes de alfafa y de soja por cultivo sumergido. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*. Serie 2. *Biología y Produccion Vegetal*, Buenos Aires, 13: 55-69.

- FAO. 1975. *The large-scale preparation of Rhizobium inoculants for soybean*. Egypt. 32 p. (FAO, Working paper 12).
- _____. 1984. *Legume Inoculants and their use*. Rome, NIFTAL. FAO. Fertilizer and Plant Nutrition service. 63 p.
- FINN, R.K. 1954. Agitation-aeration in the laboratory and in industry. *Bacteriological Reviews*, London, 18: 254-278.
- _____. 1967. Agitation and aeration. *Biochemical and Biological Engineering Science*, Blakebrough, New York, 1: 66-99.
- FLYNN, D.S. & LILLY, M.D. 1967. A method for the control of the dissolved oxygen tension in microbial cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, 9: 515-531.
- FRANCO, A.A. & DOBEREINER, J. 1967. Especificidade hospedeira na simbiose com *Rhizobium* - feijão e influência de diferentes nutrientes. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 2: 467-474.
- FRED, E.B.; BALDWIN, I.L.; McCOY, E. 1932. *Root nodule bacteria and leguminous plants*. Madison, University of Wisconsin. 30 p. (University of Wisconsin Studies in Science, 5).
- FREDRICKSON, A.G. 1976. Formulation of structured growth models. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, 18: 1481-1486.
- FREIRE, J.R.J. 1967. *Os inoculantes das leguminosas*. Rio de Janeiro. 11f. Trabalho apresentado no 1º Simpósio Latino americano de Microbiologia do solo.
- FREIRE, J.R.J.; KOLLING, J.; SCHOLLENS, D. 1988. Legume nitrogen fixation potencial for maximizing agriculture production in developing countries. In: CHANG, CHAN & WOO, Eds. *Recent Advances in Biotechnology and Applied Biology Proceeding of Eight International Conference on Global Impacts of Applied Microbiology*, Hong Kong, 1-5 August 1988. p. 667-681.
- FREIRE, J.R.J. & JONES, S.H. 1963. Influência da temperatura de armazenagem e da perda de humidade na longevidade dos inoculantes de leguminosas. *Revista da Faculdade de Agronomia e Veterinária*, Porto Alegre, 6: 85-93.
- _____. 1964. Longevidade dos inoculantes de leguminosas. *Faculdade de Agronomia*. Porto Alegre, 1: 29-34.
- FREIRE, J.R.J.; KOLLING, J.; VIDOR, C.; PEREIRA, J.S.; KOLLING, I.; MENDES, N.C. 1983. Sobrevivência e competição por sítio de nodulação de estirpes de *Rhizobium japonicum* na cultura de soja. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, 7: 47-53.

- FREIRE, J.R.J. & VIDOR, C. 1970. A inoculação da soja com *Rhizobium*. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DA SOJA, 1., Campinas. Campinas, Fundação Cargill. p. 12.
- _____. 1971. Fatores limitantes dos solos ácidos na simbiose de *Rhizobium* e as leguminosas. In: DOBEREINER, J., ed. *As leguminosas na Agricultura Tropical*. Rio de Janeiro, p. 211-247.
- GARAT, B.; CARDONA, A.; FABIANO, E.; CAGGERO, C. 1980. *Estudio del crecimiento de cepas de Rhizobium*. p. 9-17. (Trabalho apresentado no XXI SUGDB).
- GAUDY, A.F.; RAMANATHAN, M.; RAO, B.S. 1967. Kinetic behavior of heterogeneous populations in completely mixed reactors. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, 9: 387-411.
- GEBHARDT, C.; TURNER, G.L.; GIBSON, A.H.; DREYFUS, B.L.; BERGERSEN, F.J. 1984. Nitrogen-fixing growth in continuous culture of a strain of *Sesbania rostrata*. *Journal of General Microbiology*, London, 130: 843-848.
- GOMES, F.P. 1966. *Curso de Estatística Experimental*. 3. ed. Piracicaba, Universidade de São Paulo. 436 p.
- GONZÁLES, G.R. 1984. *Resistência de Estirpes de Rhizobium japonicum (Kirahner) Buchanan a Antibióticos, Fungicidas e Herbicidas*. 59 p. Dissertação (Mestr. Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 1984.
- GRAHAM, P.H. & PARKER, C.A. 1964. Diagnostic features in the characterization of the root nodule bacteria of legume. *Plant and Soil*, The Hague, 20: 383-396.
- GUNNING, C. & JORDAN, D.C. 1954. Studies on humus type legume inoculants. II. Preparation and effectivity. *Canad. J. Agr. Sci.*, 34: 225-233.
- HAM, G.E.; FREDERICK, L.R.; ANDERSON, J.C. 1971. Serogroups of *Rhizobium japonicum* in soybean nodules sampled in Iowa. *Agronomy Journal*, Madison, 63: 69-72.
- HAMER, G. 1973. Wall growth and its significance in large fermenters used for the cultivation of single-celled microorganisms. *Biotechnol. & Bioeng. Symp.*, New York, 4: 565-572.
- HAVELKA, V.D. & HARDY, R.W.F. 1976. Photosynthate as a major factor limiting nitrogen fixation by field grown legumes with emphasis in soybeans. In: NUTMAN, P.S., ed. *Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants*. Cambridge, Cambridge Univ. Press. p. 121-139.

- HEDLIN, R.A. & NEWTON, J.D. 1948. Some factors influencing the growth and survival of rhizobia in humus and soil culture. *Canad. J. Research C.*, 26: 174-187.
- HIXSON, A.W. 1944. Nature and measure of agitation. *Ind. Eng. Chem.*, New York, 36: 488-496.
- HOLLAND, A.A.; STREET, J.E. & WILLIAMS, W.A. 1969. Range-legume inoculation and nitrogen fixation by root-nodule bacteria. London. 19 p. (*California Agricultural Experiment Station bulletin*, nº 842).
- IPT/DQEQ. 1982. *Determinação de glicerol por oxidação por periodato de sódio*. São Paulo. 4 p. (Documento interno - DQEQ/AB:01.01).
- IRELAND, J.A. & VINCENT, J.M. 1968. In: INTERNATIONAL CONGRESS SOIL SCIENCE, 9., 1968. v. 2, p. 85-93 apud VINCENT, J.M. 1974. A quantitative study of competition for nodule formation. In: QUISPÉL, A., ed. *The Biology of Nitrogen Fixation*. Amsterdam, North-Holland. p. 265-341.
- ISWARAN, V.; RAOSUNDARA, V.B.W.; MAGU, S.P.; JAURI, K.S. 1969. Indian peat as a carrier. *Curr. Sci. Madison*, 38: 468-469.
- JACKSON, A.T. 1985. Some problems of industrial scale-up. *Journal of Biological Education*. Cairo, 19: 48-52.
- JOHNSON, H.W. & MEANS, U.M. 1964. Selection of competitive strains of soybean nodulating bacteria. *Agronomy Journal*, Madison, 56: 60-62.
- JOHNSON, H.W.; MEANS, U.M.; WEBER, C.R. 1965. Competition for nodule sites between strains of *Rhizobium japonicum* applied as inoculum and strains in the soil. *Agronomy Journal*, Madison, 57: 179-185.
- JORDAN, D.C. 1986. Genus II. *Bradyrhizobium*. In: HOLT, J.C. & KRIEG, N.R., Eds. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 9. ed. Baltimore. Williams & Wilkins. v. 1, p. 242-244.
- KEMPE, L.L. & WEST, R.E. 1959. The effect of agitation on the rate of acid production by *Lactobacillus delbrueckii*. *Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering*, New York, 1: 385.
- KEYSER, H.H.; SADOWSKY, M.J.; BOHLOOL, B.B. 1985. Fastgrowing soybean Rhizobia. In: SHIBLES, R., ed. *World Soybean Research Conference III : Proceedings*. London, Westview Press, Boulder and London, p. 926-934.
- KJAERGAARD, L. 1978. Efficiency of microbial growth in biomass production. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, 20: 1691-1694.

- KOGA, S. & HUMPHREY, A.E. 1967. Study of the dynamic behavior of the chemostat system. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, 9: 375-386.
- KOLLING, I.G.; FREIRE, J.R.J.; KOLLING, J.; PEDROSO, M.H.T. 1984. Viabilidade de *Rhizobium japonicum* em diferentes formas de inoculante. In: REUNIÃO LATINO-AMERICANA SOBRE RHIZOBIUM, 12, Campinas, 1984, *Anais...* Campinas, Fundação Cargill. p. 25-30.
- KOLLING, J.; SCHOLLES, D.; PEREIRA, J.S.; MENDES, N.G. 1985. *Eficiência e competitividade de estirpes de Rhizobium leguminosarum em ervilha*. Trabalho apresentado na XIX REUNIÃO ANUAL DO FEIJÃO E OUTRAS LEGUMINOSAS DE GRÃOS ALIMENTÍCIOS. Porto Alegre. 5 p.
- KOSSLAK, R.M.; BOHLOOL, B.B.; DOWDLE, S.; SADOWSKY, M.J. 1983. Competition of *Rhizobium japonicum* strains in early stages of soybean nodulation. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 46: 870-873.
- KOSSLAK, R.M. & BOHLOOL, B.B. 1985. Influence of environmental factors on interstrain competition in *Rhizobium japonicum*. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 49: 1128-1133.
- KREMER, R.J. & PETERSON, H.L. 1983. Effects os carrier and temperature on survival of *Rhizobium* spp. in legume inocula, development of an improved type of inoculant. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 45: 1790-1794.
- KREMER, R.J.; POLO, J. & PETERSON, H.L. 1982. Effect of suspending agent and temperature on survival of *Rhizobium* in fertilizer. *Soil Science Society of America Journal*, Madison, 46: 539-542.
- KUBITSCHKEK, H.E. 1969. Counting and sizing microorganisms with the coulter counter. In: NORRIS, J.R. & RIBBONS, D. W., Eds. *Methods in Microbiology*. London, Academic Press. v. 1, 593 p.
- LABANDERA, C.A. & VINCENT, J.M. 1975. Competition between an introduced strain and native Uruguayan strains of *Rhizobium trifolii*. *Plant and Soil*, The Hague, 42: 327-347.
- LANARA. 1981. *Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes - I Métodos Microbiológicos*. Anexo 1. Brasília, Ministério da Agricultura.
- LEDUY, A. & ZAJIC, J.E. 1973. A geometrical approach for differentiation of an esperimental function at a point: Applied to growth and product formation. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, 15: 805-810.

- LEFRANCOIS, L. & REVUZ, B. 1973. Conditions in a fermenter necessary for obtaining optimal assimilations. *Biotechnology & Bioengineering Symp.*, New York, 4: 559-564.
- LEIDERMAN, J. & MORENO, E. 1969. Multiplicación de células de *Rhizobium japonicum*. *Rev. Ind. Agric. Tucumán, Tucumán*, 46: 69-85.
- LEVEAU, J.Y. & BOUIX, M. 1984. Cinéticas microbianas. In: SCRIBAN, R., ed. *Biotecnología*, São Paulo, Guanabara. cap. 3, p. 103-123.
- LEVENSPIEL, O. 1974. *Engenharia das Reações Químicas*. São Paulo, Edgard Blücher. 211 p. (v. 1 - Cinética Química Aplicada).
- LINDEMANN, W.C.; SCHMIDT, E.L.; HAM, G.E. 1974. Evidence for double infection within soybean nodules. *Soil Science*, Baltimore, 118: 274-279.
- LINEK, V.; SOBOTKA, M.; PROKOP, A. 1973. Measurement of aeration capacity of fermenters by rapidly responding oxygen probes. *Biotechnology & Bioengineering Symp.*, New York, 4: 429-453.
- LOCHEAD, A.G. & THEXTON, R.H. 1974. Growth and survival of bacteria in peat. I. Powdered peat and related products. *Can. Journal Res.*, 25: 1-13.
- LOPES, E.S.; DEUBER, R.; FORSTER, R.; GARGANTINI, H.; BULISANI, E.A. 1971. Influência dos herbicidas EPTC e Trifluralin e da inoculação das sementes com *Rhizobium phaseoli* na nodulação e produção do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). *Separata de BRAGANTIA*, Campinas, 30: 109-116.
- LOPES, E.S.; GIARDINI, A.R.; KILHL, R.; IGUE, T. 1976. Especificidade hospedeira e pré-seleção de estirpes de *Rhizobium japonicum* para as variedades Santa Rosa, Viçosa e IAC-2 de soja *Glycine max* (L) MERRIL. *BRAGANTIA*, Campinas, 35: 1-12.
- LOPRETO, C.R.; MAZZA, L.A.; BALATTI, A.P. 1972. Influencia de los componentes del medio de cultivo sobre el tiempo de "generacion" de una cepa de *Rhizobium japonicum*. *Anales de la Sociedad Científica Argentina*, La Plata, 193: 35-47.
- _____. 1973a. Influencia del suministro de oxígeno sobre la velocidad de crecimiento de una cepa de *Rhizobium japonicum*. *Rev. Asoc. Arg. Microbiol.*, La Plata, 5: 128-131.
- _____. 1973b. Producción de inoculantes para soja - Estudio comparativo de crecimiento celular y capacidad de fijación de nitrógeno de una cepa de *Rhizobium japonicum*. *Rev. Fac. Agron.*, La Plata, 49: 201-212.

- LOPRETO, C.R.; MAZZA, L.A.; BALATTI, A.P. 1974. Estudios sobre el desarrollo de suspensiones de *Rhizobium japonicum* en fermentadores con y sin agitacion. REUNIÓN LATINOAMERICANA DE RHIZOBIUM RESISTENCIA, 7., Chaco. Comunicación... Chaco. 10 p.
- _____. 1975a. Estudios de crecimiento de diferentes cepas de *Rhizobium japonicum*. *Revista de La Facultad de Agronomía, La Plata*, 51: 49-57.
- _____. 1975b. Producción de inoculantes para soja. *Revista de La Facultad de Agronomía, La Plata*, 51: 35-41.
- LOVATO, P.E. 1984. *Sobrevivência e Competição de Estirpes de Rhizobium phaseoli em Solo e na Rizosfera de Feijão*. 103 p. Dissertação (Mestr. Agron. - Solos) Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, 1984.
- MACHON, V.; FORT, I.; VLCEK, J.; FENCL, Z.; SEICHERT, L.; MUSILKOVA, M. 1978. Submerged Fermentations with time-variant rheological batch properties. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, 20: 1679-1683.
- MACK, D.E. & UHL, V.W. 1974. Performance and design of agitators. *Chem. Eng.*, New York, 54: 119-125.
- MALLETTE, M.F. 1969. Evaluation of growth by physical and chemical methods. In: NORRIS, J.R. & RIBBONS, W., Eds. *Methods in Microbiology*. Londres, Academic Press. v. 1, p. 521-565.
- MARQUES PINTO, C.; YAO, P.Y.; VINCENT, J.M. 1974. Nodulating competitiveness amongst strains of *Rhizobium meliloti* and *R. trifolii*. *Aust. J. Agric. Res.*, East Melbourne, 25: 317-329.
- MARTIN, A. 1961. *Introduction to soil microbiology*. New York, J. Wiley. p. 327-348.
- MARX, J.L. 1977. Looking at lectins: do they function in recognition processes. *Science*, New York, 196: 1429-1478.
- MATERSON, L.A. & WEAVER, R.W. 1985. Inoculant maturity influences survival of rhizobia on seed. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 45: 465-467.
- MAVITUNA, F. & SINCLAIR, C.G. 1985. A graphical method for the determination of critical biomass concentration for non-oxygen-limited growth. *Biotechnology Letters*, New York, 7: 69-74.
- MAZZA, L.A. & BALATTI, A.P. 1984. *Obtención de inoculantes para alfalfa e ensayos a campo*. La Plata. 5 p.

- MAZZA, L.A.; LOPRETO, C.R. & BALATTI, A.P. 1976. Obtencion de cultivos de *Rhizobium japonicum* en un fermentador sin agitacion mecanica. *Rev. Asoc. Arg. Microbiol.*, La Plata, 8: 99-103.
- MCCABE, W.L. & SMITH, J.C. 1973. *Operaciones Básicas de Ingeniería Química*. Barcelona, McGraw-Hill. cap. 9, p. 251-287.
- MCLAUGHLIN, W. & DUNIGAN, L.K. 1981. An ecological study of marked *Rhizobium trifoli* strains on the host plant *Trifolium repens* (L) var. Hwai in an acidic peat and a neutral mineral soil. *J. Appl. Bacteriol.*, London, 50: 65-72.
- MEANS, U.M.; JOHNSON, H.W.; ERDMAN, L.W. 1961. Competition between bacterial strains affecting nodulation in soybeans. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, Madison, 25: 105-108.
- MILIAN, A. 1984. *Control de calidad de los inoculantes comerciales*. Curso Regional sobre produccion y control de calidad y uso de inoculantes para Leguminosas. Montevideo, 30 p.
- MINKEVICH, I.G. & EROSHIN, V.K. 1973. Theoretical calculation of mass balance during the cultivation of microorganisms. *Biotechnology & Bioengineering Symp.*, New York, 4: 21-25.
- MOAT, A.G. 1979. *Microbial Physiology*. New York, J. Wiley. p. 444-544.
- MONZONI, D.H. 1975. Operação e controle de uma indústria de fermentação. In: BORZANI, W. et alii, Eds. *Engenharia Bioquímica*. cap. 14, v. 3, p. 258-275.
- MOROTE, C.G.B. 1989. *Fixação de Nitrogênio pela soja em condições limitantes de Temperatura e Umidade do solo*. Dissertação (Mestr. Agron. - Solos) Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, 1989.
- MORT, A.J. & BANER, W.D. 1980. Composition of the capsular and intracelular polysaccharides of *Rhizobium japonicum*. *Plant. Physiol.*, Lancaster, 66: 158-163.
- MOSSELL, D.A. & INGRAM, M. 1955. *J. Appl. Bacteriol.*, London, 18: 233-236.
- MURDOCK, D.I. & HATCHER, W.S. 1975. Growth of microorganisms in chilled orange juice. *J. Milk Food Technol.*, New York, 38: 393-396.
- NAGAI; S. 1975. Mass and energy balances. *Ad. Bioch. Eng.*, London, 6: 49-83.

- NATHANSON, K.; LAWN, R.J.; DEJABRUN, P.L.M.; BYTH, D.E. 1984. Growth, nodulation and nitrogen accumulation by soybean in saturated soil culture. *Field Crops Research*, Madison, 8: 73-92.
- NEWBOULD, F.H.S. 1951. Studies on humus type legume inoculants. I. Growth and survival in storage. *Sci. Agric.*, Madison, 31: 463-469.
- OLIVEIRA, L.A. 1982. *Eficiência, capacidade competitiva e sobrevivência de estirpes de Rhizobium japonicum (Kirchner) Buchnanan*. 142 p. Dissertação (Mestr. Agron. - Solos) Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, 1982.
- OLIVEIRA, L.A. & VIDOR, C. 1984. Seleção de estirpes de *Rhizobium japonicum* em soja. II. Capacidade competitiva por sítios de nódulos. *R. Bras. Ci. Solo*, Campinas, 8: 43-47.
- PACZKOWSKI, M.W. & BERRYHILL, D.L. 1979. Survival of *Rhizobium phaseoli* in coal-based legume inoculants. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 38: 612-615.
- PEREIRA, J.C. 1983. *Obtenção e avaliação de mutantes espontâneos de Rhizobium phaseoli resistentes a antibióticos e fungicidas*. 89 p. Dissertação (Mestr. Agron. - Solos) Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, 1983.
- PERES, J.R.R. & VIDOR, C. 1980. Relação entre concentração de células no inoculantes e competição por sítios de infecção nodular entre estirpes de *Rhizobium japonicum* em soja. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, 4: 139-143.
- PETERS, W.S. & SUMMERS, G.W. 1973. *Análise Estatística e Processo Decisório*. Rio de Janeiro, Fundação Getúlio Vargas. 686 p.
- PHILPOTTS, H.R. 1967. The effect of soil temperature on nodulation of cowpea (*Vigna sinensis*). *Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb.*, Melbourne, 7: 372-376.
- PIRT, J.S. 1975. Effects of water activity and medium tonicity. In: BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATION, Eds. *Principles of Microbe and Cell Cultivation*. London Oxford, London. p. 147-155.
- POSTGATE, J.R. 1969. Viable counts and viability. In: NORRIS, J.R. & RIBBONS, D.W., Eds. *Methods in Microbiology*. Great Britain, v. 1, p. 611-628.
- RAMKRISHNA, D.; FREDRICKSON, A.G. & TSUCHIYA, H.M. 1967. Dynamics of microbial propagation: Models considering inhibitors and variable cell composition. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, 9: 129-170.

- ROBINSON, A.C. 1969. Competition between effective and ineffective strains of *Rhizobium trifolii* in the nodulation of *Trifolium subterraneum*. *Australian Agricultural Research*, East Melbourne, 20: 827-841.
- ROUGHLEY, R.J. 1968. Some factors influencing the growth and survival of root nodule bacteria in peat culture. *Journal of Applied Bacteriology*, London, 31: 259-265.
- _____. 1970. The preparation and use of legume seed inoculants. *Plant and Soil*, The Hague, 32: 675-701.
- _____. 1976. The production of high quality inoculants and their contribution to legume yield. In: NUTMAN, P.S., ed. *Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants*. Cambridge, University Press. p. 125-136.
- _____. 1985. Production and quality control of legume seed inoculants in Australia. In: FREIRE, J.R.J. & FALCÃO, C. P.B., Eds. *Proceeding of Workshop on Rhizobium/legume inoculants*. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. p. 37-42.
- ROUGHLEY, R.J.; BROMFIELD, E.S.D.; PULVER, E.L. & DAY, J.M. 1980. Competition between species of *Rhizobium* for nodulation of *Glycine max*. *Soil Biol. Biochem.*, Oxford, 12: 467-470.
- ROUGHLEY, R.J. & BULLARD, G. 1981. *Australian Inoculants Research and Control Service (AIRCS)*. Gosford. p. 1-16.
- ROUGHLEY, R.J. & VINCENT, J.M. 1967. Growth and survival of *Rhizobium* spp. in peat culture. *Journal of Applied Bacteriology*, London, 30: 362-375.
- RUSCHEL, A.P.; BRITTO, D.P.P.S. & CARVALHO, L.F. 1969. Efeito do Boro, Molibdênio e Zinco quando aplicados ao revestimento da semente na fixação simbiótica do nitrogênio atmosférico da soja (*Glycine max* (L) MERRIL). *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, 4: 29-37.
- RUSHTON, J.H.; COSTICH, E.W.; EVERETT, H.J. 1950a. Power characteristics of mixing impellers - Part I. *Chemical Engineering Progress*, New York, 46: 395-404.
- _____. 1950b. Power characteristics of mixing impellers - Part II. *Chemical Engineering Progress*, New York, 46: 467-476.
- RUSSEL, P.E. & JONES, C.D. 1975. Immunofluorescence studies of selection of strains of *Rhizobium trifolii* by S 184 white clover (*Trifolium repens* L.). *Plant and soil*, The Hague, 42: 119-129.

- SAITO, S.M.T.; ARAUJO, J.M.; BARAIVAR, A.; GALLI, L.U. 1985. Survival of *Rhizobium* in the carrier. In: FREIRE, J.R.J. & FALCÃO, P.C.B., Eds. *Proceeding of the workshop on Rhizobium/legume inoculants*. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. p. 145-156.
- SICARDI, M. 1984. La importancia del soporte y su acondicionamiento en la producción de inoculantes. *Curso Regional sobre Producción, Control de Calidad y Uso de Inoculantes para Leguminosas*. Montevideo, 15 p.
- SIKYTA, B. 1983. *Methods in Industrial Microbiology*. New York, J. Wiley. 349 p.
- SIMS, J.R.; LINDEMANN, W.C.; SMITH, R.S.; WEST, S.H. & FREDERICK, L.R. 1984. Biological nitrogen fixation research and technology assesment for Egypt: II training, research and inoculant production. *Journal of Agronomic Education*, Cairo, 1: 24-28.
- SINCLAIR, C.G. 1984. Formulation of the equations for oxygen transfer in fermenters. *Biotechnology Letters*, London, 6: 65-70.
- SKRDLETA, V. & KARIMOVA, J. 1969. Competition between two somatic serotypes of *Rhizobium japonicum* used as double-strain inocula in varying proportions. *Arch. Microbiol.*, 66: 25-28.
- SNEDECOR, G.W. 1970. *Metodos Estadisticos*. 3. ed. México, Continental. 630 p.
- SOMASEGARAN, P. & HOBEN, H.J. 1985. *Methods in legume-Rhizobium Technology*. 367 p. Niftal Project NifDOC 85:0301, Paia, Mavi, Hawaii.
- SOMASEGARAN, P.; REYES, V.G.; HOBEN, H.J. 1984. The influence of high temperatures on the growth and survival of *Rhizobium* spp. in peat inoculants during preparation, storage, and distribution. *Can. J. Microbiol.* 30: 23-30.
- SPARROW, J.R. & HAM, S.D. 1983. Nodulation, N₂, fixation and seed yield of Navy beans as influenced by inoculant rate and inoculant carrier. *Agronomy Journal*, Madison, 75: 20-24.
- SPECHT, A.W.; ERMAN, L.W.; MEANS, V.M. & RESNICKY, J.W. 1956. Effect of nutrition on *Rhizobium hurtum* inoculated with *Rhizobium trifolii*. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, Madison, 29: 489-495.
- STOUT, B.A. 1980. *Energia para Agricultura Mundial*. ROMA, FAO/ONU. 303 p.

- STOUTHAMER, A.H. 1969. Determination and significance of molar growth yields. In: NORRIS, J.R. & RIBBONS, D.W., Eds. *Methods in Microbiology*. Londres, Academic Press. v. 1, p. 629-648.
- STRIJDOM, B.W. & DESCHODT, C.C. 1976. Carriers of rhizobia and the effect of prior treatment on the survival of rhizobia. In: NUTMAN, P.S., ed. *Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants*. Cambridge, Cambridge University Press. p. 98-112.
- TEDESCO, M.J.; VOLKWEISS, S.J.; BOHNEN, H. 1985. *Análises de Solos, Plantas e outros Materiais*. Porto Alegre, Faculdade de Agronomia, UFRGS: 188 p. (Boletim Técnico nº 5).
- THIEMANN, J.E. 1959. Estudos sobre a absorção de oxigênio em frascos agitados e em fermentadores experimentais. *Ciência e Cultura*, São Paulo, 11: 173-189.
- THOMPSON, J.A. 1980. Production and quality control of legume inoculants. In: BERGENSEN, F.J., ed. *Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation*. Cambridge, University Press. cap. 2, p. 489-533.
- TOPIWALA, H.H. & HAMER, G. 1973. A study of gas transfer in fermenters. *Biotechnology and Bioengineering Symp.*, New York, 4: 547-557.
- TRAMBOUZE, P. & MUELLER, H. 1973. Computers in fermentation control. *Process Biochemistry*, New York, 8: 7-11.
- TRIBOLI, E.R. 1987. *Apontamentos sobre a fermentação alcoólica por leveduras*. São Paulo, Instituto Mauá de Tecnologia. Escola de Engenharia Mauá. 15 p.
- TRINICK, M.J. 1982. Competition between rhizobial strains for nodulation. In: VINCENT, J.M., ed. *Nitrogen Fixation in Legumes*. Sidney, Academic Press. cap. 19, p. 229-237.
- URIO, E.J. & CHOWDHURY, M.S. 1981. The survival of rhizobia in some local carrier materials for seed inoculation of legume. In: EMEJUIWE, S.O.; OGUMBI, O.; SANNI, S.O. Eds. *Global Impacts of Applied Microbiology*. Lagos, Academic Press. p. 139-144.
- VAN SCHREVEN, D.A. 1958. Methods used in the Netherlands for the production of legume inoculants. In: BUTTERWORTHS SCIENTIFIC PUBLICATIONS, Eds. *Nutrition of Legumes*. Sidney, Academic Press. p. 328-333.
- _____. 1970. Some factors affecting growth and survival of *Rhizobium* spp. in soil-peat cultures. *Plant Soil*, The Hague, 32: 675-701.

- VASQUEZ, S.S. 1975. Estudio de adaptacion y fijacion simbiótica de nitrogeno de algunas leguminosas tropicales. *Cenicafe*. Colombia, 26: 27-37.
- VEST, G. 1971. Rj3 - a gene conditioning ineffective nodulation in soybean. *Crop Science*, Madison, 10: 34-35.
- VIDOR, C. 1977. *Studies of saprophytic competence in strains of Rhizobium japonicum* (Kirchner) Buchacham. 189 p. Dissertation (Ph.D - Agronomy). The Ohio State University, Columbus, USA, 1977.
- VIDOR, C.; BROSE, E.; PEREIRA, J.S. 1978. Competição por sítios de infecção nodular entre estirpes de *R. japonicum* em cultivares de soja (*Glycine max* (L) MERRIL). *Agron. Sulriogr.*, Porto Alegre, 6: 51-58.
- VIDOR, C.; FREIRE, J.R.J.; GODINHO, I.; SOARES, J.; MENDES, N.; KORNELIUS, Z. 1972. Especificidade simbiótica entre estirpes de *Rhizobium japonicum* e variedades de soja (*Glycine max* (L) MERRIL). *Agron. Sulriogr.*, Porto Alegre, 8: 61-67.
- VIDOR, C.; KOLLING, J.; FREIRE, J.R.J.; SCHOLLES, D.; BROSE, E.; PEDROSO, M.H.T. 1983. Fixação Biológica do Nitrogênio pela Simbiose entre *Rhizobium* e Leguminosas. *Bol. Téc. IPAGRO*, Porto Alegre, 11: 1-52.
- VIDOR, C.; OLIVEIRA, L.A.; LOVATO, P.E. 1986. Sobrevivência e competição de estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*. In: REUNIÃO LATINOAMERICANA SOBRE RHIZOBIUM, Panama, 1986. Panama, Universidad de Panama, p. 247-259.
- VIERA, R.M. 1986. Ciclo biológico del nitrogeno en el suelo. *Editorial Científico-Técnica*. Bulgaria. 167 p.
- VINCENT, J.M. 1958. Survival of the root nodule bacteria. In: HALLSWORTH, E.G., ed. *Nutrition of the Legumes*. Butterworth, London, p. 108-123.
- _____. 1970. *A manual for the Practical Study of Root-Nodules Bacteria*. London, Burgess, IBP. 164 p.
- _____. 1974. Root-nodule symbiosis with *Rhizobium*. In: QUISPEL, A., ed. *The biology of nitrogen fixation*. Amsterdam, North-Holland Research Monographs. p. 265-341. (Frontiers of Biology, 33).
- _____. 1975. *Manual Práctico de rizobiología*. Zaragoza, Ed. Hemisferio Sur. 200 p.
- VINCENT, J.M. & WATERS, L.M. 1953. The influence of the host on competition amongst clover root-nodule bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, London, 9: 357-370.

- VOSS, M. 1981. Seleção de *Rhizobium phaseoli* de regiões produtoras de feijão do Rio Grande do Sul. 75 p. Dissertação (Mestr. Agron. - Solos) Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, 1981.
- VOSS, M. & SIDIRAS, N. 1985. Nodulação da soja em plantio direto em comparação com plantio convencional. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, 20: 775-782.
- WANG, H.Y. 1979. Volume changes during aerobic fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, 21: 525-532.
- WANG, H.Y.; COONEY, C.L. & WANG, D.I.C. 1977. Computeraided baker's yeast fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, 19: 69-86.
- WEAVER, R.W. & FREDERICK, L.R. 1974. Effect of inoculum rate on competitive nodulation of *Glycine max* (L) MERRIL. II. Field Studies. *Agronomy Journal*, Madison, 65: 916-919.
- WILLIAMS, P.M. 1984. Current use of legume inoculant technology. In: ALEXANDER, M., ed. *Biological Nitrogen Fixation, Ecology technology and Physiology*. New York, Plenum Press. p. 39-50.
- WINZLER, R.J. 1941. *J. Cell. Comp. Physiol.*, Philadelphia, 17: 263-271.
- YAMADA, S.; WADA, M.; CHIBATA, I. 1978. Oxygen transfer in shaker flask cultures and the conversion of sorbitol to sorbose by *Acetobacter suboxydans*. *J. Ferment. Technol.*, New York, 56: 20-28.

7 APÊNDICE

APÊNDICE 1. Formulação do meio de cultivo utilizado nos ensaios fermentativos (MAZZA et alii, 1976).

SOLUÇÃO A: Solução a 10% de $MnSO_4$

$MnSO_4$	10 gramas
Água destilada	100 mililitros

SOLUÇÃO B: Solução a 10% de $FeCl_3$

$FeCl_3$	10 gramas
Água destilada	100 mililitros

Meio de Cultivo:

Glicerol	10,0 gramas (8,13 ml)
Extrato de levedura	4,0 gramas
K_2HPO_4	0,5 gramas
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 gramas
NaCl	0,1 grama
KNO_3	0,8 gramas
$(NH_4)HPO_4$	0,3 gramas
SOLUÇÃO A	2 gotas
SOLUÇÃO B	2 gotas
Água destilada	1,0 litro

Observação: Para produção do meio sólido, acrescentar 20 gramas de Agar por litro de meio líquido.

APÊNDICE 2. Composição do soro fisiológico utilizado como diluente (MILIAN, 1984).

MATERIAL

Água destilada	1,0 litro
NaCl	8,5 gramas

PREPARAÇÃO

Agregar o cloreto de sódio (NaCl) à água. Dissolver e repartir em tubos, cada um com 9,0 ml. Autoclavar a 121°C e 1 atm de pressão por 20 minutos.

APÊNDICE 3. Equações para determinação do erro que afeta o valor da velocidade específica de crescimento máxima (BORZANI, 1980).

EQUAÇÕES

$$\mu = \frac{1}{\Delta t} \cdot \ln \frac{X_2}{X_1}$$

$$\mu_1 = \frac{1}{\Delta t} \cdot \ln \frac{X_2'}{X_1''}$$

$$\mu_2 = \frac{1}{\Delta t} \cdot \ln \frac{X_2''}{X_1'}$$

$$X_1'' = (1 + \alpha) \cdot X_1$$

$$X_2'' = (1 + \alpha) \cdot X_2$$

$$X_1' = (1 - \alpha) \cdot X_1$$

$$X_2' = (1 - \alpha) \cdot X_2$$

$$\Delta \mu = \mu - \mu_1 = \mu_2 - \mu = \frac{1}{\Delta t} \cdot \ln \frac{1 + \alpha}{1 - \alpha}$$

NOMENCLATURA

X_1 = concentração celular do início da fase de crescimento exponencial;

X_1' = o menor valor de X_1 decorrente do erro experimental;

X_1'' = o maior valor de X_1 decorrente do erro experimental;

X_2 = concentração celular do final da fase de crescimento exponencial;

X_2' = o menor valor de X_2 decorrente do erro experimental;

X_2'' = o maior valor de X_2 decorrente do erro experimental;

α = erro relativo que afeta a concentração celular;

μ = velocidade específica de crescimento máxima;

APÊNDICE 3.

continuação...

Δt = duração do crescimento exponencial;

$\Delta \mu$ = erro absoluto que afeta ;

μ_1 = menor valor de decorrente do erro experimental;

μ_2 = maior valor de decorrente do erro experimental.

APÊNDICE 4. Coloração de Gram (COLLINS, 1969).

MATERIAIS

A. Solução de violeta genciana

Violeta genciana	1 g
Ácido fênico	2 g
Álcool etílico (96 °GL)	10 ml
Água destilada	100 ml

B. Solução de Lugol

Iodo	1 g
Iodeto de potássio	2 g
Água destilada	100 ml

C. Solução de álcool-acetona

Álcool etílico (96 °GL)	800 ml
Acetona	200 ml

D. Solução de Fucsina de Ziehl

Fucsina	1 g
Ácido fênico	5 g
Álcool etílico (96 °GL)	10 ml
Água destilada	100 ml

PROCEDIMENTO

Preparar a lâmina e fixar o microrganismo por esfregaço. Tingir a lâmina com a Solução A durante 30

APÊNDICE 4.

continuação...

segundos. Lavar e escorrer com a Solução B, deixando-se em repouso por 1 minuto. Retirar a Solução B, lavando a lâmina com a Solução C e deixando-a atuar somente alguns segundos. Lavar com água. Contratintar com a Solução D. Observar ao microscópio.

APÊNDICE 5. Meio Agar-Glicose-Peptona (MILIAN, 1984).

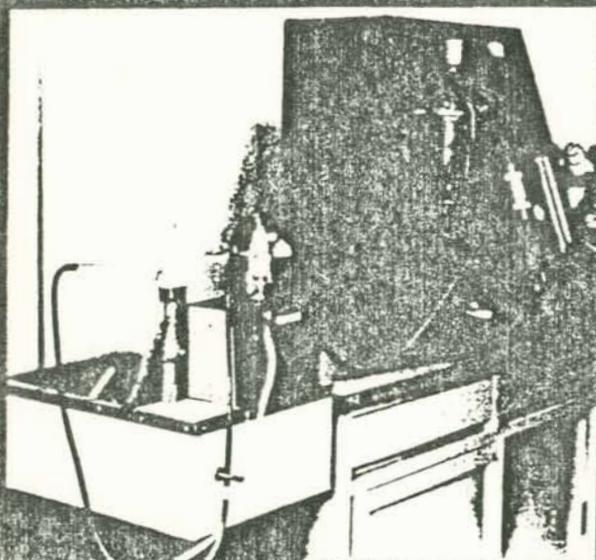
COMPONENTES

Glicose	5 g
Peptona bacteriológica	10 g
Agar	15 g
Água destilada	1000 ml
Solução alcoólica de púrpura de bromocresol à 1,6%	10 ml

PROCEDIMENTO

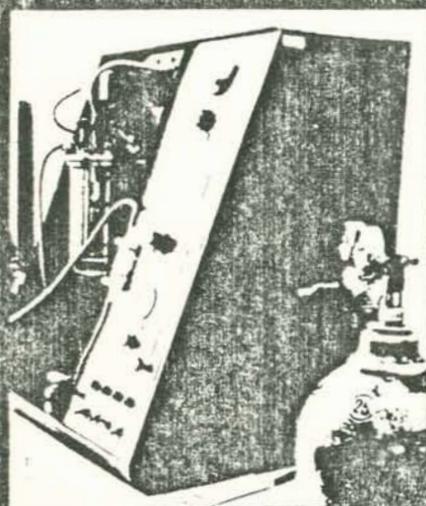
Misturar a água, a peptona e o agar. Autoclavar a 121°C e 1 atm de pressão durante 5 minutos. Misturar a glicose na solução indicada, e repartir em tubos. Autoclavar os tubos a 121°C e 1 atm de pressão durante 10 minutos. A glicose não deve ser autoclavada duas vezes.

APÊNDICE 6. Equipamentos de fermentação.



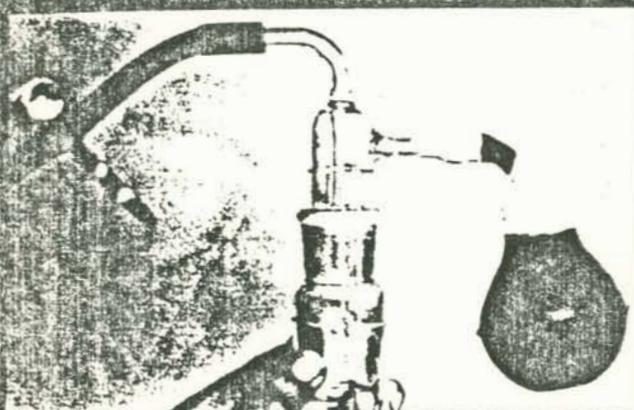
PRIMEIRO PLANO: FERMENTADOR EXPERIMENTAL ESQUEMATIZADO POR MACARY (1983).
SEGUNDO PLANO: FERMENTADOR NEW BRUNSWICK, MODELO MF-102.

4.3 cm



FERMENTADOR NEW BRUNSWICK (MF-102), COM VASO PARA FERMENTAÇÃO DE 2 LITROS.

3.0 cm



AMOSTRADOR DIMENSIONADO E CONFECCIONADO PELO DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA DA CIENTEC.

1.3 cm

APÊNDICE 7. Determinação de Glicerol (IPT/DQEQ, 1982).

PROCEDIMENTO

1. Pesar a amostra em pesa-filtro, conforme tabela abaixo:

CONCENTRAÇÃO ESPERADA DE GLICEROL NA AMOSTRA (g/l)	PESO DA ALÍQUOTA (g)
8 - 10	5
5 - 8	10
2 - 5	15
2	20

2. Transferir a amostra a um bequer de 250 ml, lavando o recipiente usado para a pesagem com água destilada algumas vezes;
3. Diluir a amostra a 50 ml;
4. Adicionar H_2SO_4 0,2 N até que o pH se torne igual ou inferior a 3,0;
5. Adicionar NaOH 0,05 N até o pH atingir o valor de $8,1 \pm 0,1$ (no final pode ser usado NaOH mais diluído para facilitar esse acerto);
6. Preparar um branco contendo 50 ml de água destilada, e proceder ao mesmo ajuste de pH;

APÊNDICE 7.

continuação...

7. Adicionar 10 ml (pipeta volumétrica) de solução de periodato de sódio, rodar o conteúdo para homogeneizar, cobrir com vidro de relógio e colocar em repouso por 30 minutos no escuro à temperatura inferior a 35°C;
8. Adicionar 2 ml de solução de etilenoglicol 50% (pipeta volumétrica) e deixar em repouso por 20 minutos;
9. Diluir a aproximadamente 100 ml e titular com NaOH 0,145 N, usando medidor de pH $6,5 \pm 0,1$ para o branco, $8,1 \pm 0,1$ para a amostra. Perto do ponto final, colocar uma gota ou fração de gota de cada vez;
10. Cálculo

$$\text{Glicerol (g/l)} = \frac{(V_a - V_b) \cdot N \cdot 92,095}{m}$$

onde:

V_a = volume de NaOH gasto para titular a amostra (ml);

V_b = volume de NaOH gasto para titular o branco (ml);

N = normalidade do NaOH;

m = massa da alíquota (g).

APÊNDICE 8. Solução nutritiva para vasos Leonard (SPECHT et alii, 1956)

SOLUÇÃO ESTOQUE A: Usar 1 ml por litro da solução final.

$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	178,2 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	256,5 g
Água destilada estéril	1000,0 ml

SOLUÇÃO ESTOQUE B: Usar 1 ml por litro da solução final.

K_2HPO_4	164,7 g
K_2SO_4	82,4 g
Água destilada estéril	1000,0 ml

SOLUÇÃO ESTOQUE C: Usar 10 ml por litro da solução final.

NaEDTA	3,72 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	3,78 g
Água destilada estéril	1000,00 ml

Dissolver o NaEDTA + $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ em 900 ml de água destilada, aquecendo a 80°C até dissolução total. Completar o volume com água.

SOLUÇÃO ESTOQUE D: Usar 3 ml por litro da solução final.

$CaSO_4 \cdot 2H_2O$	63,33 g
Água destilada estéril	1000,00 ml

SOLUÇÃO ESTOQUE E: Usar 0,5 ml por litro da solução final.

$MnCl_2 \cdot 2H_2O$	7,24 g
H_3BO_3	5,72 g
$CuSO_4 \cdot 7H_2O$	9,32 g

APÊNDICE 8.

continuação...

ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,44 g
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,25 g
Água destilada estéril	1000,00 ml

OBSERVAÇÃO:

NaEDTA = Tritriplex III - C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈.2H₂O

APÊNDICE 9. Quadro simplificado das características dos inóculos utilizados nos experimentos descritos nos itens 3.4 e 3.5.

TRATAMENTOS	CARACTERÍSTICAS DOS INÓCULOS
TF1	<ul style="list-style-type: none">. Tratamento obtido em fermentação conjunta, após 120 horas de processo.. 69,07% da estirpe SEMIA 587 e 39,93% da estirpe SEMIA 5019.
TP1	<ul style="list-style-type: none">. Tratamento obtido através da mistura das estirpes produzidas isoladamente, em frascos agitados.. 70% da estirpe SEMIA 587 e 30% da estirpe SEMIA 5019.
TP2	<ul style="list-style-type: none">. Tratamento obtido através da mistura das estirpes produzidas isoladamente, em frascos agitados.. 50% da estirpe SEMIA 587 e 50% da estirpe SEMIA 5019.
TP3	<ul style="list-style-type: none">. Tratamento obtido através da mistura das estirpes produzidas isoladamente, em frascos agitados.. 70% da estirpe SEMIA 5019 e 30% da estirpe SEMIA 587.

APÊNDICE 10. Análise granulométrica da turfa moída.

EQUIPAMENTOS

- . Agitador magnético, modelo N122 - Série 8503
- . Peneiras Granutest

ANÁLISE

"MESH"	PESO DA TURFA (g)	%	PESO ACUMULADO (g)	% ACUMULADA
- 0+ 35	54,8	5,49	54,8	5,49
- 35+ 60	280,7	28,14	335,5	33,63
- 60+ 80	110,3	11,06	445,8	44,69
- 80+100	86,2	8,64	532,0	53,33
- 100+150	92,6	9,28	624,6	62,61
- 150+200	70,8	7,10	695,4	69,71
200	302,1	30,29	997,5	100,00
TOTAL	997,5	100,00		

APÊNDICE 11. Composição da turfa bruta.

ANÁLISE	UNIDADE	VALOR
Cinzas	b.s., % *	36,5
Carbono	b.s., %	39,2
Hidrogênio	b.s., %	2,1
Nitrogênio	b.s., %	1,5
Potássio trocável	ppm	64,0
Fósforo assimilável	ppm	12,7

* b.s. = base seca

APÊNDICE 12. Método empírico para determinação da capacidade de absorção de água pela turfa.

MATERIAL

Turfa moída e tratada - 50 gramas

Água

PROCEDIMENTO

Com uma pipeta de 1 ml, colocar 0,5 ml de água na turfa, misturar bem com as mãos. Repetir este procedimento até o momento em que a turfa fique aglomerada. Determinar o volume de água gasto para 50 g de turfa e calcular a percentagem de absorção (capacidade de absorção de água).

APÊNDICE 13. Crescimento expresso em log nº células por ml da estirpe SEMIA 587 de *Bradyrhizobium japonicum* para diferentes velocidades de agitação nos respectivos tempos de desenvolvimento. Cada valor corresponde à média de quatro observações.

TEMPO DE DESENVOLVIMENTO (horas)	log nº de células/ml							
	100 rpm a*	150 rpm a	200 rpm b	230 rpm b	250 rpm b	270 rpm b	300 rpm b	500 rpm c
0	8,97	8,94	8,96	8,91	8,89	8,92	8,90	8,92
6	9,00	9,08	9,03	8,97	8,96	8,98	8,96	8,98
12	9,05	9,24	9,20	9,17	9,29	9,18	9,16	9,16
24	9,31	9,49	9,61	9,68	9,80	9,72	9,71	9,53
36	9,55	9,73	9,97	10,13	10,12	10,09	10,09	9,91
60	10,04	10,08	10,40	10,53	10,52	10,50	10,49	10,27
72	10,16	10,16	10,49	10,59	10,58	10,56	10,56	10,33
84	10,21	10,21	10,53	10,61	10,60	10,59	10,56	10,34
108	10,24	10,27	10,54	10,60	10,58	10,55	10,56	10,34
120	10,24	10,26	10,52	10,59	10,54	10,51	10,51	10,33

* Para os valores de agitação seguidos com a mesma letra, a média da diferença entre as curvas não diferem significativamente ($P > 0,05$) de acordo com a prova de significância de t de student.

APÊNDICE 14. Análise de variância dos valores do tempo de duração da fase de crescimento exponencial da estirpe SEMIA 587 de *Bradyrhizobium japonicum* para as diferentes velocidades de agitação estudadas.

CAUSA DE VARIÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE	SOMA DE QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	F
Blocos	3	50,530	16,843	0,27ns
Tratamentos	7	1765,458	252,208	4,00**
Resíduo	21	1324,094	63,052	
Total	31	3140,082		

** Significância do valor do F-teste a 1% de probabilidade
ns Não significativo a 5% de probabilidade

APÊNDICE 15. Análise de variância dos valores da taxa de crescimento na fase exponencial (ν), da estirpe SEMIA 587 de *Bradyrhizobium japonicum*, para as diferentes velocidades de agitação estudadas.

CAUSA DE VARIÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE	SOMA DE QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	F
Blocos	3	$5,25 \times 10^{17}$	$1,75 \times 10^{17}$	1,24ns
Tratamentos	7	$3,96 \times 10^{18}$	$5,66 \times 10^{17}$	3,99**
Resíduos	21	$2,97 \times 10^{18}$	$1,42 \times 10^{17}$	
Total	31	$7,46 \times 10^{18}$		

** Significância do valor do F-teste a 1% de probabilidade
ns Não significativo a 5% de probabilidade

APÊNDICE 16. Análise de variância dos valores da produtividade máxima, da estirpe SEMIA 587 de *Bradyrhizobium japonicum*, para as diferentes velocidades de agitação estudadas.

CAUSA DE VARIACÃO	GRAUS DE LIBERDADE	SOMA DE QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	F
Blocos	3	$5,05 \times 10^{23}$	$1,68 \times 10^{23}$	8,14**
Tratamentos	7	$5,79 \times 10^{23}$	$8,27 \times 10^{22}$	4,00**
Resíduo	21	$4,34 \times 10^{23}$	$2,07 \times 10^{22}$	

** Significância do valor do F-teste a 1% de probabilidade

APÊNDICE 17. Análise de variância dos valores da velocidade específica de crescimento máxima (μ m), da estirpe SEMIA 587 de *Bradyrhizobium japonicum* para as diferentes velocidades de agitação estudadas.

CAUSA DE VARIÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE	SOMA DE QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	F
Blocos	3	0,02175	0,00725	22,50**
Tratamentos	7	0,00902	0,00129	4,00**
Resíduo	21	0,00677	$3,22 \times 10^{-4}$	
Total	31	0,03754		

** Significância do valor do F-teste a 1% de probabilidade

APÊNDICE 18. Análise de variância dos valores do tempo de geração, da estirpe SEMIA 587 de *Bradyrhizobium japonicum*, para as diferentes velocidades de agitação estudadas.

CAUSA DE VARIACÃO	GRAUS DE LIBERDADE	SOMA DE QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	F
Blocos	3	50,980	16,993	1,49ns
Tratamentos	7	2815,156	402,165	35,22**
Resíduo	21	239,760	11,417	
Total	31	3105,896		

** Significância do valor do F-teste a 1% de probabilidade
ns Não significativo a 5% de probabilidade

APÊNDICE 19. Variação no pH do meio fermentativo, para as diferentes velocidades de agitação estudadas e nos respectivos tempos de desenvolvimento, para a estirpe SEMIA 587 de *Bradyrhizobium japonicum*. Média de quatro repetições.

TEMPO (h)	AGITAÇÃO (rpm)							
	100 a*	150 bc	200 bc	230 bd	250 e	270 bef	300 eg	500 eg
0	7,14	7,14	7,19	7,15	7,17	7,13	7,20	7,12
6	7,17	7,16	7,23	7,27	7,25	7,29	7,46	7,36
12	7,18	7,23	7,30	7,33	7,34	7,47	7,54	7,44
24	7,19	7,33	7,33	7,42	7,50	7,50	7,69	7,60
36	7,11	7,37	7,13	7,17	7,63	7,15	7,23	7,43
60	6,91	7,37	7,14	7,31	7,83	7,36	7,59	7,71
72	7,14	7,46	7,44	7,57	7,78	7,73	8,00	7,89
84	7,53	7,67	7,63	7,69	7,80	7,73	7,90	7,85
108	7,54	7,66	7,64	7,70	7,78	7,73	7,86	7,82
120	7,58	7,67	7,63	7,73	7,76	7,80	7,85	7,80

* Para os tratamentos seguidos com a mesma letra, a média da diferença entre as curvas não diferem significativamente ($P > 0,05$) de acordo com a prova de significância de t de student.

APÊNDICE 20. Análise de variância dos valores de pH do meio de cultivo da estirpe SEMIA 587 de *B. japonicum* para diferentes velocidades de agitação após decorrido 12 horas de processo.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE	SOMA DE QUADRADOS	QUADRADO	F
Blocos	3	0,14725	0,04908	3,28*
Tratamentos	7	13,88315	1,98331	123,57**
Resíduo	21	0,31416	0,01496	
Total	31	14,34456		

* Significância a 5% de probabilidade.

** Significância a 1% de probabilidade.

APÊNDICE 21. Análise estatística da regressão obtida com a relação do pH, agitação e o logaritmo da concentração celular da estirpe SEMIA 587 de *B. japonicum*.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE	SOMA DE QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	F
Regressão	2	$1,46 \times 10^1$	7,2818	32,74**
Desvios	77	$1,71 \times 10^1$	0,2224	
Total	79	31,687268		

** Significância do valor do F-teste a 1% de probabilidade

APÊNDICE 22. Crescimento expresso em log nº de células por ml da estirpe SEMIA 587 de *Bradyrhizobium japonicum* para diferentes temperaturas de processo nos respectivos tempos de desenvolvimento. Cada valor corresponde à média de quatro observações.

TEMPO DE DESENVOLVIMENTO (horas)	log nº células/ml					
	22°C b*	26°C c	28°C a	30°C a	34°C d	38°C e
0	8,94	8,95	8,91	8,90	8,96	8,93
6	8,87	8,99	8,97	8,96	9,02	8,81
12	8,84	9,07	9,17	9,23	9,20	8,81
24	8,97	9,41	9,68	9,74	9,58	9,12
36	9,38	9,68	10,13	10,12	9,93	9,48
60	9,77	9,98	10,53	10,52	10,31	9,91
72	9,79	10,05	10,59	10,58	10,37	9,96
84	9,79	10,08	10,61	10,60	10,41	9,98
108	9,75	10,08	10,60	10,59	10,43	9,97
120	9,69	10,07	10,59	10,56	10,42	9,93

* Para os valores de temperatura seguidos com a mesma letra a média da diferença entre as curvas não diferem significativamente ($P > 0,05$) de acordo com a prova de significância de t de student.

APÊNDICE 23. Análise de variância dos valores da produtividade máxima da estirpe SEMIA 587 de *B. japonicum* para diferentes temperaturas de processo.

CAUSAS DE VARIÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE	SOMA DE QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	F
Blocos	3	$6,142 \times 10^{16}$	$2,05 \times 10^{16}$	0,63 ns
Tratamentos	5	$6,529 \times 10^{17}$	$1,31 \times 10^{17}$	4,00*
Resíduo	15	$4,896 \times 10^{17}$	$3,26 \times 10^{16}$	
Total	23	$1,204 \times 10^{18}$		

* Significância a 5% de probabilidade.

ns Não significativo a 5% de probabilidade.

APÊNDICE 24. Análise de variância dos valores da taxa de crescimento na fase exponencial da estirpe SEMIA 587 de *Bradyrhizobium japonicum* para diferentes temperaturas de operação.

CAUSAS DE VARIÇÃO	CAUSAS DE LIBERDADE	SOMA DE QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	F
Blocos	3	$2,036 \times 10^{17}$	$6,788 \times 10^{16}$	1,90 ns
Tratamentos	5	$8,141 \times 10^{17}$	$1,628 \times 10^{17}$	4,56 **
Resíduo	15	$5,356 \times 10^{17}$	$3,571 \times 10^{16}$	
Total	23	$1,553 \times 10^{18}$		

** Significância a 1% de probabilidade.

ns Não significativo a 5% de probabilidade.

APÊNDICE 25. Análise de variância dos valores do tempo de duração da fase de crescimento exponencial da estirpe SEMIA 587 de *Bradyrhizobium japonicum* para as diferentes temperaturas de operação.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE	SOMA DE QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	F
Blocos	3	977,2163	325,7387	12,27**
Tratamentos	5	530,5195	106,1039	3,99*
Resíduo	15	397,8896	26,5259	

* Significância a 5% de probabilidade.

** Significância a 1% de probabilidade.

APÊNDICE 26. Análise de variância dos valores do tempo de geração da estirpe SEMIA 587 de *Bradyrhizobium japonicum* para diferentes temperaturas de operação.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE	SOMA DE QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	F
Blocos	3	18,5613	6,1871	3,18 ns
Tratamentos	5	50,2620	10,0524	5,17**
Resíduo	15	29,1431	1,9429	
Total	23	97,9664		

** Significância a 1% de probabilidade.

ns Não significativo a 5% de probabilidade.

APÊNDICE 27. Análise de variância dos valores da velocidade específica de crescimento máxima (μm) da estirpe SEMIA 587 de *Bradyrhizobium japonicum* para diferentes temperaturas de operação.

CAUSAS DE VARIÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE	SOMA DE QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	F
Blocos	3	$1,79 \times 10^{-4}$	$5,97 \times 10^{-5}$	0,19 ns
Tratamentos	5	$6,65 \times 10^{-3}$	$1,33 \times 10^{-3}$	4,31**
Resíduo	15	$4,62 \times 10^{-3}$	$3,08 \times 10^{-4}$	
Total	23	$1,15 \times 10^{-2}$		

** Significância a 1% de probabilidade.

ns Não significativo a 5% de probabilidade.

APÊNDICE 28. Variação do pH para diferentes temperaturas de operação nos respectivos tempos de desenvolvimento da estirpe SEMIA 587 de *Bradyrhizobium japonicum*. Média de quatro repetições.

TEMPO DE DESENVOLVIMENTO (horas)	pH					
	22°C a*	26°C b	28°C c	30°C d	34°C d	38°C d
0	7,16	7,21	7,15	7,15	7,16	7,24
6	7,18	7,27	7,27	7,27	7,41	7,40
12	7,16	7,23	7,33	7,36	7,46	7,34
24	7,19	7,32	7,42	7,50	7,49	7,52
36	7,15	7,23	7,17	7,39	7,65	7,52
60	7,01	7,14	7,31	7,60	7,33	7,57
72	7,03	7,29	7,57	7,76	7,65	7,80
84	7,34	7,54	7,69	7,77	7,95	7,87
108	7,54	7,63	7,70	7,76	7,88	7,84
120	7,56	7,63	7,73	7,78	7,83	7,81

* Para os valores de pH seguidos com a mesma letra, a média da diferença entre as curvas não diferem significativamente ($P > 0,05$) de acordo com a prova de significância de t de student.

APÊNDICE 29. Análise de variância dos valores de pH do meio de cultivo da estirpe SEMIA 587 de *B. japonicum* para diferentes temperaturas de operação após decorrido 12 horas de processo.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE	SOMA DE QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	F
Blocos	3	0,5401	0,1800	45,00**
Tratamentos	5	0,2205	0,0441	11,03**
Resíduo	15	0,0600	0,0040	
Total	23	0,8202		

** Significância a 1% de probabilidade.

APÊNDICE 30. Análise estatística da regressão entre o pH, a temperatura e o logaritmo da concentração celular da estirpe SEMIA 587 de *B. japonicum*.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE	SOMA DE QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	F
Regressão	2	11,9828	5,9914	33,09**
Desvio	57	10,3213	0,1811	
Total	59	22,3041		

** Significância a 1% de probabilidade.

APÊNDICE 31. Crescimento celular, expresso em log nº células por ml de *Bradyrhizobium japonicum* nos respectivos tempos de desenvolvimento para os tratamentos com as estirpes SEMIA 587, SEMIA 5019 e com a mistura das duas. Média de quatro repetições.

TEMPO DE DESENVOLVIMENTO (horas)	TRATAMENTOS		
	SEMIA 587 a*	SEMIA 5019 b	MISTURA (587+5019) a
0	8,91	8,90	8,91
24	9,68	8,94	9,08
48	10,33	9,29	9,66
72	10,59	9,78	10,27
96	10,60	10,14	10,48
120	10,59	10,11	10,52

* Para os tratamentos seguidos com a mesma letra, a média da diferença entre as curvas não diferem significativamente ($P > 0,05$) de acordo com a prova de significância de t de student.

APÊNDICE 32. Análise de variância dos valores da taxa de crescimento na fase de crescimento exponencial para os diferentes tratamentos com estirpes de *Bradyrhizobium japonicum*.

CAUSA DE VARIÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE	SOMA DE QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	F
Blocos	3	$2,01 \times 10^{16}$	$6,70 \times 10^{15}$	6,79*
Tratamentos	2	$1,19 \times 10^{17}$	$5,95 \times 10^{16}$	60,31**
Resíduo	6	$5,92 \times 10^{15}$	$9,87 \times 10^{14}$	
Total	11	$1,45 \times 10^{17}$		

* Significância a 5% de probabilidade.

** Significância a 1% de probabilidade.

APÊNDICE 33. Análise de variância dos valores de duração de fase de crescimento exponencial para os diferentes tratamentos com estirpes de *B. japonicum*.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE	SOMA DE QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	F
Blocos	3	54,1960	18,0653	0,99 ns
Tratamentos	2	2578,7915	1289,3958	70,96**
Resíduo	6	109,0232	18,1705	
Total	11	2742,0107		

ns Não significativo à 5% de probabilidade.

** Significância à 1% de probabilidade.

APÊNDICE 34. Análise de variância dos valores da velocidade específica máxima (μm) para os tratamentos com estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* em fermentador.

CAUSAS DE VARIÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE	SOMA DE QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	F
Blocos	3	0,00188	0,00006	0,16 ns
Tratamentos	2	0,00559	0,00280	7,37 *
Resíduo	6	0,00229	0,00038	
Total	11	0,00977		

* Significância à 5% de probabilidade.

ns Não significativo a 5% de probabilidade.

APÊNDICE 35. Análise de variância dos valores da produtividade máxima para os tratamentos com estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* em fermentador.

CAUSAS DE VARIÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE	SOMA DE QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	F
Blocos	3	$2,38 \times 10^{22}$	$7,93 \times 10^{21}$	4,13 ns
Tratamentos	2	$1,46 \times 10^{23}$	$7,34 \times 10^{22}$	38,18 **
Resíduo	6	$1,15 \times 10^{22}$	$1,92 \times 10^{21}$	
Total	11	$1,82 \times 10^{23}$		

** Significância a 1% de probabilidade.

ns Não significativo à 5% de probabilidade.

APÊNDICE 36. Análise de variância dos valores do tempo geração para os tratamentos com estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* em fermentador.

CAUSAS DE VARIACÃO	GRAUS DE LIBERDADE	SOMA DE QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	F
Blocos	3	0,1888	0,0629	1,31 ns
Tratamento	2	98,6315	49,3158	1027,4 **
Resíduo	6	0,2880	0,0480	
Total	11	98,9194		

** Significância à 1% de probabilidade.

ns Não significativo à 5% de probabilidade.

APÊNDICE 37. Concentração de substrato consumido, expresso em gramas de glicerol por litro de meio, para os tratamentos com a estirpe SEMIA 587, SEMIA 5019 e com a mistura das duas, nos respectivos tempos de desenvolvimento. Média de quatro repetições.

TEMPO DE DESENVOLVIMENTO (horas)	TRATAMENTOS		
	SEMIA 587 a*	SEMIA 5019 b	MISTURA (587+5019) b
0	9,93	10,27	10,07
24	9,37	10,06	9,98
48	7,35	9,46	9,07
72	3,83	8,50	6,53
96	1,76	5,90	2,46
120	1,00	4,40	1,34

* Para os tratamentos seguidos com a mesma letra, a média da diferença entre as curvas, não diferem significativamente ($P=0,05$) de acordo com a prova de significância de t de student.

APÊNDICE 38. Análise de variância dos valores de rendimento celular em função do substrato consumido para os diferentes tratamentos com estirpes de *B. japonicum*.

CAUSAS DE VARIÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE	SOMA DE QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	F
Blocos	3	0,0070	0,0023	0,28 ns
Tratamentos	2	0,0289	0,0145	1,76 ns
Resíduo	6	0,0493	0,0082	
Total	11	0,0852		

ns Não significativo à 5% de probabilidade.

APÊNDICE 39. Crescimento celular, expresso em log nº cel/ml, das estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 contidas no tratamento mistura nos respectivos tempos de desenvolvimento.

TEMPO DE DESENVOLVIMENTO (horas)	log nº cel/ml		
	MISTURA (587+5019) a*	CONCENTRAÇÃO PARCIAL	
		SEMIA 587 b	SEMIA 5019 b
0	8,91	8,61	8,61
24	9,08	8,81	8,75
48	9,66	9,39	9,33
72	10,27	10,04	9,89
96	10,48	10,29	10,02
120	10,52	10,36	10,01

* Para os tratamentos seguidos com a mesma letra, a média da diferença entre as curvas não diferem significativamente ($P > 0,05$) de acordo com a prova de significância de t de student.

APÊNDICE 40. Valores de pH para os tratamentos isolados e em conjunto das estirpes SEMIA 587 e 5019 em função do tempo de desenvolvimento do processo fermentativo. Média de quatro repetições.

TEMPO DE DESENVOLVIMENTO (horas)	TRATAMENTOS		
	SEMIA 587 ab*	SEMIA 5019 b	MISTURA a
0	7,15	7,18	7,19
24	7,42	7,51	7,32
48	7,24	7,51	7,35
72	7,57	7,60	7,46
96	7,70	7,62	7,57
120	7,73	7,72	7,65

* Para os tratamentos seguidos com a mesma letra, a média da diferença entre as curvas não diferem significativamente ($P > 0,05$) de acordo com a prova de significância de t de student.

APÊNDICE 41. Análise de variância do número de nódulos em resposta à inoculação com estirpes de *B. japonicum* em soja da cultivar Bragg.

CAUSAS DE VARIÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE	SOMA DE QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	F
Blocos	4	13939,00	3484,75	5,57**
Tratamentos	5	15646,67	3129,33	5,00**
Resíduo	20	12517,40	625,87	
Total	29	42103,07		

** Significância à 1% de probabilidade.

APÊNDICE 42. Análise de variância do peso de nódulos em resposta à inoculação com estirpes de *B. japonicum* em soja da cultivar Bragg.

CAUSAS DE VARIÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE	SOMA DE QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	F
Blocos	4	405957	101489,25	19,55**
Tratamentos	5	129810	25962,00	5,00**
Resíduo	20	103848	5192,40	
Total	29	639615		

** Significância à 1% de probabilidade.

APÊNDICE 43. Análise de variância do rendimento de matéria seca da parte aérea (g/vaso), em resposta à inoculação com estirpes de *B. japonicum*.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE	SOMA DE QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	F
Blocos	4	42,76	10,69	3,92*
Tratamentos	7	85,01	12,14	4,45**
Resíduo	28	76,40	2,73	
Total	39	204,17		

* Significância à 5% de probabilidade.

** Significância à 1% de probabilidade.

APÊNDICE 44. Análise de variância do nitrogênio total da parte aérea em resposta à inoculação com estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* em soja da cultivar Bragg.

CAUSAS DE VARIÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE	SOMA DE QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	F
Blocos	4	83544,50	20886,13	4,78**
Tratamento	7	158479,37	22639,91	5,18**
Resíduo	28	122275,44	4366,98	
Total	39	364299,31		

** Significância à 1% de probabilidade.

APÊNDICE 45. Sobrevivência do *Bradyrhizobium japonicum* em turfa estéril pra os diferentes tratamentos, expressa em log nº células por grama de inoculante, durante o período de incubação. Média de quatro repetições.

PERÍODO DE INCUBAÇÃO (dias)	TRATAMENTOS			
	SEMIA 587 a*	SEMIA 5019 b	TF1 a	TP2 b
0	9,54	9,51	9,51	9,50
15	10,53	9,78	9,84	9,63
30	10,48	9,69	9,95	9,55
60	10,15	9,14	9,88	9,61
90	9,73	8,76	9,68	9,39
120	9,57	8,65	9,56	9,10
150	9,48	8,60	9,44	9,06
180	9,34	8,55	9,24	8,75

* Para os tratamentos seguidos com a mesma letra, a média da diferença entre as curvas não diferem significativamente ($P > 0,05$) de acordo com a prova de significância de t de student.

APÊNDICE 46. Análise de variância dos valores da taxa semanal de mortalidade para os diferentes experimentos em turfa estéril.

CAUSAS DE VARIÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE	SOMA DE QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	F
Blocos	3	0,0055	0,0018	0,33 ns
Tratamentos	3	0,0461	0,0154	2,80 ns
Resíduo	9	0,0491	0,0055	
Total	15	0,1007		

ns Não significativo à 5% de probabilidade.

APÊNDICE 47. Sobrevivência expressa em log nº células/g de inoculante, das estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 contidas no tratamento TF1 nos respectivos tempos de incubação.

PERÍODO DE INCUBAÇÃO (dias)	log nº células/g		
	TRATAMENTO TF1 a*	CONCENTRAÇÃO PARCIAL	
		SEMIA 587 a	SEMIA 5019 b
0	9,51	9,36	8,99
15	9,84	9,69	9,30
30	9,95	9,82	9,38
60	9,88	9,77	9,21
90	9,68	9,61	8,86
120	9,56	9,51	8,60
150	9,44	9,39	8,47
180	9,24	9,19	8,25

* Para os tratamentos seguidos com a mesma letra, a média da diferença entre as curvas não difere significativamente ($P > 0,05$) de acordo com a prova de significância de t de student.

APÊNDICE 48. Sobrevivência de *Bradyrhizobium japonicum* em turfa estéril, expressa em log nº células/g de inoculante, das estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 contidas no tratamento TP2 nos respectivos períodos de incubação.

PERÍODO DE INCUBAÇÃO (dias)	log nº células/g		
	TRATAMENTO TP2 a*	CONCENTRAÇÃO PARCIAL	
		SEMIA 587 b	SEMIA 5019 b
0	9,50	9,20	9,20
15	9,63	9,35	9,30
30	9,55	9,31	9,18
60	9,61	9,39	9,20
90	9,39	9,19	8,96
120	9,10	8,91	8,66
150	9,06	8,87	8,61
180	8,75	8,56	8,29

* Para os tratamentos seguidos com a mesma letra, a média da diferença entre as curvas não diferem significativamente ($P > 0,05$) de acordo com a prova de significância de t de student.

APÊNDICE 49 - Sobrevivência, expressa em log nº células/g de inoculante, das estirpes SEMIA 587 e SEMIA contidas no tratamento TF1 nos respectivos tempos de incubação.

PERÍODO DE INCUBAÇÃO	log nº células/g		
	TRATAMENTO TF1 a*	CONCENTRAÇÃO PARCIAL	
		SEMIA 587 a	SEMIA 5019 b
0	9,51	9,36	8,99
15	9,84	9,69	9,30
30	9,95	9,82	9,38
60	9,88	9,77	9,21
90	9,68	9,61	8,86
120	9,56	9,51	8,60
150	9,44	9,39	8,47
180	9,24	9,19	8,25

* Para os tratamentos seguidos com a mesma letra, a média da diferença entre as curvas não diferem significativamente ($P > 0,05$) de acordo com a prova de significância de t de student.

APÊNDICE 50. Sobrevivência de *Bradyrhizobium japonicum* em turfa estéril, expressa em log nº células/g de inoculante, das estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 contidas no tratamento TP2 nos respectivos períodos de incubação.

PERÍODO DE INCUBAÇÃO (dias)	log nº células/g		
	TRATAMENTO TP2 a*	CONCENTRAÇÃO PARCIAL	
		SEMIA 587 b	SEMIA 5019 b
0	9,50	9,20	9,20
15	9,63	9,35	9,30
30	9,55	9,31	9,18
60	9,61	9,39	9,20
90	9,39	9,19	8,96
120	9,10	8,91	8,66
150	9,06	8,87	8,61
180	8,75	8,56	8,29

* Para os tratamentos seguidos com a mesma letra, a média da diferença entre as curvas não diferem significativamente ($P > 0,05$) de acordo com a prova de significância de t de student.