



PEDRO MARTINS SOUSA

**OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE
CÉLULAS DAS ESTIRPES DE *Bradyrhizobium* INPA 3-
11B E UFLA 3-84, INOCULANTES DO FEIJÃO-CAUPI**

**LAVRAS – MG
2011**

PEDRO MARTINS SOUSA

**OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CÉLULAS DAS
ESTIRPES DE *Bradyrhizobium* INPA 3-11B E UFLA 3-84,
INOCULANTES DO FEIJÃO-CAUPI**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Biotecnologia de Micro-organismos Aplicada à Agropecuária e ao Meio Ambiente, para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora

Dra. Fatima Maria de Souza Moreira

Coorientadores

Dr. Disney Ribeiro Dias

Dra. Rosane Freitas Schwan

Dr. José Guilherme Lembi Ferreira Alves

LAVRAS – MG

2011

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Sousa, Pedro Martins.

Otimização do processo de produção de células das estirpes de *Bradyrhizobium* INPA 3-11B e UFLA 3-84, inoculantes do feijão-caupi / Pedro Martins Sousa. – Lavras : UFLA, 2011.

141 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Fatima Maria de Souza Moreira.

Bibliografia.

1. Feijão-caupi. 2. Plackett-Burman. 3. Bactérias fixadoras de nitrogênio. 4. Inoculante. 5. Metodologia de superfície de resposta.
I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 589.95

PEDRO MARTINS SOUSA

**OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CÉLULAS DAS
ESTIRPES DE *Bradyrhizobium* INPA 3-11B E UFLA 3-84,
INOCULANTES DO FEIJÃO-CAUPI**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Biotecnologia de Micro-organismos Aplicada à Agropecuária e ao Meio Ambiente, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 13 de dezembro de 2011.

Dr. Disney Ribeiro Dias	UFLA
Dr. José Guilherme Lembi Ferreira Alves	UFLA
Dr. Messias José Bastos de Andrade	UFLA
Dra. Lílian de Araújo Pantoja	UFVJM

Dra. Fatima Maria de Souza Moreira
Orientadora

**LAVRAS – MG
2011**

A minha mãe, Raimunda M. Sousa, pela vida proporcionada.

In Memoriam à Mãe Velha, por mostrar o caminho.

À tia Iraci, pelos ensinamentos e conselhos.

À Osana e as minhas queridas filhas,

Ailla Rahinne, Allana Caroline e

Vitória, pela compreensão,

companhia e paciência.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola pela oportunidade de cursar o Doutorado. Ao CNPq/MAPA, projeto edital 64, processo nº 578635/2008-9, pelo recurso financeiro.

Ao coordenador do Programa de Microbiologia Agrícola, professor Eustáquio S. Dias e à professora Rosane F. Schwan, por acreditarem em mim. À professora Fatima, por acreditar e continuar me orientando.

Aos professores Romildo, Patrícia, Disney, Cristina, José Guilherme, pelos ensinamentos e a todos os docentes que contribuíram para a minha formação acadêmica. Também àqueles que participaram de minha formação básica, representados pelas professoras Maria Figueira, Maria Santana, Oldeir e professor Luís Carlos (Luisinho). E aos meus ex-professores de graduação, representados por Fernando Frieiro, Maria Cristina, Marcelo Nivert e Herena Naoco.

Aos membros da banca pela disponibilidade em avaliar e colaborar para com a melhoria do nosso trabalho.

Aos amigos e colegas de longa data, Euziclei, Francisco, Marinês, Florinda, Sebastiana, Damarci, Irene, Teresinha, pelo apoio e amizade. Aos demais colegas e profissionais de educação, atuantes e aposentados da Escola Estadual 29 de Julho, Confresa – MT e, principalmente àqueles que torceram e acreditaram em mim.

Em nome da Secretaria de Educação do Estado de Mato Grosso e Escola Estadual 29 de Julho, Confresa – MT, ao Governo do Estado de Mato Grosso, por oportunizar qualificação aos profissionais de educação.

Às técnicas do Laboratório de Microbiologia Agrícola, Ivani pela atenção e Cidinha, pelo seu incentivo e bondade. À Marlene e Manoel, do

Laboratório de Microbiologia do Solo, pelo auxílio. E ao amigo Lamartine, técnico do Laboratório de Genética, pela confiança e colaboração.

Às Secretárias do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, Rose e Magda (ex), pelo profissionalismo, carisma e bondade.

Aos colegas Rogério, Silvia, Teotônio, Wesley, pela cooperação e amizade. Aos colegas de curso e/ou de convívio acadêmico durante estes anos de Pós-Graduação: Krisle, Amanda, Fernanda, Cíntia, Márcia, Paulo, Plínio, Cândido, Gláucia, Paula Rose, Jessé, Wesley, Patrícia, Ligiane, Cássia, Jerusa, Maurício, Bruno, Emerson (Japa), Marco, Angélica, Thiago, Leandro, Jaqueline, Karina Barroso, Maíra, Maiara, Leonardo. Enfim, a todos que, de alguma forma, contribuíram para essa conquista.

Aos familiares que são base de nossa sustentação, que estão sempre prontos para nos ajudar de alguma maneira. Sempre prontos para nos dar a mão, motivando para que o caminho seja seguido. À Caçula, Neguinha, Mista, Preta, Elsinho, Eliana, Heleneusa, Helena, tio Cícero, Santana, tio Batista, Teresinha, Antônio, Luíza, Almi, tio Zeca e Família, Melquíades, Ezequias, Samuel, Sebastião, Maria e Família, Elina, e também aos demais integrantes da família, cujos nomes não constam, sintam-se parte importante desta vitória.

MUITO OBRIGADO!

RESUMO

O feijão-caupi, *Vigna unguiculata* (L.) Walp., é uma cultura de importância socioeconômica, principalmente para as populações das regiões Norte e Nordeste, e beneficia-se da fixação biológica de nitrogênio. Mas, é cultivado, em geral, com baixa tecnologia, resultando em baixa produtividade. Existem mais de 100 estirpes microbianas aprovadas para produção de inoculantes, mas a indústria pouco produz para outras culturas, além da soja, como é o caso do feijão-caupi, e, cujas estirpes foram pouco estudadas com intuito de padronizar o processo de produção de células. O objetivo do trabalho foi otimizar as condições de cultivo das estirpes de *Bradyrhizobium* INPA 03-11B e UFLA 3-84, inoculantes do feijão-caupi, utilizando um meio de cultura líquido e planejamentos experimentais. Com o delineamento Plackett-Burman avaliou-se a temperatura, agitação, glicerol, extrato de levedura, inóculo e pH para ambas as estirpes, e ao estudo da estirpe UFLA 3-84, foi incluída solução de micronutrientes. Selecionou-se a agitação e o extrato de levedura para INPA 3-11B, respectivamente por apresentar efeito estatisticamente significativo sobre crescimento celular e efeito próximo da significância e importância no metabolismo. Para a UFLA 3-84, selecionou-se a agitação por apresentar efeito altamente significativo sobre a biomassa e contagem de células em unidade formadora de colônias (UFC mL⁻¹) e, o glicerol e extrato de levedura, porque foram as duas variáveis que apresentaram efeitos sobre a biomassa celular, mais próximos da significância. Após a triagem, foi utilizado o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para estudo das variáveis selecionadas para as duas estirpes e os resultados da INPA 3-11B otimizados, empregando-se a Metodologia de Superfície de Resposta, seguido de validação experimental dos modelos. A estirpe INPA 3-11B atingiu população superior a $1,0 \times 10^{10}$ UFC mL⁻¹ com 96 horas, prevalecendo após 120h, utilizando o meio de cultura líquido contendo 8,0 g L⁻¹ de glicerol, 5,0 g L⁻¹ de extrato de levedura e 4% de inóculo. A faixa ótima para biomassa, com a agitação entre 170 e 180 rpm e a concentração de extrato de levedura de 5 g L⁻¹. A UFLA 3-84, também apresentou crescimento populacional superior $1,0 \times 10^{10}$ UFC mL⁻¹ e biomassa de 3,0 g L⁻¹, com pH inicial do meio justado para 6,8, incubado a 28 °C, mas com agitação de 170 rpm. As concentrações de glicerol, extrato de levedura, inóculo e micronutrientes, foram diferentes, respectivamente, 7,0 g L⁻¹, 2 g L⁻¹, 1% e 1,0 mL L⁻¹. Para as duas estirpes estudadas, a produção de 1×10^9 log UFC mL⁻¹, que é a densidade celular mínima exigida pelo Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para a produção de inoculantes comerciais, é obtida em 96 horas.

Palavras-chave: Feijão-caupi. *Bradyrhizobium* sp. Inoculante. Plackett-Burman. Metodologia de Superfície de Resposta.

ABSTRACT

The cowpea, *Vigna unguiculata* (L.) Walp., is a crop of socioeconomic importance, especially for the populations of North and Northeast regions, and benefits from biological fixation of nitrogen. However, it is cultivated, in general, with low technology, resulting in low productivity. There are over 100 approved microbial strains for production of inoculants, but the industry produces some other crops, in addition to soybeans, as is the case of cowpea, whose strains which have been little studied in order to standardize the process of cell production. The objective of this study was to optimize the cultivation conditions of *Bradyrhizobium* strains INPA 03-11B and UFLA 3-84, inoculants of cowpea, using a liquid culture medium and experimental design. Using Plackett-Burman design, were evaluated the temperature, agitation, yeast extract, inoculums and pH for both strains, and the study of strains UFLA 3-84, was included micronutrients solution. It was selected the agitation and the yeast extract for INPA 3-11B, respectively, by presenting statistically significant effect on cell growth and effect close to significance and importance in metabolism. For the UFLA 3-84, the agitation was selected for presenting highly significant effect on biomass and cell count of rhizobia CFU mL⁻¹ and the glycerol and yeast extract, because were the two variables that had effects on cell biomass, more close to significance. After screening, it was used a Central Composite Rotational Design for the study of variables selected for the two strains and the results of the INPA 3-11B were optimized, using the Response Surface Methodology, followed by experimental validation of the models. The strains INPA 3-11B reached a population over to 1.0 x 10¹⁰ CFU mL⁻¹ with 96 hours, prevailing after 120h, using the liquid culture medium with 8.0 g L⁻¹ of glycerol, 5.0 g L⁻¹ of yeast extract and 4% inoculums. The optimum range for biomass with the agitation between 170 and 180 rpm, and the concentration of yeast extract 5 g L⁻¹. The UFLA 3-84, also showed a population growth higher than 1.0 x 10¹⁰ CFU mL⁻¹ and biomass of 3.0 g L⁻¹, medium initial pH adjusted to 6.8, incubated at 28 °C, but with agitation of 170 rpm. The concentrations of glycerol, yeast extract, inoculums and micronutrients were, different respectively, 7.0 g L⁻¹, 2 g L⁻¹, 1 % and 1.0 mL L⁻¹. For the two strains studied, the production of 1 x 10⁹ log CFU mL⁻¹, which is the minimum cell density required by the Department of Agriculture, Livestock and Supply for the production of commercial inoculants was obtained in 96 hours.

Keywords: Cowpea. *Bradyrhizobium* sp.. Inoculant. Plackett-Burman. Response Surface Methodology.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	10
1 INTRODUÇÃO	10
2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 Feijão-caupi	14
2.2 Produção de feijão-caupi.....	15
2.3 Fixação biológica de nitrogênio	17
2.4 Inoculante	21
2.4.1 Aspectos gerais	21
2.4.2 Produção e comercialização de inoculantes para leguminosas.....	24
2.4.3 Inoculação do feijão-caupi	37
2.5 Características gerais e metabólicas das Bactérias Nodulíferas de Leguminosas (BNL)	41
2.6 Otimização de processos.....	46
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	51
REFERÊNCIAS	52
SEGUNDA PARTE	65
ARTIGO 1 Otimização do cultivo da estirpe de <i>Bradyrhizobium</i> INPA 03-11B, inoculante do feijão-caupi usando a metodologia de superfície de resposta	65
ARTIGO 2 Otimização do cultivo da estirpe de <i>Bradyrhizobium</i> UFLA 3-84, inoculante do feijão-caupi	102

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A sociedade humana atingiu um nível de conhecimento muito avançado, que dispõe de diversas tecnologias, aplicáveis em várias áreas, tais como, na indústria alimentícia, pecuária, medicina e agricultura. Muitas das tecnologias disponíveis têm seu princípio básico no uso de recursos naturais, explorando diversos tipos de ecossistemas e organismos, como animais, plantas e micro-organismos, visando a elaboração de manufaturados. Dentre as diversas tecnologias que envolvem organismos, há aquelas em que se utilizam micro-organismos, geneticamente modificados ou não, para melhorar a produção agrícola. Todas as tecnologias de alguma maneira são elaboradas mediante estudos prévios, baseados em metodologias de trabalho que permitem a obtenção de resultados e análises confiáveis. Graças aos avanços científicos, à medida que o tempo vai passando, são estabelecidas e adotadas novas metodologias, que demonstram ser mais eficientes na obtenção dos resultados e fornecimento de análises mais confiáveis.

Em relação à agricultura, observa-se um nível de desenvolvimento muito importante, baseando-se no uso de técnicas avançadas e busca de inovações, impulsionadas por práticas e políticas agrícolas que permitiram e permitem aumentos significativos na produtividade. Em diversos casos o sistema produtivo promove produção suficiente para suprir a demanda da sociedade e até gerando excedentes. No Brasil, é evidente a importância de diversas culturas que produzem grãos, como arroz, feijão, feijão-caupi, soja e milho, sendo um dos maiores produtores e exportadores mundiais de grãos. Os grãos, em geral, são utilizados para a alimentação humana, e até animal.

Dentre as diversas espécies vegetais produtoras de grãos cultivadas no Brasil, as leguminosas exercem um papel decisivo na economia, e, em alguns casos, de extrema importância para a segurança alimentar de populações humanas de vários estados brasileiros. Uma das culturas que merecem destaque é o feijão-caupi, muito cultivado e consumido nas regiões Norte e Nordeste, principalmente pelas de baixa renda. É uma cultura, que também está em expansão na região Centro-Oeste. Nas duas primeiras regiões, o feijão-caupi constitui-se como uma das principais leguminosas utilizadas na dieta alimentar humana. Dentre as propriedades proteicas se destaca como uma excelente fonte de proteínas, tendo em média 25%, e apresenta todos os aminoácidos essenciais. Os grãos desta espécie são comercializados no local, exercendo também um impacto socioeconômico muito importante. Além disso, o feijão-caupi é utilizado como forragem, adubação verde, recuperação de pastagens e proteção do solo.

A espécie feijão-caupi, apresenta algumas características importantes, que a torna uma cultura de fácil manejo e de baixo custo. É considerada uma cultura rústica, apresentando baixa exigência hídrica e capacidade para se desenvolver em solos com baixa fertilidade e ácidos. Ela se beneficia do processo de fixação biológica de nitrogênio atmosférico em simbiose com bactérias do gênero *Bradyrhizobium*. A simbiose estabelecida é primordial para assegurar o desenvolvimento vegetal e a produção de grãos satisfatória. Sendo um aspecto muito importante, uma vez que a maior parte dos solos agricultáveis no Brasil apresenta baixa fertilidade e é ácida. A produtividade de feijão-caupi inoculado com bactérias fixadoras de nitrogênio selecionadas e aprovadas pode atingir até 2 mil kg ha⁻¹ de grãos. Porém, a média nacional é muito baixa, em torno de 500 kg ha⁻¹ e, o manejo é basicamente, o de baixa tecnologia. Felizmente, o problema da baixa produtividade pode ser contornado com a adoção de conhecimento e tecnologias disponíveis. Tecnologias estas que podem

contribuir para o aumento da produção e produtividade do feijão-caupi no Brasil, assim como, contendo a expansão do uso para novas áreas e não causando impactos negativos ao ambiente.

Uma das alternativas possíveis para o aumento da produção e produtividade do feijão-caupi é a utilização de micro-organismos que estão associados a diversos tipos de culturas na forma de tecnologias ecologicamente corretas e economicamente viáveis, como é o caso da inoculação com bactérias fixadoras de N₂. Essa biotecnologia baseia-se no uso de inoculante, contendo rizóbios selecionados por instituições públicas de pesquisas e aprovadas pelo Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento, com comprovada eficiência na fixação biológica de nitrogênio atmosférico, em simbiose com leguminosas específicas.

No entanto, mesmo havendo estirpes bacterianas aprovadas para cerca de 100 leguminosas, a produção de inoculante é praticamente restrita à cultura da soja, por se tratar de uma cultura de grande impacto na balança comercial, principalmente por ser produzida por grandes produtores. Dessa forma, a soja recebeu e recebe investimentos de todos os setores envolvidos na linha de produção, incluindo a indústria de inoculantes. Ao contrário, a cultura do feijão-caupi, que é praticada, em geral, com baixa tecnologia e por pequenos produtores de áreas mais pobres do Brasil, não tem recebido muito investimento governamental e privado, seja no cultivo, no consumo ou na adoção de técnicas modernas, principalmente as que apresentam baixo impacto negativo. Sendo assim, a produção de inoculantes para essa cultura tem sido negligenciada por não se traduzirem em grandes lucros aos produtores e importadores do produto, uma vez, que a produção e comercialização não se baseiam em grandes volumes.

O agricultor de feijão-caupi, portanto não adota a biotecnologia de inoculação, seja por falta de incentivos, por falta de acesso ao produto e pelo próprio desconhecimento de sua existência. Esses fatos comprometem

negativamente os estudos e investimentos em processos fermentativos com estirpes simbióticas de feijão-caupi. Por outro lado, essas lacunas podem ser preenchidas pelas instituições de ensino e pesquisa, que há vários anos desenvolvem estudos com rizóbios, aperfeiçoam as biotecnologias de inoculação e ampliam suas atividades de extensão agrícola para o pequeno e médio agricultor.

Portanto, dentro deste contexto, o objetivo do trabalho foi padronizar e otimizar o processo de produção de células de *Bradyrhizobium*, estirpes INPA 3-11B e UFLA 3-84, aprovadas como inoculantes de feijão-caupi, uma cultura de grande relevância socioeconômica para o Brasil. Este objetivo está inter-relacionado com a proposta do Projeto CNPq/MAPA processo 578635/2008-9, que tem como meta 1, descrita na página 29: implantar na UFLA, uma microempresa associada ao setor de microbiologia do solo para ampliar a capacidade do setor em produzir inoculantes em pequena e média escala dentro dos padrões de qualidade estabelecidos pelo MAPA. Essa padronização seguiu delineamentos estatísticos sequenciais, com intuito de reduzir custos e observar as interações entre as diferentes variáveis do processo. Foram utilizados o Plackett-Burman (PB) para triagem das variáveis mais importantes e o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para otimização. Os resultados foram analisados pela Metodologia de Superfície de Resposta (MSR), seguido de uma validação experimental.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Feijão-caupi

A leguminosa feijão-caupi, também conhecida como feijão-de-corda, feijão-macáçar, feijão-da-estrada, feijão-de-praia, feijão-de-rama ou feijão-catador é uma cultura extremamente rústica, tolerante a altas temperaturas, à seca, e com grande potencial adaptativo e de adaptação e de expansão das áreas atualmente exploradas (CRAVO et al., 2009; FREIRE FILHO et al., 2005; SINGH et al., 2002). O feijão-caupi é caracterizado como planta Dicotyledonea, ordem Fabales, família Fabaceae, subfamília Faboideae, tribo Phaseoleae, subtribo Phaseolina, gênero *Vigna*, subgênero *Vigna*, secção *Catiang*, espécie *Vigna unguiculata* (L.) Walp. É uma espécie originária do continente Africano, provavelmente da região de Transval, na República da África do Sul (CRAVO et al., 2009; PADULOSI; NG, 1997).

A introdução do feijão no Brasil ocorreu possivelmente pelos colonizadores portugueses, no século XVI, no estado da Bahia (FREIRE FILHO et al., 2005). É uma importante cultura alimentar e constitui a principal fonte de proteína na dieta de populações pobres especialmente na América Latina e África. Contudo, é uma cultura que apresenta baixa produtividade, principalmente no nordeste brasileiro. A produção está ligada a pequenas e médias propriedades que geralmente utilizam baixo nível tecnológico (ANDRADE JÚNIOR et al., 2003; INAIZUMI et al., 1999). O feijão-caupi, geralmente, é cultivado para subsistência por comunidades mais pobres de várias regiões, como África, Ásia e América Central e do Sul (ANDRADE JÚNIOR et al., 2003; INAIZUMI et al., 1999).

Atualmente é cultivado em praticamente todo Brasil, principalmente nas regiões Norte e Nordeste. Nos últimos anos, o seu cultivo tem aumentando

significativamente na região Centro-Oeste, sendo o estado de Mato Grosso um dos principais produtores, ocupando o segundo lugar no *ranking*, com previsão de se tornar o maior produtor nacional de grãos dessa cultura (FILGUEIRAS et al., 2009).

2.2 Produção de feijão-caupi

O Brasil é considerado o terceiro maior produtor mundial de feijão-caupi. Estima-se que a área colhida com feijão-caupi seja de 1.500 mil hectares anualmente (SINGH et al., 2002), com produção de aproximadamente 1 milhão de toneladas ano⁻¹. Dados mais recentes demonstram que a produção nacional total de feijão (feijão-caupi + feijão comum) é estimada em 3.139 mil ton, sendo dessa, cerca de 30% correspondente à de feijão-caupi, 1 milhão de toneladas. Essa produção ainda é inferior à demanda, cujo déficit é suprido pela importação (ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS PRODUTORES E IMPORTADORES DE INOCULANTES - ANPII, 2011; FILGUEIRAS et al., 2009). Assim como a mundial (média de 478 kg ha⁻¹), a produtividade do feijão-caupi no Brasil é considerada muito baixa, principalmente nas regiões Norte e Nordeste, onde a produtividade média, assim como a nacional, é de cerca de 500 kg ha⁻¹. Esse fato deve-se às condições de cultivo, que em geral ocorre sem adoção de tecnologias agrícolas modernas (FREIRE FILHO et al., 2005).

Vale destacar também que nos estados da Amazônia Brasileira, o cultivo do feijão-caupi ocupa uma área de aproximadamente 150 mil hectares, o que representa mais de 50% dos 285 mil hectares de área cultivada com feijão, com uma produção estimada para a safra 2007/2008 em 130 mil ton de grãos. Há Estados como é o caso do Amazonas, Amapá, Roraima e Maranhão, em que o cultivo representa 100%, com produtividade média de 820 kg ha⁻¹. Mas, os dados por Estado variam de 487 kg ha⁻¹ no MA a mais de 1.200 kg ha⁻¹, em

Mato Grosso. A média do MA é semelhante às médias de produtividade obtidas nos demais estados do nordeste (CRAVO et al., 2009; FILGUEIRAS et al., 2009; FREIRE FILHO et al., 2005) e um dos fatores responsáveis pela baixa produtividade é a baixa fertilidade natural e os teores de matéria orgânica dos solos, especialmente em áreas de cerrado.

No entanto, em condições experimentais e lavouras com uso de tecnologia moderna, o feijão-caupi tem apresentado alto potencial produtivo em outros estados, como o alcançado em MT, estimada em 1.200 kg ha⁻¹ (CRAVO et al., 2009; FILGUEIRAS et al., 2009). Do mesmo modo, vários resultados de pesquisa utilizando inoculantes têm demonstrado rendimentos expressivos que variam de 900 a 1.900 kg ha⁻¹ (ALMEIDA et al., 2010; COSTA et al., 2011; LACERDA et al., 2004; SOARES et al., 2006).

Em ensaios de campo, com utilização do processo de Fixação Biológica de Nitrogênio atmosférico (FBN) promovido pela inoculação de estirpes selecionadas, simbiontes de feijão-caupi, o rendimento de grãos variou de cerca de 900 kg ha⁻¹ a 1.300 kg ha⁻¹, no Sul de Minas (LACERDA et al., 2004; SOARES et al., 2006). Em outras regiões, como no estado de Roraima, Zilli, Xavier e Rumjanek (2006) trabalhando com 5 estirpes, incluindo a INPA 3-11B e UFLA 3-84, alcançaram rendimento de grãos bem expressivo, entre 1.650 e 2.330 kg ha⁻¹ em área de cerrado, e 1626 a 1.727 kg ha⁻¹ em área de mata. Portanto, nota-se o grande potencial da biotecnologia de inoculação no feijão-caupi, que pode ser cultivado com baixíssimo custo e sem impacto ambiental negativo, sendo imprescindível disponibilizar esta biotecnologia para pequenos agricultores (FREIRE FILHO et al., 2005; MOREIRA, 2005), estabelecendo meios que possibilitem o conhecimento prático, o acesso à tecnologia e ao inoculante, assim como a possível apropriação do conhecimento da inoculação, permitindo a adoção em seus sistemas de cultivo.

2.3 Fixação biológica de nitrogênio

A fixação biológica de nitrogênio (N_2) atmosférico (FBN) é um processo bioquímico natural e essencial, desenvolvido por uma parcela de bactérias que podem ser encontradas em vários ambientes, vivendo livremente ou associadas a outros seres vivos, por exemplo, em simbiose com leguminosas. É um processo muito importante para a manutenção da vida no planeta e apresenta vários benefícios, relacionados à nutrição dos organismos e fertilidade do solo. Além disso, faz parte do ciclo do nitrogênio, do qual outros elementos de grande importância para os ecossistemas, como o Carbono dependem (GRUBER; GALLOWAY, 2008). As bactérias são organismos pertencentes ao grupo dos Procariotos, podendo ser unicelulares, miceliais, filamentosas ou formadoras de colônias. São microscópicas, com tamanho variando de 0,2 a 10,0 μm (DROZDOWICZ, 1997; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006), e juntamente com os fungos, representam de 25-30% da biomassa microbiana total dos solos agrícolas (SIQUEIRA; FRANCO, 1988). Na figura 1 são representados os diferentes organismos fixadores de nitrogênio atmosférico encontrados nos sistemas agrícolas ou ecossistemas naturais.

As bactérias responsáveis pela FBN em simbiose com leguminosas compõem um grupo de micro-organismos Gram-negativo (-) que podem ser encontrados naturalmente nos solos dos diversos biomas. Quando associado à planta, na forma de bacteroide, inserido no interior do nódulo do sistema radicular da leguminosa, estabelece-se uma relação simbiótica, mutualística, entre o microssimbionte e a planta (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Essa simbiose exerce um papel muito importante, diretamente na nutrição mútua, ocorrendo o fornecimento de N para a planta, que por sua vez, disponibiliza compostos fotossintetizados aos microssimbiontes.

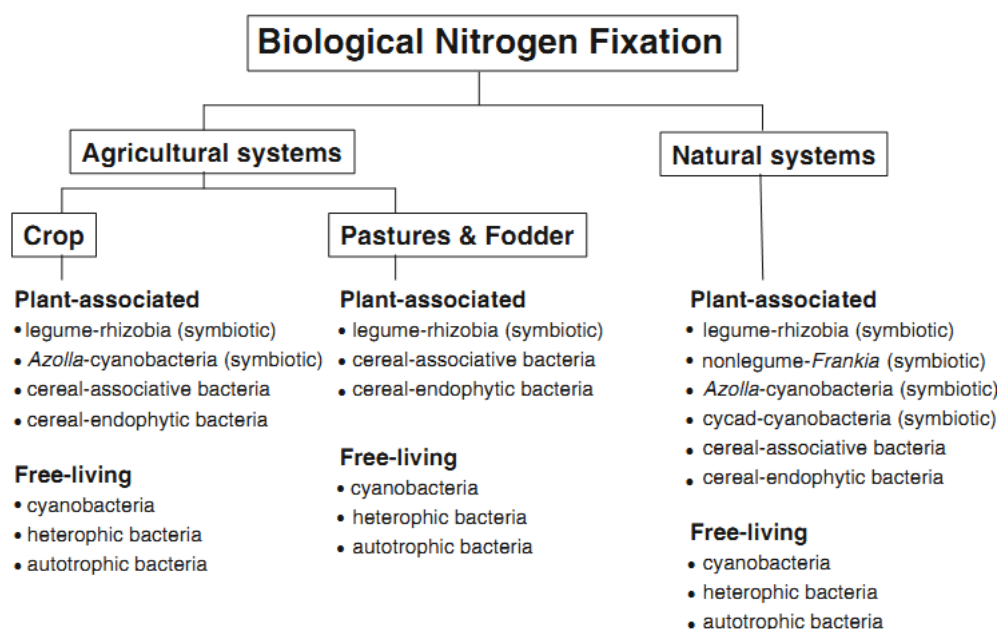


Figura 1 Diagrama representativo com os diferentes organismos fixadores de nitrogênio atmosférico nos sistemas agrícolas e ecossistemas naturais. Fonte: Herridge, Peoples e Boddey (2008)

O nitrogênio (N), depois do carbono, hidrogênio e oxigênio é o elemento químico mais abundante na matéria viva. Constitui aproximadamente 79% da atmosfera terrestre, na forma molecular (N_2 ou $N\equiv N$), porém não utilizável pelas plantas e outros grupos de organismos vivos, exceto alguns procariontes que possuem o complexo enzimático nitrogenase e que realizam o processo denominado fixação biológica de nitrogênio, pela capacidade de quebrar a tripla ligação da molécula e utilizá-la como fonte de proteína (FRANCO; DÖBEREINER, 1988). Os organismos usam compostos nitrogenados, no caso das plantas, a amônia resultante do processo de conversão do N_2 , é utilizada para a produção de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos e outros componentes que contêm nitrogênio.

Vale ressaltar que o nitrogênio é um nutriente essencial à vida e, em regiões tropicais, é fator limitante da produção agrícola. A deficiência desse elemento na forma assimilável pelos organismos vivos, especificamente pelas culturas, tem sido compensada, com o objetivo de garantir produtividade economicamente satisfatória, por meio do emprego de fertilizantes nitrogenados (FN) (PAVAN; MOREIRA FILHO, 2006). Porém, o uso de FN eleva muito o custo da produção e pode acarretar sérios problemas ambientais, tais como poluição das águas e acúmulo de NO_2^- na atmosfera. Além disso, o N se perde do solo facilmente por lixiviação, volatilização e desnitrificação, fazendo-se necessário um manejo adequado da adubação, tanto do ponto de vista agrônomico e ecológico, quanto do econômico (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Devido aos problemas ambientais, ao alto custo da produção agrícola e às exigências ao atendimento da demanda crescente por alimento e de qualidade, é importante recorrer a processos biológicos como a FBN. Esse é um processo que contribui para reduzir o custo da atividade produtiva e para a manutenção da qualidade ambiental e de outros importantes processos biológicos do solo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A FBN apresenta várias vantagens que resultam em benefícios econômicos e ecológicos, os quais advêm da substituição do componente nitrogenado, que representa 70% da composição dos fertilizantes químicos, produzidos a partir do petróleo, que, além de caro, pode ser poluente. Os poluentes resultantes da adubação química nitrogenada, em geral, podem causar contaminação do lençol freático e dos rios (PAVAN; MOREIRA FILHO, 2006), enquanto a FBN é um processo natural, não polui, consome energia da fotossíntese, e fornece N às plantas promovendo o crescimento e o desenvolvimento vegetal; além disso, enriquece o solo, é manipulável e barato (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

O exemplo clássico de vantagem da FBN por meio da inoculação de sementes, do ponto de vista econômico, atualmente está relacionado ao cultivo da soja. A inoculação das sementes dessa leguminosa com estirpe específica substitui totalmente a adubação nitrogenada. Outra vantagem é o total aproveitamento do N fixado, não existindo perdas, como as que podem ocorrer quando se empregam fertilizantes. Em virtude desse processo, se estabelece uma parceria, de troca mútua, entre a bactéria e a planta, em que o micro-organismo fornece amônia (NH_3) para a planta e esta, em troca, a supre com carboidratos.

Foi relatado há mais de uma década que as espécies vegetais que formam simbiose com micro-organismos fixadores de N_2 podem dispensar, total ou parcialmente, a adubação nitrogenada e ainda contribuir para outras espécies consorciadas ou em sucessão, garantindo a autossustentabilidade do ecossistema com relação ao N (MOREIRA, 1994). Tem sido enfatizado que a FBN em leguminosas dependendo do tipo de solo podem promover alta quantidade de N fixado, suficiente para suprir as necessidades de qualquer cultura que se beneficia desse processo e triplicar a produtividade média nacional (FRANCO; DÖBEREINER, 1988). Como já relatado, esse processo de FBN na soja cultivada no Brasil dispensa totalmente a adição de N e, no feijão, pode dispensar totalmente o uso de fertilizantes nitrogenados. A simbiose entre rizóbios e leguminosas, além de contribuir para a não utilização e ou redução da adubação nitrogenada, pode ser usada para fins de reflorestamento, produção de cerca viva ou recuperação de solos degradados, rotação de cultura e em pastagens (FRANCO; DÖBEREINER, 1988; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Porém a simbiose é inibida quando existe excesso de nitrato ou amônio no solo.

Outro aspecto positivo é que a FBN por meio da simbiose rizóbio-leguminosa é muito importante na agricultura porque promove aumento significativo do nitrogênio combinado no solo (LÓPEZ-LARA, 2007). Além disso, o mecanismo simbiótico das leguminosas é o mais sofisticado e eficiente

entre as associações de plantas superiores com bactérias fixadoras de N₂ (DÖBEREINER, 1989). Moreira (1994) menciona que a FBN em leguminosas arbóreas promove maior concentração de N, associada à maior biomassa (folhas, galhos, raízes, nódulos, etc.), possibilitando contribuição significativamente maior de matéria orgânica para o solo, com baixa relação C: N.

Portanto, por ser manipulável, a FBN torna possível o aumento do N fixado pelas plantas de interesse nos agrossistemas, através do uso de inoculante, elaborado com estirpes de rizóbios selecionadas e adaptadas às condições edafoclimáticas.

2.4 Inoculante

2.4.1 Aspectos gerais

Inoculantes microbianos podem ser definidos como formulações ou produtos, contendo uma ou mais estirpes microbianas benéficas. Estes micro-organismos são colocados em veículos-suporte, orgânicos ou sintéticos para serem disponibilizados às plantas específicas (BASHAN, 1998). A utilização de determinado micro-organismo tem como objetivo introduzir ou aumentar determinada comunidade microbiana no ambiente de interesse. É considerado inoculante todo produto que contenha micro-organismos com ação estimulante para o crescimento das plantas. Além deste efeito no crescimento através da fixação de N, Bashan (1998) afirma que há outros benefícios, tais como: biocontrole de doenças do solo; aumento da absorção de nutrientes minerais e efeitos nutricionais ou hormonais. No Brasil, o inoculante é um produto elaborado à base de estirpes selecionadas e aprovadas pelo Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

A alta produtividade da soja no País é resultante de programas de melhoramento direcionados à obtenção de cultivares com alta produção sem adubação nitrogenada e, ao mesmo tempo, do desenvolvimento de inoculantes contendo rizóbios adaptados às condições de clima e solos brasileiros (DÖBEREINER, 1989). A inoculação das sementes de soja com inoculante elaborado com estirpes específicas selecionadas e aprovadas pelos órgãos competentes, substitui totalmente a adubação nitrogenada, proporcionando uma economia, para o país, de 3 bilhões de dólares anuais. O sucesso da tecnologia de inoculação na soja pode estar relacionado ao fato de ser uma cultura de exportação que recebeu investimentos consideráveis em pesquisa ao longo do tempo, por parte do governo e empresas, visando o melhoramento genético da planta e melhor aproveitamento da FBN, o que não ocorreu com outras culturas brasileiras (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A simbiose entre leguminosas e microssimbiontes nodulíferos dos gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Allorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Devosia*, *Phyllobacterium*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Ochrobactrum* (CHEN et al., 2001; MOREIRA, 2008; MOULIN et al., 2001) favorece o crescimento vegetal, minimiza impactos ambientais e reduz o custo da atividade agrícola. Esses aspectos decorrem da capacidade que essas bactérias têm em converter o nitrogênio atmosférico em moléculas de compostos nitrogenados, que podem ser utilizados pelas plantas. Várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas com a fixação biológica de nitrogênio, sendo impulsionadas pelo aumento crescente dos preços dos fertilizantes químicos e questões ambientais. Estas pesquisas visam selecionar bactérias eficientes para realizar esse processo e aumentar a produtividade e, dessa forma poderão ser indicadas para a produção de inoculantes para sementes de várias leguminosas (BEN REBAH et al., 2007; DEAKER; ROUGHLEY; KENNEDY, 2004; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Atualmente, existem estirpes selecionadas e

aprovadas para a produção de inoculante para cerca de 100 espécies de leguminosas, incluindo o feijão-caupi (MOREIRA, 2005).

Os inoculantes são formulações contendo alta densidade de células bacterianas selecionadas para a cultura de interesse, que podem ser comercializadas, para serem aplicadas às sementes ou no solo durante a semeadura. Estima-se que cerca de 2000 toneladas de inoculantes sejam produzidas por ano no mundo. Essa quantidade é suficiente para inocular sementes de leguminosas para a semeadura de 20 milhões de hectares. Considerando a produção e uso no Brasil, a maior parte dos inoculantes é produzida na forma sólida, em pó da combustão de turfa (72%) ou na forma granular, outros são formulados com meio líquido (18%) sob a fórmula de caldos ou pó molhável (10%). O método de inoculação depende do tipo de inoculante: inoculantes em pó e líquidos são geralmente aplicados às sementes, enquanto os granulados são aplicados ao solo em sulcos (BEN REBAH et al., 2007; DEAKER; ROUGHLEY; KENNEDY, 2004; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Outro aspecto importante relaciona-se à quantidade e viabilidade das células de rizóbios inoculadas nas sementes. Para que a semente semeada tenha alto número de rizóbios viáveis, requer-se melhoria da sobrevivência das células durante o armazenamento e inoculação. A forma de manter a viabilidade das células contidas no inoculante, com alto número celular é uma das principais dificuldades da indústria de inoculantes (ALVAREZ et al., 2010). Os pesquisadores Herridge, Gemell e Hartley (2002) relatam que um inoculante ideal deve apresentar características como, não toxicidade ao rizóbio, boa capacidade de adesão à semente, alta capacidade de tamponamento do pH e capacidade de troca catiônica.

O inoculante mais utilizado por muitos anos foi o turfoso, por ser esta formulação a que apresenta maior capacidade de retenção de umidade,

capacidade de promover o crescimento e proteger o rizóbio, quando inoculado na semente. Porém, há alguns problemas associados à turfa: reservas pouco acessível, estando restritas a algumas áreas; alto custo de esterilização; dificuldades na aplicação em grande escala no campo, o que levaram à busca de formulações alternativas (ALVAREZ et al., 2010; TITTABUTR et al., 2007), como a líquida. Dentre todas as formulações, a maioria não apresenta desempenho equivalente ao produto à base e turfa (SINGLETON; KEYSER; SANDE, 2002).

2.4.2 Produção e comercialização de inoculantes para leguminosas

A produção e comercialização de inoculantes no Brasil são feitas por diferentes empresas. Os inoculantes são produzidos em diferentes formulações, sendo a maior parte elaborada nas formas sólida e líquida.

O inoculante na forma sólida ou turfoso consiste em uma mistura de turfa com pH neutralizado e cultura líquida de estirpes de rizóbio recomendadas. Essa mistura é elaborada na proporção de três partes de turfa e uma parte de células em meio líquido. A turfa é uma substância fóssil, orgânica e mineral, originada da decomposição de restos vegetais, encontrada em áreas alagadiças como várzeas de rios, planícies costeiras e regiões lacustres (FRANCHI; SÍGOLO; LIMA, 2003; ROMÃO et al., 2007). Ela é utilizada na forma de pó, como um veículo para as células de rizóbios. Deve ser esterilizada previamente para evitar a propagação de outros organismos indesejáveis ou que possam afetar a sobrevivência de Bactérias Nodulíferas de Leguminosas (BNL). A esterilização é realizada através de radiação gama proveniente do ^{60}Co (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Além da formulação sólida à base de turfa, atualmente, há outras formulações de inoculantes e vários métodos de aplicação. Uma das formulações

mais utilizadas é a líquida, que consiste em caldos ou meios líquidos contendo altas densidades celulares. Na formulação líquida são adicionados alguns aditivos, sendo os mais utilizados: o glicerol, polivinilpirrolidona ou goma arábica. As funções destes aditivos basicamente são: proporcionar melhor aderência do produto à semente; estabilizar o produto; inativar toxinas solúveis de revestimento de sementes; aumentar a sobrevivência de rizóbios durante o armazenamento e após a exposição a condições ambientais. Além disso, as formulações líquidas são facilmente aplicadas às sementes, apresentam bons resultados no campo, são facilmente adquiridas por pequenos produtores e utilizam materiais de baixo custo (SINGLETON; KEYSER; SANDE, 2002). No entanto, a data de validade do inoculante líquido é menor do que a do inoculante turfoso, principalmente quando armazenado sem refrigeração (ALVAREZ et al., 2010).

Para a produção de inoculante com células de rizóbios deve se seguir basicamente dois passos: crescimento celular em meio de cultivo e a elaboração do produto, utilizando veículo específico. O crescimento celular é resultado de um conjunto de interações ordenadas entre todas as atividades fisiológicas das células (MOAT; FOSTER; SPECTOR, 2002). Os autores relatam que é um processo complexo que envolve:

1. Entrada de nutrientes básicos para a célula.
2. Conversão destes compostos em energia e constituintes celulares vitais.
3. Replicação do cromossomo.
4. Aumento de tamanho e da massa celular.
5. Divisão da célula em duas células-filhas, cada uma contendo uma cópia do genoma e outros componentes vitais.

O setor de produção de inoculante no Brasil deve observar e seguir as normas estabelecidas pelo MAPA, mais especificamente as Instruções Normativas nº 5 de 06 de agosto de 2004, e nº 13 de 24 de março de 2011, em

seu Artigo 1º - que aprova e as definições e normas sobre especificações, garantias, registro, embalagem e rotulagem dos inoculantes destinados à agricultura, bem como as relações dos micro-organismos autorizados e recomendados para produção de inoculantes no Brasil, constantes dos Anexos I a II e I a III, respectivamente, publicadas no Diário Oficial da União (BRASIL, 2004, 2011), nos quais ficou estabelecido, que:

- 1- Todos os inoculantes devem apresentar 1×10^9 células viáveis por grama ou mililitro do produto, até a data de seu vencimento.
- 2- Devem ser elaborados em suporte esterilizado e, quando sólido, livre de micro-organismos em fator de diluição 1×10^{-2} .
- 3- Ser elaborados em suporte estéril e estar livres de micro-organismos não especificados em fator de diluição 1×10^{-5} .
- 4- O suporte ou veículo deverá fornecer todas as condições de sobrevivência ao micro-organismo.
- 5- O inoculante deverá ser elaborado em suporte sólido, fluido ou com outra característica, desde que atendam aos requisitos anteriores.
- 6- O prazo de validade dos inoculantes será de 6 meses a partir da data de fabricação.

O controle de qualidade nos inoculantes utilizados no país é feito por órgão competente ligado ao MAPA (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Os meios de cultura utilizados nos processos fermentativos podem ser líquidos, também conhecidos como caldos e sólidos. Os líquidos são os mais utilizados. Ambos os tipos de meios de culturas devem satisfazer todas as necessidades nutricionais do micro-organismo e cumprir os objetivos do processo. Sendo assim, os meios devem ser formulados com nutrientes em volume e concentração que promova a síntese do produto-alvo, quer seja biomassa celular ou um metabólito específico. Nos processos industriais, os meios são utilizados em várias etapas: vários de passos de propagação do

inóculo (cultura starter); fermentação em escala piloto e a fermentação principal. Para obtenção de biomassa ou metabólitos primários, deve se fornecer um meio de produção que permita o crescimento ótimo do micro-organismo, o qual não requer variações no suprimento nutricional no decorrer do processo fermentativo (MOAT; FOSTER; SPECTOR, 2002; WAITES et al., 2001).

A elaboração do meio fermentativo requer como regra geral, o fornecimento de energia e unidades carbono para a biossíntese, e fontes de nitrogênio (N), fósforo (P) e enxofre (S). Além destes elementos são requeridos outros macronutrientes, como o H e O, e micronutrientes e fatores de crescimento. Alguns micro-organismos requerem a adição de vitaminas, como a biotina e riboflavina. Nas fermentações aeróbias é necessário o suprimento constante de O₂. Geralmente, os meios de cultura devem ser tamponados, ou o pH deve ser controlado ao longo da fermentação, com a adição de ácidos ou álcalis. Pode ser requerida também a adição de antiespumante (COHEN, 2011; MOAT; FOSTER; SPECTOR, 2002; WAITES et al., 2001).

Outro aspecto a ser considerado está relacionado à constituição do meio de cultura e requerimentos metabólicos do micro-organismo a ser cultivado. A constituição do meio deve sempre levar em consideração a composição elementar do micro-organismo a ser cultivado e a sua capacidade de converter as substâncias químicas do meio de cultura em massa celular ou outros produtos desejados (PRADELLA; OLIVEIRA; URENHA, 2001; URENHA et al., 1994; WAITES et al., 2001). Além disso, a seleção da fonte de carbono, de energia e outros nutrientes essenciais, buscando a otimização do processo, juntamente com outros parâmetros são vitais para o desenvolvimento da fermentação, de forma que maximize a produtividade e lucro.

Quanto ao suprimento dos elementos requeridos ao metabolismo microbiano, em fermentações de organismos heterotróficos, em geral, são requeridas elevadas concentrações de fonte de carbono, variando entre 10-20 g

L^{-1} , ou maior. Essas altas concentrações são requeridas, porque as fontes de carbono fornecem o esqueleto de carbono para a biossíntese celular e também como fonte de energia. Geralmente, os açúcares são boas fontes de carbono e energia, sendo a glicose o substrato preferencial da maioria dos micro-organismos cultiváveis (COHEN, 2011; MOAT; FOSTER; SPECTOR, 2002; POOLE et al., 2008; STOWERS, 1985; WAITES et al., 2001).

Em relação ao hidrogênio (H) e o oxigênio (O), eles podem ser supridos a partir de água e compostos orgânicos. Além destas fontes, muitos organismos aeróbicos e microaerofílicos dependem de O molecular como aceptor terminal final de elétrons e para a síntese de compostos específicos, tais como esteróis insaturados. Quanto ao nitrogênio os micro-organismos podem conter mais de 15% (w/w), distribuído principalmente nas proteínas estruturais e funcionais, e ácidos nucleicos. Para que o nitrogênio atenda a esta demanda, normalmente é fornecido no meio de cultura concentrações variando entre 1-2 g L^{-1} , na forma de sais de amônio, ureia ou compostos ricos em nitrogênio, como extrato e água de levedura (COHEN, 2011; PRADELLA; OLIVEIRA; URENHA, 2001; WAITES et al., 2001). Algumas espécies de bactérias, como as fixadoras de nitrogênio dos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azotobacter*, entre outras, utilizam o nitrogênio molecular proveniente da atmosfera em seu metabolismo.

A fermentação é definida como qualquer cultivo de micro-organismos ou outras células, com ou sem O_2 , o que difere da definição bioquímica, em que considera o metabolismo microbiano anaeróbio. Na indústria o processo fermentativo é qualquer cultivo microbiano em larga escala, em fermentadores ou reatores com grandes volumes, variando de alguns litros a milhares de litros. Nos laboratórios de pesquisa e ensino ou de bancada, a fermentação, geralmente é desenvolvida em pequena escala, em tubos de ensaios, Erlenmeyers, garrafas, cultivando as células em volumes que variam de alguns mililitros a dois litros (SINGH; KAPOOR, 2010; WAITES et al., 2001).

Os meios de culturas para o cultivo de rizóbios atendem ao descrito acima, de forma que são fornecidos todos os nutrientes necessários, fatores de crescimento, vitaminas. Na Tabela 1 são representados alguns meios de culturas utilizados para *Bradyrhizobium* sp.

A produção de biomassa de rizóbio na indústria ocorre basicamente em dois tipos de cultivo: cultivo descontínuo, conhecido como em batelada (*batch*) ou cultivo descontínuo-alimentado (PRADELLA; OLIVEIRA; URENHA, 2001). O cultivo descontínuo consiste em duas fases: a de esterilização e a de inoculação. Após a inoculação do volume específico de meio, com o inóculo selecionado e na densidade celular determinada, acompanha-se o processo observando ou controlando parâmetros, tais como, pH, aeração e agitação. O acompanhamento do processo é feito até atingir o máximo de crescimento celular ou produção do metabólito de interesse (SINGH; KAPOOR, 2010; WAITES et al., 2001). O cultivo descontínuo consiste basicamente no fornecimento constante de meio estéril ou micro-organismos no biorreator, e, ao mesmo tempo, a retirada constante de produto ou biomassa celular (SINGH; KAPOOR, 2010). Em laboratórios de pesquisas, a produção de biomassa de rizóbios, geralmente é realizada em frascos pequenos, como Erlenmeyers, cujos volumes variam entre 125 mL a 2 L, em garrafas etc. A fermentação também é realizada em biorreatores pequenos, cujos volumes podem variar entre 2 até 7 L de volume útil.

O cultivo descontínuo ou em batelada é o mais empregado para a produção de biomassa de rizóbio em grande escala (PRADELLA; OLIVEIRA; URENHA, 2001). É um tipo de cultivo que apresenta várias vantagens, tais como, um menor risco de contaminação e tempo de cultivo, menor investimento na estrutura quando comparado com a do cultivo descontínuo alimentado (SINGH; KAPOOR, 2010). É um cultivo realizado em garrações com volume de 10 a 20 litros, contendo aeradores em profundidade, e colocados dentro de

estufas especiais para a manutenção da temperatura. No entanto, a maior parte da produção ocorre em fermentadores agitados e aerados com volume útil que podem variar de 100 a 2.000 litros.

Os garrafões podem ser utilizados quando se necessita a produção de pequenas quantidades de inoculantes, para testes em campo ou para culturas que ocupem pequenas áreas. Quando a produção de inoculante é em grande escala, os garrafões ou balões são utilizados para produção de inóculo, como ilustrado na Figura 2 (PRADELLA; OLIVEIRA; URENHA, 2001). Conforme relatado pelos autores acima, neste sistema o fermentador principal, o de 200 L de volume útil é carregado de meio de cultura, e, sob agitação constante, procede-se a esterilização a 121 °C, à medida que a temperatura aumenta e atinge 100°C, fornece-se vapor para que a pressão interna aumente, de forma que a temperatura atinja 121°C, permanecendo entre 15 a 30 minutos.

Atualmente, na indústria nacional de inoculantes é comum utilizar fermentadores maiores, volume acima de 1000 litros acoplados a fermentadores menores, que servem de inóculos sucessivos (Figura 3). Na figura 4 pode ser observada uma instalação industrial básica de produção de inoculantes, desde o preparo do inóculo até o empacotamento. Em laboratório de ensino e pesquisa, geralmente o processo é mais simplificado. As células são produzidas em pequenas quantidades, em frascos que variam de 125 mL a 1L. Inicialmente produz-se o inóculo que posteriormente é adicionado ao meio de cultura líquido, incubado em incubadora com agitação e temperatura controlada. Ao atingir o máximo de células, estas são misturadas à turfa estéril e empacotadas.

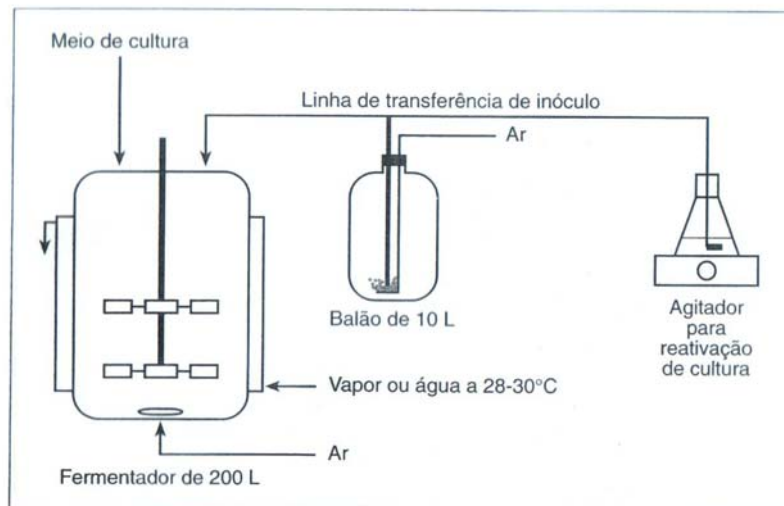


Figura 2 Exemplo típico de fluxograma de uma instalação industrial para a produção de *Bradyrhizobium*
Fonte: Pradella, Oliveira e Urenha (2001)



Figura 3 Exemplo de uma instalação industrial para a produção massal de células de rizóbios com fermentadores menores acoplados

Tabela 1 Meios de cultura utilizados para crescimento de rizóbios

YM (Vincent, 1970)		Lopreto, Mazza e Balatti (1972)		Lorda e Balatti (1996)	
Componentes	Quantidade L ⁻¹	Componentes	Quantidade L ⁻¹	Componentes	Quantidade L ⁻¹
C ₆ H ₁₄ O ₆ (manitol)	10g	C ₃ H ₈ O ₃	10,0 g	Glicerol	10,0 g
Extrato de levedura	0,4 g	Extrato de levedura	4,0 g	Extrato de levedura	4,0 g
K ₂ HPO ₄ a 10%	1 mL	K ₂ HPO ₄	0,5 g	--	--
KH ₂ PO ₄ a 10%	4 mL	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g	Mg SO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O a 10%	2 mL	NaCl	0,1 g	NaCl	0,1 g
NaCl a 10%	1 mL	KNO ₃	0,8 g	KNO ₃	0,8 g
Azul de Bromothimol (0,5%) em KOH a 0,2N	5 mL	(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,3 g	(NH ₄) ₂ PO ₄	0,3 g
--	--	FeCl ₃ a 10%	0,1 mL	FeCl ₃ a 10%	0,06 mL
--	--	MnSO ₄ a 10 %	0,1 mL	MnSO ₄ a 10%	0,06 mL
pH	6,8	pH	6,8	pH	6,8

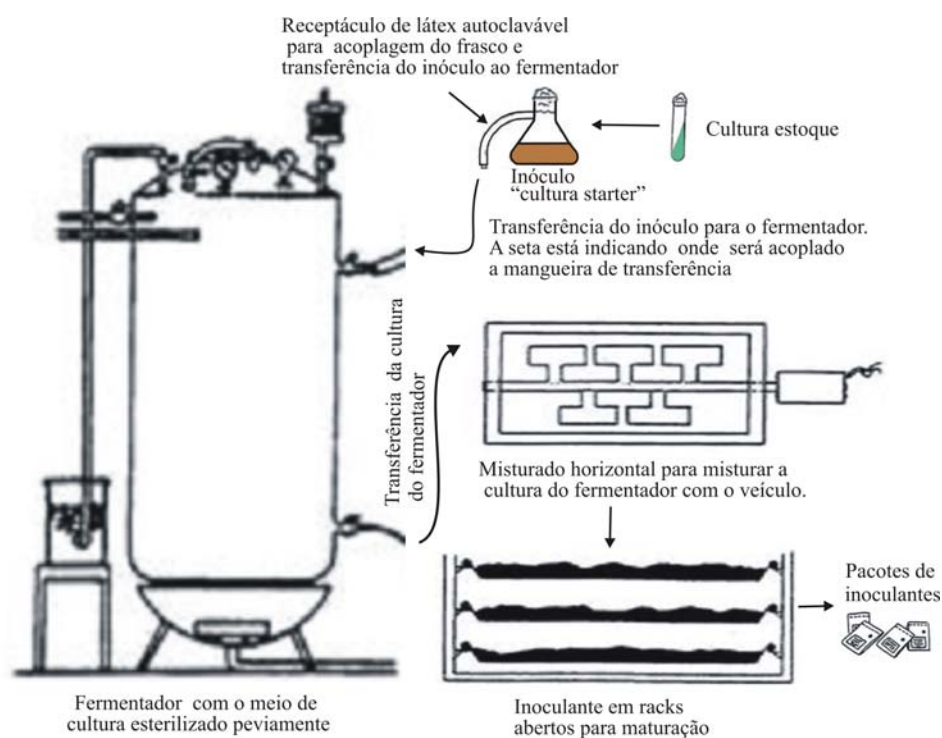


Figura 4 Fluxograma básico de uma instalação industrial para produção de inoculante
 Fonte: Modificado de Burton (1984)

A maior parte dos processos fermentativos que envolvem micro-organismos requer oxigênio, sendo a agitação e aeração dois fatores importantes para o desenvolvimento microbiano. As bactérias do gênero *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* são micro-organismos aeróbios estritos necessitando, portanto, de oxigênio dissolvido no meio de cultura para sua multiplicação celular. Na produção massal de rizóbio, esse fator é decisivo e uma transferência adequada de O_2 para o meio de cultura deve ser criteriosamente projetada (PRADELLA; OLIVEIRA; URENHA, 2001). O crescimento em cultivo submerso requer aeração e este tipo de bactéria é fácil de crescer. O requerimento de ar não é alto, da ordem de cinco a dez litros de ar por litro de meio h^{-1} . O suprimento de ar

para as células varia de acordo com o fabricante de inoculantes, mas o ar comprimido estéril é o mais comum, mediante agitação mecânica (BURTON, 1984).

A principal função da agitação mecânica é viabilizar a troca de calor durante a esterilização e resfriamento do meio líquido. Para fermentadores de pequeno porte não é o recomendado, porque os sistemas de agitação são caros e os rolamentos do eixo podem ser uma fonte de contaminação. Além disso, o crescimento não é favorecido com aeração e agitação violentas, sendo a pressão parcial de oxigênio de 0,15 atm o ideal para a respiração. Essa baixa necessidade provavelmente está associada à capacidade do micro-organismo em crescer no interior de nódulo ativo, onde prevalece a baixa tensão de O₂ (BURTON, 1984). No entanto, Date (1976) defende a alta agitação como um fator importante para o crescimento de rizóbios, favorecendo um alto e rápido crescimento.

Os estudos com rizóbios têm definido estirpes e parâmetros importantes no cultivo destes organismos. Atualmente são conhecidos, além de parâmetros, os níveis mais importantes para o crescimento de rizóbios. Os parâmetros mais estudados e levados em consideração no processo fermentativo são: temperatura, pH, fonte de carbono e N, agitação e aeração. Quanto à temperatura de incubação, os rizóbios apresentam capacidade de crescimento em uma faixa que vai de 25 a 33 °C (BISSONETTE, 1986; BURTON, 1984; DATE, 1976). Em muitos estudos com rizóbios têm sido utilizado essas temperaturas para crescimento, prevalecendo os valores entre 28 e 30 °C (BARBERI et al., 2004; BEN REBAH; TYAGI; PRÉVOST, 2002; BOIARDI; ERTOLA, 1985; FERNANDES JÚNIOR et al., 2009; FRANKENBERG; FREIRE; THOMAS, 1995; GRASSANO et al., 2009; MIGUEL; MOREIRA, 2001; PRADELLA; OLIVEIRA; URENHA, 2001; SURPIN; MAIER, 1998).

A aeração e agitação são dois fatores muito importantes no processo de cultivo de rizóbios. Quanto à aeração, observa-se que, embora sejam utilizados

diferentes valores, há pequena variação na quantidade de oxigênio (O₂) fornecido. Enquanto, para a agitação a variação é maior. De acordo com Date (1976), aproximadamente 5 L ar h⁻¹ L⁻¹ de meio são satisfatórios para o crescimento de rizóbio. Em trabalho com *Rizobium meliloti*, Bissonnette, Lalande e Bordeleau (1986) utilizaram 2% v/v de inóculo, com agitação de 150 rpm, no preparo do inóculo. No fermentador, a agitação foi de 800 rpm com taxa de aeração 2 L min⁻¹ de oxigênio, com 95 a 100% de saturação de oxigênio dissolvido. Os autores Barberi et al., (2004) e Miguel e Moreira (2001) trabalhando com estirpes inoculantes do gênero *Bradyrhizobium* utilizaram em seus trabalhos, a agitação de 110 rpm.

O volume de inóculo também varia nos trabalhos, de 0,1 a 10% (v/v) (BEN REBAH; TYAGI, PRÉVOST, 2002; BEN REBAH et al., 2007; BISSONNETTE; LALANDE; BORDELEAU 1986; DATE, 1976). O fornecimento de pouco oxigênio pode estar relacionado à característica própria do grupo de bactérias fixadoras de N, que é a de usar baixas concentrações de O₂, para o seu metabolismo. O importante é que tenha um fornecimento de ar adequado associado a uma distribuição equilibrada, sem excessos. De acordo a Pradella, Oliveira e Urenha (2001) quando o cultivo for em fermentador deve se atentar para o fato de que altas agitações podem reduzir o pH do meio, conseqüentemente reduzir a velocidade de crescimento celular.

Quanto ao pH, são observados diferentes adotados nos cultivos, dependendo da estirpe, variam de 5,5 a 7,5. O pH pode influenciar no tempo de crescimento microbiano, aumentando ou reduzindo a fase lag de crescimento do rizóbio (PRADELLA; OLIVEIRA; URENHA, 2001). Há trabalhos que demonstram haver comportamento diferenciado quanto ao meio. Por exemplo, a estirpe de *Bradyrhizobium elkanii* BR 29, inoculante de soja, em meio Lorda e Balatti cresceu melhor em pH 6,0, enquanto no meio Lopreto, o melhor crescimento ocorreu quando o pH inicial foi ajustado para 5,5 (BARBERI et al.,

2004). A estirpe INPA 3-11B quando cultivada em meio YMA, apresentou crescimento melhor em pH 6,0 (FLORENTINO et al., 2010). De maneira geral, deve se considerar um meio de cultura com os componentes balanceados, de forma que não afetem demasiadamente a evolução do pH (PRADELLA; OLIVEIRA; URENHA, 2001). O mais comum é o uso de pH próximo da neutralidade. Mas, vale ressaltar que para cada micro-organismo pode haver variação, portanto, exigindo adequação ao estudo desejado.

Dentre as diferentes formulações, a sólida até 2003, foi a mais comercializada. No entanto, conforme dados estatísticos da Associação Nacional de Produtores e Importadores de Inoculantes (ANPII), o volume de inoculante sólido comercializado em 2005 foi menor que o líquido, sendo 8 milhões de doses de turfosos e cerca de 10 milhões de doses de inoculantes na forma líquida. Tem sido demonstrado que do montante consumido no país, em 2003, aproximadamente 26% dos inoculantes foram importados principalmente da Argentina e do Uruguai (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). A Associação Nacional dos Produtores e Importadores de Inoculantes (ANPII) apresenta como sendo 38,6%, o volume de inoculantes importados. Estes inoculantes são vendidos no atacado a grandes produtores. Além disso, vale ressaltar que a maior parte do inoculante foi para a cultura da soja, deixando-se uma lacuna a ser preenchida por estudos com rizóbios para outras culturas de relevância socioeconômica para o Brasil.

Os trabalhos apresentados até aqui, demonstram que os rizóbios têm sido bastante estudados. Nota-se que os estudos abrangem desde o princípio de seleção, demonstrações do alto potencial de fixação no campo, bem como sobre o processo de obtenção de células em laboratório ou em escala industrial (BEN REBAH; TYAGI; PRÉVOST, 2002; BEN REBAH et al., 2007; BISSONNETTE; LALANDE; BORDELEAU, 1986; COSTA et al., 2011; DATE, 1976; DATE, 2000; LACERDA et al., 2004; MARTINS et al., 2003;

MIGUEL; MOREIRA, 2001; SOARES et al., 2006). No entanto, o processo de produção de células em escala industrial é pouco conhecido e, para muitas estirpes que já estão disponíveis para a produção de inoculantes, ainda não foi definido.

Além disso, a maioria das estirpes não tem sido utilizada para a produção de inoculantes em escala comercial, como é o caso daquelas para culturas com pouca expressão econômica para exportação. Neste grupo estão incluídas as estirpes de *Bradyrhizobium* selecionadas para a leguminosa feijão-caupi, que é predominantemente cultivada por pequenos agricultores, sendo, portanto um mercado potencial do varejo e não de atacado, que é mais vantajoso para o setor industrial. Assim, sua produção e disponibilização poderiam ser viabilizadas, por exemplo, por pequenas empresas incubadas nas instituições públicas de ensino e pesquisa em ciências agrárias, geralmente localizadas em centros de produção agrícola. Assim, existe a necessidade de serem definidas as condições ótimas de produção de biomassa para a elaboração do inoculante e sua disponibilização para uso na agricultura. As definições das condições dependem do estudo de vários fatores que estão envolvidos no processo de cultivo bacteriano em larga escala.

2.4.3 Inoculação do feijão-caupi

As leguminosas compõem um grupo vegetal amplamente utilizado como alimento, forragem, combustível, madeira, adubação verde e como cultura de cobertura em diferentes sistemas agrícolas. As leguminosas são consideradas a principal fornecedora de N aos solos. Esse aspecto é primordial para os ecossistemas. Considerando que os solos dos trópicos, essa importância torna-se mais importante ainda. Pois, os solos dos trópicos, como os do Brasil, em geral, apresentam baixa fertilidade natural, e o N é um dos elementos que pode limitar

a produção agrícola. A escassez de N é agravada ano após ano, devido à exploração intensa dos solos agrícolas, que têm este elemento transportado através dos grãos (MOREIRA, 2008; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; SINDHU et al., 2010). Felizmente, a partir do conhecimento do processo FBN foi possível criar uma biotecnologia. O sucesso desta biotecnologia está relacionado à capacidade que a FBN tem de suprir as necessidades da cultura em N, podendo até substituir os onerosos fertilizantes químicos nitrogenados, que elevam muito o custo da produção (MOREIRA, 2005). Essa biotecnologia consiste na inoculação de estirpes de rizóbios selecionadas para determinada cultura de leguminosa. No Brasil, as estirpes selecionadas com comprovada eficiência para serem utilizadas comercialmente para inoculação são aprovadas pelo MAPA.

A inoculação de sementes de leguminosas é uma forma eficiente e conveniente de introduzir rizóbios eficazes no solo, assim prover o N suficiente para o desenvolvimento da cultura, que recebeu o inoculante. É uma prática pré-semeadura em que se disponibiliza alta densidade de células de rizóbios selecionadas e aprovadas para a cultura relacionada. A eficiência da inoculação depende de vários fatores, tais como, pH do solo, teor de matéria orgânica, temperatura, umidade, que podem afetar o número de rizóbios viáveis para a infecção das raízes da leguminosa cultivada. Devido ao grande número de rizóbios presentes no solo, as células introduzidas devem ser em grande quantidade, para que possa competir com os micro-organismos nativos e apresentam ótimo desempenho em termos de fixação de N para a planta (COOPER, 2007; MOREIRA, 2008; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

O melhor exemplo de utilização desse processo é a cultura da soja, na qual a adubação química nitrogenada é totalmente substituída pela utilização de inoculantes contendo bactérias do gênero *Bradyrhizobium*. O uso de inoculantes nesta cultura somente no ano de 2003 representou uma economia para o país de cerca de US\$2 bilhões (MOREIRA, 2005), sendo atualmente indispensável para

essa leguminosa (ZILLI; CAMPO; HUNGRIA, 2010). Moreira e Siqueira (2006) relatam também que essa economia é cerca de 3 bilhões de dólares anuais. A produtividade da soja ultrapassa os 3 mil kg L⁻¹, sendo em alguns casos superior ao alcançado com uso de adubação química nitrogenada de 200 kg ha⁻¹ de N na forma de ureia (CAIRES et al., 2006; HUNGRIA et al., 2006; ZILLI; CAMPO; HUNGRIA, 2010).

Zilli, Campo e Hungria (2010), observaram produtividade de até 3.562 kg ha⁻¹ de grãos de soja, enquanto o controle adubado com 200 kg ha⁻¹ de N foi de apenas 3.250, e o controle sem N e sem inoculação de 1.650 kg ha⁻¹. Esses são alguns exemplos de produtividade da soja. Existem vários outros, a maioria mostrará resultados de sucesso nesta cultura. Embora, a maioria esteja voltada para essa leguminosa, há resultados de sucesso com a inoculação em outras culturas, as quais têm sido beneficiadas com sucesso pela FBN, como é o caso do feijão-caupi.

O feijão-caupi, geralmente, é cultivado para subsistência pelas comunidades mais pobres de várias regiões, como África, Ásia e América Central e do Sul (ANDRADE JÚNIOR et al., 2003; INAIZUMI et al., 1999). No Brasil cultiva-se essa leguminosa principalmente nas regiões Norte e Nordeste. É um vegetal que também se beneficia da FBN, tendo alcançado rendimentos de grãos significativos (FREIRE FILHO et al., 2005; MOREIRA, 2005). Em ensaios de campo, com utilização do processo FBN promovido pela inoculação de estirpes selecionadas, o rendimento variou de cerca de 900 kg ha⁻¹ a 1.300 kg ha⁻¹, no Sul de Minas (LACERDA et al., 2004; SOARES et al., 2006) e cerca de 900 1.300 kg ha⁻¹ no Nordeste do estado de Mato Grosso (SOUSA; MOREIRA, 2011).

Ainda em relação à produtividade de feijão-caupi, em outras regiões, como no estado de Roraima, Zilli, Xavier e Rumjanek (2006) alcançaram rendimento de grãos variando entre 1.600 e 2.300 kg ha⁻¹. Nota-se grande

potencial da biotecnologia de inoculação, com baixíssimo custo e sem impacto ambiental, podendo beneficiar culturas tradicionais, como o feijão-caupi, principalmente nas regiões Norte e Nordeste, onde a produtividade média, assim como a nacional, é baixíssima, de cerca de 500 kg ha⁻¹. Por isso, é imprescindível disponibilizar esta biotecnologia para pequenos agricultores; (FREIRE FILHO et al., 2005; MOREIRA, 2005), estabelecendo meios que possibilitem o conhecimento prático, a avaliação e a possível apropriação do conhecimento da inoculação e ou a adoção em seus sistemas de produção.

Quanto ao custo, observa-se que a produção de determinada leguminosa com uso de inoculante é muito menor comparado ao sistema em que se usa adubação química nitrogenada. Para exemplificar, em 2003 a dose do inoculante custou, em média, R\$4,00. O peso da dose e a concentração de células variam de acordo com o fabricante, mas geralmente é de 200 g; o importante é que resulte, no mínimo, em 600.000 células por semente. Esse número é obtido pela fórmula da Equação 1. Uma dose é geralmente suficiente para inocular 50 kg de sementes que, de modo geral, dependendo da cultivar, são suficientes para semear 1 hectare (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Além disso, os autores apresentam também que no mesmo ano, foram utilizados 26,4 milhões de doses (99% para soja), a um custo de aproximadamente 106 milhões de reais com inoculantes, substituindo totalmente a adubação nitrogenada para essa cultura.

$$\text{Cél. por Semente} = \text{g de CCI} \times \text{dose} / 350; \quad 1$$

Onde, g de CCI – concentração de células no inoculante (nº g⁻¹);

dose – quantidade em gramas de inoculante utilizado;

350 - número médio de sementes por saca de 50 kg.

Se a cultura da soja fosse cultivada com o uso de adubação química nitrogenada, o custo seria muito alto. Pois, para se produzir cerca de 3 mil kg ha⁻¹

¹ de grãos de soja, requer-se a aplicação de pelo menos 1.067 kg de ureia para o fornecimento de 480 kg de N, que destes 240 são utilizados pela cultura. O custo desta adubação química nitrogenada seria de 170 dólares por hectare, inviabilizando economicamente a cultura (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2001). Com a inoculação das sementes de soja são obtidas produtividade superior a 3 mil kg ha⁻¹ de grãos (ZILLI; CAMPO; HUNGRIA, 2010).

Tendo em vista, o exposto, fica evidente que a FBN é um processo extremamente importante para os ecossistemas e que a tecnologia de inoculação é eficiente. Foi destacado também que há diversas estirpes selecionadas e aprovadas para várias espécies de leguminosas. Além disso, que a biotecnologia de inoculação está voltada praticamente à cultura da soja. Por isso, faz-se necessário a expansão do uso dessa biotecnologia para outras leguminosas, principalmente em culturas lavradas por pequenos agricultores, como é o caso do feijão-caupi. Uma espécie rústica e bem adaptada às diferentes condições edafoclimáticas do Brasil, com grande capacidade de fixar nitrogênio atmosférico em simbiose com bactérias do gênero *Bradyrhizobium*. Para que haja expansão do emprego da inoculação de sementes de feijão-caupi, portanto, torna-se necessário a padronização da metodologia de produção de inoculantes, uma vez que a produção industrial é limitada e até o momento não tem sido definida a condição adequada para a produção comercial de células para inoculante de feijão-caupi.

2.5 Características gerais e metabólicas das Bactérias Nodulíferas de Leguminosas (BNL)

As bactérias fixadoras de N₂ conhecidas comumente como rizóbios são responsáveis pela FBN em simbiose com leguminosas e caracterizam-se como micro-organismos gram-negativos (-), bastonetiformes, que podem ser encontrados naturalmente nos solos dos diversos biomas brasileiros. Quando

associado à planta, na forma de bacteroide, inserido no interior do nódulo do sistema radicular da leguminosa, se estabelece uma relação simbiótica, mutualística, entre o microssimbionte e a planta. Os principais gêneros simbiotes de leguminosas são: *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Allorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Devosia*, *Phyllobacterium*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Ochrobactrum* (CHEN et al., 2001; MOREIRA, 2008; MOREIRA et al., 2006; MOULIN et al., 2001). Dentre estes gêneros os de maiores destaque devido ao uso em leguminosas de grande importância agrícola são: *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*.

Esses micro-organismos fixadores de N₂ são heterotróficos, não esporulantes, com tempo de geração de 3-10 horas, variando 3,5 horas para estirpes do gênero *Rhizobium* a aproximadamente 10,0 h em *Bradyrhizobium* (BARBERI et al., 2004; BURTON, 1984; PRADELLA; OLIVEIRA; URENHA, 2001) apresentam tamanho variando de 0,5-0,9 µm por 1,2-3,0 µm, movem-se por flagelos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; PRADELLA; OLIVEIRA; URENHA, 2001). As estirpes do gênero *Rhizobium* têm crescimento rápido, e geralmente apresentam reação ácida durante o cultivo promovendo, conseqüentemente, a queda do pH do meio de cultura. Enquanto, as estirpes de *Bradyrhizobium* são denominadas de rizóbios de crescimento lento, variando entre 6 a 10 dias o tempo para aparecimento de colônias visíveis (BURTON, 1984; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO, 1984; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; PRADELLA; OLIVEIRA; URENHA, 2001).

Os micro-organismos do solo apresentam alta diversidade e densidade, resultando em variabilidade de espécies e de características genéticas ou fenotípicas, como morfológicas, bioquímicas, fisiológicas e simbióticas como descrito em Moreira e Siqueira (2006). Neste grupo altamente diverso, estão incluídos os fixadores de N₂ simbiotes de leguminosas que, por sua vez, são

bastante diversos em termos fisiológicos e bioquímicos, características que influenciam em seu crescimento (BEN REBAH et al., 2007).

Considerando o requerimento nutricional, as bactérias fixadoras de nitrogênio, eram basicamente divididas em dois grupos: de crescimento rápido e lento (STOWERS, 1985; STOWERS; ELKAN, 1984). No entanto, Stowers (1985) apresentou, em sua revisão sobre o metabolismo de carbono em rizóbios, um grupo intermediário e atualmente, o grupo de BNL pode ser dividido em mais de uma categoria, como descrito na Tabela 2. Nessa descrição as características estão relacionadas ao crescimento em manitol, mas podem ser generalizadas para outras fontes de carbono (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Tabela 2 Principais características culturais em YMA dos gêneros de rizóbios

Gêneros	Características
<i>Rhizobium</i> e <i>Sinorhizobium</i>	Colônias circulares com 2 a 4 mm de diâmetro. São convexas, translúcidas e mucilaginosas. Produz grande quantidade de polissacarídeos extracelulares (EPS). Muitas estirpes apresentam centro amarelo devido à absorção do indicador de pH (azul-debromotimol - AB). Geralmente produz reação ácida no meio, mas pode não produzir modificação visível do pH (indicada pelo AB). Tempo para aparecimento de colônias isoladas (TACI): 2 a 3 dias (crescimento rápido).
<i>Mesorhizobium</i>	Idem anteriores, mas TACI: 3 a 5 dias (crescimento rápido a intermediário).
<i>Allorhizobium</i>	Idem anteriores, mas colônias 0,5 a 3 mm de diâmetro e TACI: 1 a 2 dias (crescimento rápido).
<i>Azorhizobium</i>	Colônias circulares, 0,5 mm de diâmetro, com coloração creme, muito pouca produção de EPS (bem menor que <i>Bradyrhizobium</i>). Produz reação alcalina no meio. TACI: 3 a 4 dias (crescimento intermediário a rápido).
<i>Bradyrhizobium</i>	Colônias circulares, não excedem 1 mm quando isoladas. Produção de EPS: pouco (geralmente nas estirpes de crescimento muito lento) a abundante. Geralmente opacas, menos frequentemente translúcidas. Brancas, convexas, textura granular. Produz reação alcalina no meio. TACI: 6 a 10 dias (crescimento lento a muito lento).

Fonte: Moreira e Siqueira (2006)

A via metabólica principal para o catabolismo de carbono é a Entner Doudoroff (COHEN, 2011; CONWAY, 1992; POOLE et al., 2008; STOWERS, 1985), representada na Figura 5. Os rizóbios são capazes de catabolizar uma grande variedade de compostos de carbono, incluindo compostos pouco comuns produzidos pela planta. A capacidade de catabolizar diferentes fontes de carbono confere às estirpes de rizóbio uma vantagem competitiva para nodulação (POOLE et al., 2008). Dentre as diversas fontes de carbono, as bactérias do gênero *Bradyrhizobium* podem metabolizar glicose, galactose, gluconato, glicerol, frutose, arabinose, manitol, succinato, malato, xilitol, lactose e ramnose (PRADELLA; OLIVEIRA; URENHA, 2001; STOWERS, 1985; VINCENT, 1970). Em culturas laboratoriais de rizóbios, o ciclo do ácido cítrico funciona completamente (POOLE et al., 2008).

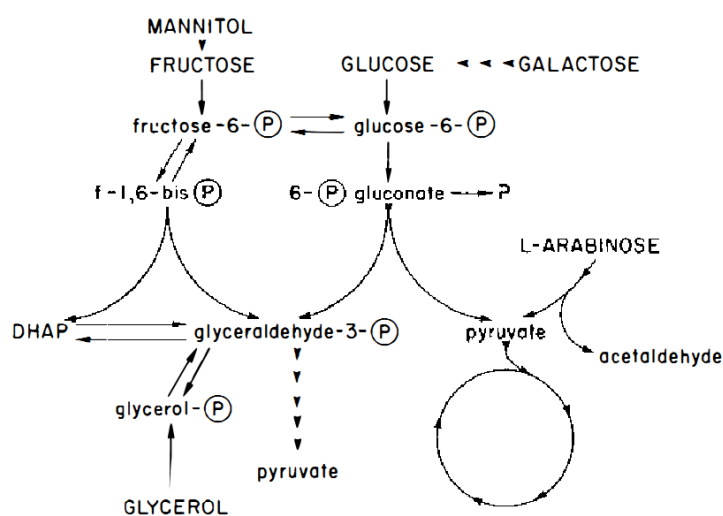


Figura 5 Vias metabólicas do catabolismo de carbono em rizóbios de crescimento lento.

Fonte: Stowers (1985)

As BNL de crescimento lento, grupo no qual estão incluídas as bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, são consideradas mais exigentes em seus requerimentos de carbono, que as de crescimento rápido (ARIAS; MARTINEZ-DRETS, 1976; ; DATE, 1976; MARTINEZ-DRETS; ARIAS, 1972). Tais bactérias apresentam crescimento pouco ou lento em substratos com D-manitol, maltose e glicose. Estirpes de *Bradyrhizobium* denominadas *Rhizobium japonicum* 532, E45, 566, 587 e uma de *R. trifolli* apresentaram menor tempo de crescimento quando cultivadas em meio contendo glicerol, de 5 a 9,2 horas. Quando cultivadas em meio contendo as fontes de carbono glicose, arabinose, manitol, galactose e sacarose, o tempo de crescimento foi superior; sendo, por exemplo, de até 30 horas, quando crescidas em sacarose (ARIAS; MARTINEZ-DRETS, 1976). No entanto, *Bradyrhizobium* tem apresentado crescimento satisfatório em glicerol, a qual tem se como excelente substrato para rizóbios deste gênero, além da sua utilização ser muito mais econômica (LOPRETO; MAZZA; BALATTI, 1972; MARTINEZ-DRETS; ARIAS, 1972).

O glicerol é um subproduto da síntese de biodiesel que apresenta potencial para vários setores industriais (Figura 6) e também como substrato para o crescimento de micro-organismos em processos fermentativos industriais, os quais o convertem em produtos de maior valor agregado como etanol e H₂ (ITO et al., 2005; MARKOV; AVERITT; WALDRON, 2011; MOTA; SILVA; GONÇALVES, 2009).

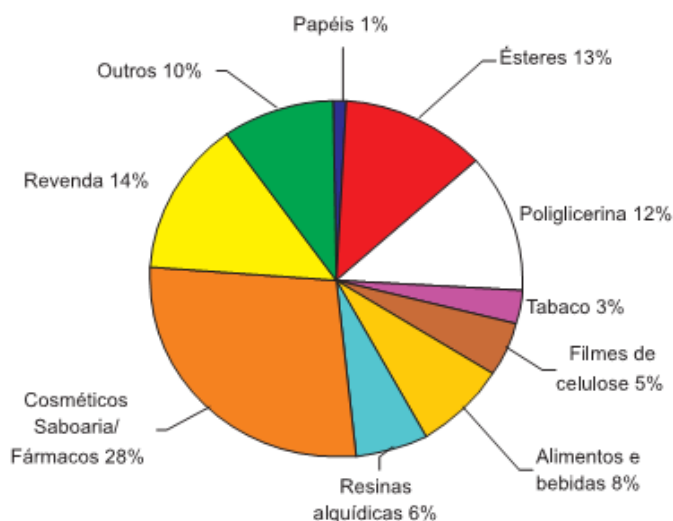


Figura 6 Principais setores industriais que utilizam glicerina
Fonte: Mota, Silva e Gonçalves (2009)

Pelo exposto, observa-se que há muitas informações sobre as características dos rizóbios. Os estudos de BNL apresentados ao longo do texto até este ponto foram desenvolvidos a partir de planejamentos que exigiram muita mão de obra, tempo e recursos. Felizmente, com o desenvolvimento e aperfeiçoamento de técnicas e planejamentos, como os delineamentos estatísticos experimentais adaptados à microbiologia é desenvolver vários trabalhos e obter resultados em menor tempo e com maior confiabilidade. Sendo, portanto, uma alternativa para otimização dos processos de cultivo microbiano.

2.6 Otimização de processos

A determinação das condições ótimas de crescimento de um micro-organismo, durante um processo fermentativo, é de suma importância devido ao

impacto econômico e viabilidade operacional da fermentação. A otimização do processo de cultivo microbiano requer o estudo dos parâmetros físicos, químicos e nutricionais. Geralmente, a maioria dos estudos com micro-organismos é realizada por meio da observação de um número reduzido de componentes nutricionais ou condições de operação. No entanto, devido à grande diversidade de interações entre os componentes do meio, as características metabólicas das células e os aspectos bioquímicos e físicos envolvidos nos sistemas de cultivo, a modelagem detalhada não ocorre satisfatoriamente. Os estudos com sucessivas alterações nos níveis das variáveis, muito comuns, não permitem a realização de uma combinação adequada. Além disso, são constituídos por um grande número de ensaios, que além de trabalhosos, podem levar a má interpretação dos resultados, uma vez que a interação entre os fatores é negligenciada (ABDEL-FATTAH et al., 2005; DUTA; FRANÇA; LOPES, 2006; HE et al., 2004; PAL; KHANUM, 2011; RODRIGUES; IEMMA, 2009).

É importante enfatizar também, que nos sistemas bioquímicos que envolvem múltiplas variáveis, as quais são potencialmente influentes nos processos, nem sempre é possível se verificar quais os mais importantes (KALIL; MAUGERI; RODRIGUES, 2000). Sendo assim, faz-se necessário submeter o processo a uma triagem inicial prévia à otimização. O estudo para a definição da melhor condição de crescimento e as necessidades nutricionais de um micro-organismo requer que a taxa de seu crescimento seja quantificada na presença de um determinado nutriente ou de condição específica. Se a falta do nutriente específico ou condição a qual o organismo está exposto altera, diminuindo a velocidade de crescimento, deduz-se que esses componentes são fatores limitantes. Uma vez que os fatores limitantes são estabelecidos, estuda-se sua influência sobre a produção de um determinado componente metabólico, como pigmentos, proteínas, lipídios e exopolissacarídeos (BEARDALL; YOUNG; ROBERTS, 2001; SCHIAVÃO-SOUZA et al., 2007).

A definição das condições ótimas da produção de biomassa microbiana envolve diversas variáveis e requer a execução de vários ensaios laboratoriais. O método clássico requer grande número de experimentos para determinação dos níveis ótimos de cada fator, e além de ser uma técnica demorada e onerosa, pode não mostrar as interações entre os componentes do processo. Uma alternativa para resolver esses problemas é efetuar a otimização utilizando planejamentos experimentais estatísticos que visem a redução do número de ensaios e a observação do efeito combinado de todos os fatores envolvidos no processo de formação de biomassa. Para uma otimização confiável, o primeiro passo deve ser a seleção das variáveis importantes, buscando-se a estimativa dos níveis ideais dessas variáveis. O Plackett-Burman é um tipo de planejamento que pode fornecer estas estimativas e auxiliar na redução do número de ensaios experimentais, através de análises de diferentes variáveis. O segundo passo do processo seria a otimização das variáveis selecionadas no Plackett-Burman, utilizando um planejamento fatorial, por exemplo, o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), e analisando pela Metodologia de Superfície de Resposta (RSM) (BOX; WILSON, 1951; COCHRAN; COX, 1966; PLACKETT-BURMAN, 1946; RODRIGUES; IEMMA, 2009). Finalmente, realizam-se os ensaios de validação experimental (KALIL; MAUGERI; RODRIGUES, 2000; PAL; KHANUM, 2011; RODRIGUES; IEMA, 2009).

O delineamento estatístico experimental Plackett-Burman é uma técnica muito utilizada para a seleção de variáveis independentes que interferem significativamente em um processo, mostrando quais fatores apresentam efeitos estatísticos significativos sobre as variáveis respostas (PLACKETT-BURMAN, 1946). Esta seleção possibilita a realização de uma triagem inicial de um processo, reduzindo o número de variáveis, inferindo quais as mais significativas (KALIL; MAUGERI; RODRIGUES, 2000; RODRIGUES; IEMA, 2009). Este tipo de planejamento tem sido utilizado para estudo de processos envolvendo

diversos tipos de micro-organismos. Os estudos vão desde a produção de biomassa, enzimas, produção de bebidas e alimentos fermentados, até a produção de hidrogênio para fornecimento de energia (ARNTHONG et al., 2010; DAVILA-VAZQUEZ et al., 2008; PURAMA; GOYAL, 2008; SHARMA; SATYANARAYANA, 2006).

Após a triagem das variáveis do processo, adota-se algum tipo de planejamento mais detalhado, como um planejamento fatorial completo com ponto central. O planejamento fatorial é empregado para se obter as melhores condições operacionais de um sistema sob estudo, realizando-se um número menor de experimentos quando comparado com o processo univariado de otimização do processo. O planejamento fatorial determina quais os fatores apresentam efeitos relevantes na resposta e, também, como o efeito de um fator varia com os níveis dos outros. Além disso, o planejamento fatorial permite avaliar as interações entre diferentes fatores. Essas interações são a principal componente de muitos processos de otimização. Sem o uso de planejamentos fatoriais de experimentos, importantes interações de fatores não são detectadas e a otimização máxima do sistema pode levar mais tempo para ser alcançada (BRASIL et al., 2006; BRASIL et al., 2007).

Recentemente, têm sido realizados vários estudos com micro-organismos, com intuito de otimizar as condições de cultivo ou o meio de cultura, para obtenção de algum metabólico de interesse e/ou biomassa, utilizando planejamentos estatísticos experimentais sequenciais. Muitos dos trabalhos de otimização de processo são constituídos por uma triagem inicial, seguidos por algum delineamento completo, como o DCCR, e os resultados são analisados pela Metodologia de Superfície de Resposta. Os autores Pal e Khanum (2011) trabalharam com *Aspergillus flavus* para a produção da enzima xilanase, demonstrando que uso dos modelos estatísticos propiciou um aumento de até 4 vezes a produção enzimática.

Há estudos sobre rizóbios, desde a seleção de estirpes, a definição dos componentes do meio de cultivo até a produção de inoculantes (BARBERI et al., 2004; BISSONNETTE; LALANDE; BORDELEAU, 1986; FRANKENBERG, 1990; KREMER; PETERSON 1983; MACCIÓ et al., 2002; SHERWOOD, 1972; SINGLETON; KEYSER; SANDE, 2002). Nestes estudos, geralmente, a otimização de variáveis independentes, tais como, fonte de carbono, nitrogênio, fatores de crescimento, e condições de cultivo, como pH, temperatura e agitação, entre outros, ocorre de forma isolada. Para analisar o efeito de uma variável independente, fixa-se todas as outras em determinado nível, o que demanda mais tempo e maior custo para a realização do estudo. Além disso, quando os experimentos são baseados na otimização de fatores isolados, mantendo os outros em níveis não especificados constantes, não se consegue o efeito combinado de todos os fatores envolvidos no processo (RODRIGUES; IEMMA, 2009). Recentemente, tem sido notado uma tendência ao uso de planejamentos estatísticos no estudo de rizóbios para a padronização de meio de cultura (ROJAS; GARRIDO; BONILLA, 2009; ROUSSI et al., 2010).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A simbiose rizóbio-leguminosa é uma interação importante para a manutenção dos ecossistemas e produção agrícola. A produção agrícola é diretamente beneficiada, principalmente pelo uso da biotecnologia de inoculação, com a adição de rizóbios selecionados para a leguminosa específica. Essa biotecnologia é de baixo custo e sem impacto ambiental negativo. A cultura do feijão-caupi pode ser beneficiada com uso de inoculantes, de forma que promova o aumento de produtividade e redução nos custos de produção.

O processo de produção de células não está definido para algumas estirpes de rizóbios, como é o caso de estirpes que são selecionadas para cultura de pouca expressão econômica-empresarial. Como exemplos de estirpes selecionadas, de comprovada eficiência em simbiose com feijão-caupi, são citadas a INPA 3-11B e UFLA 3-84, ambas já estão aprovadas pelo MAPA, para a produção de inoculantes.

Outro aspecto importante, que vale ser destacado é o fato que os estudos com micro-organismos, utilizando de planejamentos tradicionais requerem a realização de um grande número de ensaios que oneram o processo. No entanto, existem metodologias que favorecem a investigação científica, otimizando o processo de produção de células constituído por menor número de ensaios laboratoriais, reduzindo custo e mão de obra e possibilitando ainda, uma interpretação dos resultados com maior confiabilidade e clareza, por meio de estudos estatísticos sequenciais que possibilitam a análise da interação dos fatores durante todo processo.

REFERÊNCIAS

ABDEL-FATTAH, Y. R. et al., Improved production of *Pseudomonas aeruginosa* uricase by optimization of process parameters through statistical experimental designs. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 40, n. 5, p. 1707-1714, 2005.

ALMEIDA, A. L. G. et al., Produtividade do feijão-caupi cv BR 17 Gurguéia inoculado com bactérias diazotróficas simbióticas no Piauí. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 5, n. 3, p. 364-369, jul./set. 2010.

ALVAREZ, G. S. et al., **Evaluation of sol-gel silica matrices as inoculant carriers for *Mesorhizobium* spp. cells**. Badajoz: Formatex, 2010, p. 160-167. Disponível em: <<http://www.formatex.info/microbiology2/160-167.pdf>>. Acesso em: 23 set. 2011.

ANDRADE JÚNIOR, A. S. et al., **Cultivo de feijão-caupi**. 2003. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoCaupi/autores.htm>>. Acesso em: 22 nov. 2011.

ARIAS, A. ; MARTINEZ-DRETS, G. Glycerol metabolism in *Rhizobium*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 22, p. 150-153, 1976.

ARNTHONG, J. et al. Statistical screening of factors affecting glucoamylase production by a thermotolerant *Rhizopus* microspores TISTR 3518 using Plackett-Burman design. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 9, n. 43, p. 7312-7316, 25 Oct. 2010.

ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS PRODUTORES E IMPORTADORES DE INOCULANTES. **Estatística**. Disponível em: <<http://www.anpii.org.br>>. Acesso em: 10 nov. 2011.

BARBERI, A. et al., Crescimento de *Bradyrhizobium elkanii* Estirpe BR 29 em meios de cultivo com diferentes valores de ph inicial. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 2, p. 397-405, 2004.

BASHAN, Y. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 16, p. 729-770, 1998.

BEARDALL, J.; YOUNG, E.; ROBERTS, S.; Approaches for determining phytoplankton nutrient limitation. **Aquatic Sciences**, Basel, n. 63, p. 44-69, 2001.

BEN REBAH, F. et al., Agro-industrial waste materials and wastewater sludge for rhizobial inoculant production: a review. **Bioresource Technology**, Washington, v. 98, p. 3535-3546, 2007.

BEN REBAH, F.; TYAGI, R. D.; PRÉVOST, D. Production of *S. meliloti* using wastewater sludge as a raw material: effect of nutrient addition and pH control. **Environmental Technology**, Oxford, v. 23, n. 6, p. 623-629, 2002.

BISSONNETTE, N.; LALANDE, R.; BORDELEAU, L. M. Large-Scale production of *Rhizobium meliloti* on Wheyt. **Applied and Environmental Microbiology**, Whashington, v. 52, n. 4, p. 838-841, Oct. 1986.

BOIARDI, L.L.; ERTOLA, R.J. *Rhizobium* biomass production in batch and continuous culture with a malt-sprouts medium. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 1, p. 163-171, 1985.

BOX, G. E. P.; WILSON, K. B. Experimental attainment of optimum conditions. **Journal of the Royal Statistical Society**, Malden, v. 13, p. 1-45, 1951.

BRASIL, J. L. et al., Planejamento estatístico de experimentos como uma ferramenta para otimização das condições de bioissorção de Cu(II) em batelada utilizando-se casca de nozes pecã como bioissorvente. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 548-553, 2007.

BRASIL, J. L. et al., Statistical design of experiments as a tool for optimizing the batch conditions to Cr(VI) biosorption on Araucaria angustifolia wastes. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 133, p. 143–153, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 5, de 06 de agosto de 2004. Aprova as definições e normas sobre especificações, garantias, registro, embalagem e rotulagem dos inoculantes destinados à agricultura, bem como a relação dos microrganismos autorizados para produção de inoculantes no Brasil. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, n. 5, 10 ago. 2004. Seção 1, p.17.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 13, de 24 de março de 2011. Normas sobre especificações, garantias, registro, embalagem e rotulagem dos inoculantes destinados à agricultura. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, n. 58, 25 mar. 2011. Seção 1, p. 3-7.

BURTON, J. C. **Legume inoculant production manual**. Maui: NifTAL Center – MIRCEN, 1984. 96 p.

CAIRES, E. F. et al., Soybean yield and quality a function of lime and gypsum applications. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 63, n. 4, p. 370-379, 2006.
COCHRAN, W. G.; COX, G. M. **Experimental designs**. 2nd ed. New York: J. Wiley, 1966. 611p.

COHEN, G. N. **Microbial biochemistry**. Dordrecht: Springer, 2011. 557p.

CONWAY, T. The Entner-Doudoroff pathway: history, physiology and molecular biology. **FEMS Microbiology Reviews**, Malden, v.103, p.1-28, 1992.

COOPER, J. E. Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. **Journal of Applied Microbiology**, Malden, v. 103, p. 1355-1365, 2007.

COSTA, E. M. et al., Nodulação e produtividade de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. por cepas de rizóbio em Bom Jesus, PI. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 42, n. 1, p. 1-7, jan./mar. 2011.

CRAVO, M. S. et al., **A cultura do feijão-caupi na Amazônia Brasileira**. Boa Vista: Embrapa Roraima, 2009. 356 p.

DATE, R. A. Inoculated legumes in cropping systems of the tropics. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 65, p.123-136, 2000.

DATE, R. A. Legume inoculant production. **Proceedings Indian National Science Academy**, New Delhi, v. 40, n. 6, p. 667-686, 1976.

DAVILA-VAZQUEZ, A. G. et al., Fermentative hydrogen production in batch experiments using lactose, cheese whey and glucose: Influence of initial substrate concentration and pH. **International Journal of Hydrogen Energy**, Oxford, v. 33, p. 4989-4997, 2008.

DEAKER, R.; ROUGHLEY, R. J.; KENNEDY, I. R. Legume seed inoculation technology: a review. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 36, p. 1275-1288, 2004.

DÖBEREINER, J. Avanços recentes na pesquisa em fixação biológica de nitrogênio no Brasil. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 4, n. 8, jan./abr. 1989. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-40141990000100011&script=sci_arttext>. Acesso em: 21 nov. 2011.

DROZDOWICZ, A. Bactérias do solo. In: VARGAS, M. T.; HUNGRIA, M. **Biologia dos solos dos cerrados**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1997. p. 17-67.

DUTA, F. P.; FRANÇA, F. P.; LOPES, L. M. A. Optimization of culture conditions for exopolysaccharides production in *Rhizobium* sp. using the response surface method. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 9, n. 4, p. 391-399, July 2006.

FERNANDES JÚNIOR, P. I. et al., Polymers as carriers for rhizobial inoculant formulations. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 9, p. 1184-1190, set. 2009.

FILGUEIRAS, G. C. et al., Aspectos socioeconômicos. In: ZILLI, J. É.; VILARINHO, A. A.; ALVES, J. M. A.. A cultura do feijão-caupi na Amazônia Brasileira. Boa Vista: Embrapa Roraima, 2009. 356 p.

FLORENTINO, L. A. et al., Diversity and efficiency of rhizobia strains isolated from soil samples collected near the roots of *Sesbania virgata* using cowpea as trap species. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 34, p. 1113-1123, 2010.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Legume inoculants and their use**. Rome, 1984. 63 p.

FRANCHI, J. G.; SÍGOLO, J. B.; LIMA, J. R. B. Turfa utilizada na recuperação ambiental de áreas mineradas: metodologia para avaliação laboratorial. **Revista Brasileira de Geociências**, Curitiba, v. 33, n. 3, p. 255-262, 2003.

FRANCO, A. A.; DÖBEREINER, J. **Fixação biológica de nitrogênio**. Brasília: Associação Brasileira de Educação Agrícola Superior, 1988. 54 p.

FRANKENBERG, C. L. C. **Tecnologia da produção de inoculantes de *Bradyrhizobium japonicum* em fermentador e em turfa**. 1990. 206 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1990.

FRANKENBERG, C. L. C.; FREIRE, J. R. J.; THOMAS, R. W. P. Growth and competition between two strains of *B. japonicum* in broth and in a peat-based inoculant: dinitrogen fixation efficiency and competition for nodulation sites. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 211-218, 1995.

FREIRE FILHO, F. R. et al., Melhoramento genético. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. de A.; RIBEIRO, V. Q. (Ed.). **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 519 p.

GRASSANO, A. E. et al., Quantitative relationship between maximum growth rates and the intracellular pattern of α -esterase and β -esterase activity of leguminous infecting bacteria. **New Biotechnology**, Amsterdam, v. 26, n. 5, p. 234-238, Nov. 2009.

HE, Q. H. et al., Improved elastase production by *Bacillus* sp. EL31410-further optimization and kinetics studies of culture medium for batch fermentation. **Journal of Zhejiang University-SCIENCE**, Zhejiang, v. 5, p. 149-156, 2004.

HERRIDGE, D. F.; PEOPLES, M. B.; BODDEY, R. M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems David F. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 311, p. 1-18, 2008.

HERRIDGE, D.; GEMELL, G.; HARTLEY, E. **Legume inoculants and quality control: inoculants and nitrogen fixation of legumes in Vietnam**. Canberr: ACIAR Proceedings, 2002. 109 p.

HUNGRIA, M. et al., Nitrogen nutrition of soybean in Brazil: Contributions of biological N₂ fixation and N fertilizer to grain yield. **Canadian Journal of Plant Science**, Ontario, p. 927-939, 2006. Disponível em: <<http://pubs.aic.ca/doi/pdf/10.4141/P05-098>>. Acesso em: 3 jan. 2012.

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

INAIZUMI, H. et al., **Adoption and impact of dry-season dual-purpose cowpea in the semiarid zone of Nigeria**. Ibadan: IITA, 1999.

ITO, T. et al., Hydrogen and Ethanol Production from Glycerol-Containing Wastes Discharged after Biodiesel Manufacturing Process. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 100, n. 3, p. 260-265, 2005.

KALIL, S. J.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 35, p. 539-550, 2000.

KREMER, R. J.; PETERSON, H. L. Effects of carrier and temperature on Survival of *Rhizobium* spp. in legume inocula: development of an improved type of inoculant. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 45, n. 6, p. 1790-1794, 1983.

LACERDA, A. M. et al., Efeito de estirpes de rizóbio sobre a nodulação e produtividade do feijão-caupi. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 51, n. 293, p. 67-82, 2004.

LÓPEZ-LARA, I. M. ***Rhizobium* y su destacada simbiosis con las leguminosas**. Mexico: Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México, 2007. Disponível em: <www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO_11/Capitulo11.pdf>. Acesso em: 5 ago. 2011.

LOPRETO, C. R.; MAZZA, L. A.; BALATTI, A. P. Influencia de los componentes del medio de cultivo sobre el tiempo de generacion de una cepa de *Rhizobium japonicum*. *Annales Sociedade Cientifica Argentina*, Buenos Aires, v. 193, n. 1/2, p. 35-47, 1972.

LORDA, G. S.; BALATTI, A. P. Designing média I. In: BALLATI, A. P.; FREIRE, J. R. J. **Legume inoculants**: selection and characterization of strains: production, use and management. Buenos Aires: Kingraf, 1996. 148 p.

MARKOV, S. A.; AVERITT, J.; WALDRON, B. Bioreactor for glycerol conversion into H₂ by bacterium *Enterobacter aerogenes*. **International Journal of Hydrogen Energy**, Oxford, v. 36, p. 262-266, 2011.

MARTINEZ-DRETS, G.; ARIAS, A. Enzymatic basis for differentiation of *Rhizobium* into Fast- and Slow-Growing Groups. **Journal of Bacteriology**, Whashington, v. 109, n. 1, p. 467-470, Jan. 1972.

MARTINS, L. M. V. et al., Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: a strategy for improving grain yield in the semi-arid region of Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, New York, v. 38, p. 333-339, 2003.

MIGUEL, D. L.; MOREIRA, F. M. S. Influencia do pH do meio de cultivo e da turfa no comportamento de estirpes de *Bradyrhizobium*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 25, n. 4, p. 873-883, out./dez. 2001.

MOAT, A. G.; FOSTER, J. W.; SPECTOR, M. P. **Microbial physiology**. 4th ed, New York: . J. Wiley and Sons, 2002. 714 p.

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

MOREIRA, F. M. S. **Estirpes de bactérias altamente eficientes que fornecem nitrogênio para o caupi foram selecionadas na UFLA e já são recomendadas para a produção de inoculantes comerciais.** Lavras: UFLA, 2005. 12 p. Boletim de Extensão. Disponível em: <[www.ufla.br/editora/publicações/boletim de extensão](http://www.ufla.br/editora/publicações/boletim_de_extensao)>. Acesso em: 19 abr. 2006.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo.** 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. 729 p.

MOREIRA, F.M.S. Fixação Biológica do nitrogênio em espécies arbóreas. In: ARAUJO, R.S. & HUNGRIA, M., eds. **Microorganismos de importância agrícola.** Brasília, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1994. p.121-149.

MOREIRA, F.M.S.; CRUZ, L.; FARIA, S.M.; MARSH, T.; MARTINEZ-ROMERO, E.; PEDROSA, F.O.; YOUNG, P.P.W. *Azorhizobium doebereineriae* sp. nov. Microsymbiont of *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. **Systematic and Applied Microbiology**, Freising, v.29, n. 3, p.197-206, 2006.

MOTA, C. J. A.; SILVA, C. X. A.; GONÇALVES, V. L. C. Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da Glicerina de produção de biodiesel. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 639-648, 2009.

MOULIN, L. et al., Nodulation of legumes by members of the β -subclass of Proteobacteria. **Nature**, London, v. 411, n. 21, p. 948-950, June 2001.

PADULOSI, S.; NG, N. Q. Origin taxonomy, and morphology of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. In: SINGH, B. B. et al., **Advances in cowpea research.** Tsukuba: IITA, JIRCAS, 1997. p. 1-12.

PAL, A.; KHANUM, F. Identification and Optimization of Critical Medium Components Using Statistical Experimental Designs for Enhanced Production of Xylanase from *Aspergillus flavus* DFR-6. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 49, n. 2, p. 228-236, 2011.

PAVAN, C.; MOREIRA FILHO, C. A. **Bactérias fixadoras de nitrogênio na agronomia e na biodiversidade**. Disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio04/4hp_11.asp>. Acesso em: 21 abr. 2006.

PLACKETT, R. L.; BURMAN, J. P. The design of optimum multifactorial experiments. **Biometrika**, Oxford, v. 33, n. 4, p. 305–325, 1946. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/2332195>>. Acesso em: 10 maio 2011.

POOLE, P. S. et al., **Physiology of root-nodule bacteria**. In: DILWORTH, M. C. et al., Nitrogen-fixing Leguminous Symbioses. Dordrecht: Springer, 2008. p. 241-292.

PRADELLA, J. G. C.; OLIVEIRA, M. S.; URENHA, L. C. Produção de inoculantes Agrícolas. In: LIMA, U. A. et al., (Coord.). **Biotecnologia industrial**. São Paulo: E. Blücher, 2001. v. 3, p. 279-305.

PURAMA, R. K.; GOYAL, A. Screening and optimization of nutritional factors for higher dextransucrase production by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-640 using statistical approach. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 99, p. 7108-7114, 2008.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 2. ed. Campinas: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2009. 325 p.

ROJAS, T. D. F.; GARRIDO, R. M. F.; BONILLA, B. R. R. Standardization of a complex culture media for multiplication of C50 *Rhizobium* sp. strain. **Revista Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuarias**, Mosquera, v. 10, n. 1, p. 70-80, 2009.

ROMÃO, L. P. C. et al., Structure and properties of Brazilian Peat: analysis by spectroscopy and microscopy. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 18, n. 4, p. 714-720, 2007.

ROUSSI, T. et al., Centrifugal recovery of rhizobial cells from fermented starch industry wastewater and development of stable formulation. **Industrial Biotechnology**, Swansea, v. 6, n. 1, p. 41–49, 2010.

SCHIAVÃO-SOUZA, T. D. et al., Produção de exopolissacarídeos por bactérias probióticas: otimização do meio de cultura. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 10, n. 1, p. 27-34, jan./mar. 2007.

SHARMA, D. C.; SATYANARAYANA, T. A marked enhancement in the production of a highly alkaline and thermostable pectinase by *Bacillus pumilus* dcsr1 in submerged fermentation by using statistical methods. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 97, p. 727-733, 2006.

SHERWOOD, M. T. Inhibition of *Rhizobium trifolii* by yeast extracts or glycine is prevented by calcium. **Journal of General Microbiology**, Great Britain, v. 71, p. 351-358, 1972.

SINDHU, S. S. et al., Growth promotion of legumes by inoculation of Rhizosphere bacteria. In: KHAN, M. S.; ZAIDI, A.; MUSARRAT, J. (Ed.) *Microbes for legume improvement*. Wien: Springer-Verlag, 2010. 535 p.

SINGH, B. B. et al., Recent progress in cowpea breeding. In: FATOKUN, C. A. et al., (Ed.). **Challenges and opportunities for enhancing sustainable cowpea production**. Ibadan: IITA, 2002. p. 22-40.

SINGH, U. S.; KAPOOR, K. **Microbial biotechnology**. Jaipur: Oxford Book Company, 2010. 310 p.

SINGLETON, P.; KEYSER, H.; SANDE, E. Development and evaluation of liquid inoculants. In: HERRIDGE, D. (Ed.). **Inoculants and nitrogen fixation of legumes in Vietnam**. Canberra: ACIAR Proceedings, 2002. Disponível em: <<http://aciarc.gov.au/files/node/2110/pr109echapter07.pdf>>. Acesso em: 24 jun. 2011.

SIQUEIRA, J. O.; FRANCO, A. A. **Biotecnologia do solo: fundamentos e perspectivas**. Brasília: Ministério da Educação, ABEAS; Lavras: ESAL, FAEPE, 1988. 236 p.

SOARES, A. L. L. et al., Eficiência agrônômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões (MG). I – Caupi⁽¹⁾. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 30, p. 795-802, 2006.

SOUSA, P. M.; MOREIRA, F. M. S. Potencial econômico da inoculação de rizóbios em feijão-caupi na agricultura familiar: um estudo de caso. **Em Extensão**, Uberlândia, v. 10, n. 2, p. 37-54, 2011.

STOWERS, M. D. Carbon metabolism in *Rhizobium* species. **Annual Reviews Microbiology**, Netherlands, v. 39, p. 89-108, 1985.

STOWERS, M. D.; ELKAN, G. H. Growth and nutritional characteristics of cowpea rhizobia. **Plant and Soil**, New York, v. 80, p. 191-200, 1984.

SURPIN, M. A.; MAIER, R. J. Roles of the *Bradyrhizobium japonicum* terminal oxidase complexes in microaerobic H⁻ dependent growth. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, Amsterdam, v. 1364, n.1, p. 37-45, Apr. 1998.

TITABUTR, P. et al., Growth, survival and field performance of Bradyrhizobial liquid inoculant formulations with polymeric additives. **SCIENCEASIA**, Bangkok, v. 33, p. 69-77, 2007.

URENHA, L. C. et al., Produção de biomassa celular de rizóbio. In: HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. 542 p.

VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific, 1970. 164 p. (International Biological Programme Handbook, 15).

WAITES, M. J. et al., **Industrial microbiology**: an introduction. Oxford: Blackwell Science, 2001. 288 p.

ZILLI, J. E.; CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M. **Eficácia da inoculação de *Bradyrhizobium* em pré-semeadura da soja**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 45, n. 2, p. 335-338, mar. 2010.

ZILLI, J. E.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G. **Fixação biológica de nitrogênio na cultura do feijão-caupi no Estado de Roraima**. Roraima: Embrapa Roraima, 2006.

SEGUNDA PARTE

**ARTIGO 1 OTIMIZAÇÃO DO CULTIVO DA ESTIRPE DE
BRADYRHIZOBIUM INPA 03-11B, INOCULANTE DO FEIJÃO-CAUPI
USANDO A METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA**

Normas da Revista World Journal of Microbiology and Biotechnology (Versão preliminary em Língua Portuguesa)

Pedro M. Sousa¹; Silvia M. de Oliveira¹; Disney R. Dias²; Rosane F. Schwan¹;
José Guilherme L. F. Alves²; Fatima M. S. Moreira^{3*}

¹Departamento de Biologia,

²Departamento de Ciência dos Alimentos, UFLA

³Departamento de Ciência do Solo, Universidade Federal de Lavras – UFLA,
Caixa Postal 3037, CEP 37200-000, Lavras – Minas Gerais – Brasil

* Autor para correspondência: fmoreira@dcs.ufla.br. tel: +55 35 3829 1254

RESUMO

O objetivo do trabalho foi otimizar as condições de cultivo da estirpe de *Bradyrhizobium* INPA 03-11B, aprovada como inoculante para a cultura do feijão-caupi. Partindo-se de um meio de cultura líquido já utilizado para a produção industrial, foi realizada uma estratégia seqüencial de planejamentos experimentais para a otimização do crescimento celular. Inicialmente, foi utilizado o delineamento de Plackett-Burman para avaliar as seguintes variáveis: temperatura, agitação, glicerol, extrato de levedura, % de inóculo e pH. Foram selecionadas duas variáveis (agitação e concentração do extrato de levedura); a agitação por apresentar efeito estatisticamente significativo sobre o crescimento celular, e o extrato de levedura por apresentar efeito próximo da significância e importância no metabolismo bacteriano. Em seguida, utilizando um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), os resultados foram otimizados por meio de Superfícies de Resposta. População superior a $1,0 \times 10^{10}$ UFC mL⁻¹ após 120h foi obtida utilizando o meio de cultura composto por: glicerol, 8,0 g L⁻¹; extrato de levedura, 5,0 g L⁻¹; K₂HPO₄, 0,5 g L⁻¹; MgSO₄.7H₂O, 0,2 g L⁻¹; NaCl, 0,1 g L⁻¹; KNO₃, 0,8 g L⁻¹; (NH₄)₂HPO₄, 0,3 g L⁻¹; e FeCl₃ (10%), 0,1 mL L⁻¹ e MnSO₄ (10%), 0,1 mL L⁻¹. Os melhores resultados da produção biomassa foram observados quando a faixa ótima de agitação situou-se entre 170 e 180 rpm e a concentração de extrato de levedura foi de 5 g L⁻¹.

Palavras-chave: *Bradyrhizobium* INPA 03-11B, inoculante, Plackett-Burman, Metodologia de Superfície de Resposta.

ABSTRACT

The aim of this work was to optimize growing conditions of the *Bradyrhizobium* strains INPA 03-11B, approved as inoculant for the cultivation of cowpea. Starting from a liquid culture medium already been used for industrial manufacturing, it was performed a sequential strategy of experimental design to optimize rhizobial cell growth. Initially was used the Plackett-Burman design for evaluating the following variables: temperature, agitation, glycerol, yeast extract, % of inoculum and pH. The variables agitation and yeast extract were selected by statistically significant effect on cell growth (in the case of agitation) or by effect close to significance and importance in bacterial metabolism (in the case of yeast extract). Using a Central Composite Rotational Design (CCRD) and response surface methodology, the results were optimized. Population above 1.0×10^{10} CFU mL⁻¹ after 120 hours was obtained using the culture medium composed of: glycerol (8.0 g L⁻¹); yeast extract (5.0 g L⁻¹); K₂HPO₄ (0.5 g L⁻¹); MgSO₄·7H₂O (0.2 g L⁻¹); NaCl (0.1 g L⁻¹); KNO₃ (0.8 g L⁻¹); (NH₄)₂HPO₄ (0.3 g L⁻¹), and FeCl₃ the 10% (0.1 mL L⁻¹) and MnSO₄ the 10% (0.1 mL L⁻¹). The better results of biomass production were observed when the range of agitation was between 170 and 180 rpm and the concentration of yeast extract of 5.0 g L⁻¹.

Keywords: *Bradyrhizobium* INPA 3-11B, inoculant, Plackett-Burman, Central Composite Rotatable Design (CCRD).

Introdução

A simbiose rizóbio-leguminosa desempenha importante papel na agricultura e no meio ambiente. Nesta simbiose, a fixação biológica de nitrogênio atmosférico (FBN), processo ecológica e economicamente vantajoso, pode substituir os onerosos adubos químicos nitrogenados. Os benefícios da FBN podem ser maximizados ou direcionados para culturas de interesse através da prática de inoculação de leguminosas com rizóbios selecionados. No Brasil, o melhor exemplo de utilização deste processo é a cultura da soja, na qual a adubação química nitrogenada é totalmente substituída pela utilização de inoculantes contendo bactérias do gênero *Bradyrhizobium*. Isso proporcionou, apenas na safra 2006/2007, uma economia de aproximadamente 3,3 bilhões de dólares (MOREIRA, 2008).

Embora, no Brasil existam estirpes selecionadas e aprovadas para a produção de inoculantes para cerca de 100 espécies de leguminosas, incluindo o feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), poucas estirpes são utilizadas para a produção de inoculantes, cujo uso é restrito praticamente à soja. De aproximadamente 26 milhões de doses de inoculantes (produzidas no Brasil e importadas) comercializados em 2003, 99 % foram para a cultura da soja e apenas 1 % para as outras espécies, especialmente para o feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). O sucesso da tecnologia de inoculação na soja pode estar relacionado ao fato de ser uma cultura de exportação, que tem recebido investimentos consideráveis em pesquisa ao longo do tempo, por parte do governo e empresas, visando o melhoramento genético da planta e melhor aproveitamento da FBN, o que não ocorreu com outras culturas brasileiras.

O feijão-caupi é uma das espécies vegetais com alto potencial de ser nutrida com N através do processo FBN utilizando estirpes selecionadas. Para

esta cultura existem estirpes eficientes selecionadas, e que já são aprovadas pelo Ministério da Agricultura Abastecimento e Pecuária (MAPA) para a produção de inoculantes (LACERDA et al., 2004; BRASIL, 2011; SOARES et al., 2006). O feijão-caupi é uma espécie rústica, bem adaptada às diferentes condições ambientais do Brasil e que apresenta excelente valor nutritivo, sendo de grande valor estratégico (FREIRE-FILHO et al., 2005) para economia do País. Estudos já demonstraram que essa cultura pode ser beneficiada pela FBN, com aumentos significativos na produtividade, principalmente considerando que o rendimento médio nacional é muito baixo, cerca de 500 kg ha⁻¹. Em campo, por meio da inoculação com estirpes selecionadas e adubação básica com fósforo e potássio, no Sul de Minas, os rendimentos variaram entre 900 kg ha⁻¹ e 1.300 kg ha⁻¹ (LACERDA et al., 2004; SOARES et al., 2006).

As estirpes bacterianas atualmente aprovadas pelo MAPA como inoculantes para feijão-caupi são os microssimbiontes: UFLA 3-84 e INPA3-11B (LACERDA et al., 2004; SOARES et al., 2006; BRASIL, 2011) e a BR 3267 (MARTINS et al., 2003). As estirpes UFLA 3-84 e INPA3-11B demonstraram alto potencial de fixação em simbiose com feijão-caupi nas regiões Nordeste, Norte e Centro Oeste. No Piauí foram obtidos rendimentos de grãos de 1.370 kg ha⁻¹ com UFLA 3-84 e 1.950 kg ha⁻¹ com a INPA 03-11B (ALMEIDA et al., 2010) e 1.223 kg ha⁻¹ com a INPA 03-11B (COSTA et al., 2011). Sousa e Moreira (2011) obtiveram rendimento de aproximadamente 900 kg ha⁻¹ com a estirpe INPA 03-11B, em Confresa – MT. Zilli et al., (2009) com a mesma estirpe no estado de RR, em área de mata alterada e cerrado obtiveram rendimentos de 1.759 e 1.104 kg ha⁻¹, e 1.653 e 1728 kg ha⁻¹, nos anos agrícolas 2005 e 2006 respectivamente.

Embora, tenham sido bem estudadas desde o princípio de seleção e demonstrado seu alto potencial de fixação no campo, o processo de obtenção de células das estirpes inoculantes de feijão-caupi em escala industrial ainda não

está definido, ou é desconhecido. Além disso, elas não têm sido utilizadas para a produção de inoculantes em escala comercial, pois o feijão-caupi é predominantemente cultivado por pequenos agricultores, sendo, portanto um mercado potencial do varejo e não de atacado que é mais vantajoso para o setor industrial. Assim, sua produção e disponibilização poderiam ser viabilizadas, por exemplo, por pequenas empresas incubadas nas instituições públicas de ensino e pesquisa em ciências agrárias, geralmente localizadas em centros de produção agrícola. Assim existe a necessidade de serem definidas as condições ótimas de produção de biomassa para a elaboração do inoculante e sua disponibilização para uso na agricultura. As definições das condições dependem do estudo de vários fatores que estão envolvidos no processo de cultivo bacteriano em larga escala.

A definição das condições ótimas da produção de biomassa microbiana envolve diversas variáveis e requer a execução de vários ensaios laboratoriais. O método clássico requer grande número de experimentos para determinação dos níveis ótimos de cada fator e, além de ser uma técnica demorada e onerosa, pode não mostrar as interações entre os componentes do processo. Uma alternativa para resolver esses problemas é efetuar a otimização utilizando planejamentos experimentais estatísticos que visem a redução do número de ensaios e a observação do efeito combinado de todos os fatores envolvidos no processo de formação de biomassa. Para otimização confiável, o primeiro passo deve ser a seleção das variáveis mais importantes, buscando-se a estimativa dos níveis ideais dessas variáveis (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

A seleção das variáveis pode ser feita utilizando o delineamento estatístico Plackett-Burman, que é um tipo de planejamento fatorial incompleto utilizado para indicar quais variáveis dentro de um grupo exercem efeitos estatisticamente significativos sobre uma variável resposta (RODRIGUES; IEMMA, 2009). O segundo passo do processo é otimizar as variáveis

selecionadas no Plackett-Burman, utilizando um planejamento fatorial completo, como, por exemplo, o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) e analisando-se pela Metodologia de Superfície de Resposta (RSM) (BOX; WILSON, 1951; COCHRAN; COX, 1966). Na última etapa, realizam-se os ensaios de validação experimental (KALIL; MAUGERI; RODRIGUES, 2000; RODRIGUES; IEMMA, 2009).

Há estudos sobre rizóbios, desde a seleção de estirpes e definição dos componentes do meio de cultivo, até a produção de inoculantes (SHERWOOD, 1972; KREMER; PETERSON, 1983; BISSONNETTE; LALANDE; BORDELEAU, 1986; FRANKENBERG, 1990; MACCIÓ et al., 2002; SINGLETON; KEYSER; SANDE, 2002; BARBERI et al., 2004). Nestes estudos, geralmente a otimização de variáveis independentes tais como fonte de carbono, nitrogênio, fatores de crescimento e condições de cultivo, como pH, temperatura e agitação, entre outros, ocorre de forma isolada. Para analisar o efeito de uma variável independente, fixam-se todas as outras em determinado nível, o que demanda mais tempo e maior custo para a realização do estudo. Além disso, quando os experimentos são baseados na otimização de fatores isolados, mantendo os outros em níveis não especificados constantes, não se consegue o efeito combinado de todos os fatores envolvidos no processo (RODRIGUES; IEMMA, 2009). Recentemente, tem-se utilizado planejamentos estatísticos no estudo de rizóbios para a padronização de meios de cultura (ROJAS; GARRIDO; BONILLA, 2009; ROUSSI et al., 2010).

O presente trabalho teve como objetivo otimizar o processo de produção de inoculante com a estirpe de *Bradyrhizobium* INPA 03-11B, aprovada como inoculante de feijão-caupi, testando diferentes níveis de glicerol, extrato de levedura, porcentagem de inóculo, pH inicial do meio e condições de incubação, utilizando planejamentos experimentais estatísticos.

Material e Métodos

O trabalho foi constituído por 27 ensaios, realizados em três etapas de cultivo da estirpe INPA 03-11B do gênero *Bradyrhizobium*, um microsimbionte de feijão-caupi. A primeira etapa constituiu-se de 15 ensaios, para a triagem de variáveis importantes no processo de crescimento celular, sendo três representando o ponto central. Na segunda etapa, duas variáveis foram escolhidas e 11 ensaios foram realizados para identificar o nível ótimo das variáveis significativas para promover a melhor produção de biomassa. A última etapa foi constituída por um ensaio com três repetições para a validação do modelo otimizado.

Micro-organismo e sua origem

A estirpe de *Bradyrhizobium* sp. INPA 03-11B (acesso genbank: EF158575) (Tabela 1), pertence à Família Bradyrhizobiaceae, Filo α -Proteobacteria, Domínio Bacteria. É uma estirpe aprovada para a produção de inoculante para feijão-caupi pelo MAPA (Ministério de Agricultura, Abastecimento e Pecuária). Foi isolada de *Centrosema* sp., em solo da Amazônia (MAGALHÃES, 1986), tendo sido selecionada inicialmente a partir do cultivo em vasos com substrato estéril, em 1982, no INPA (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia), localizado em Manaus e, posteriormente em Minas Gerais em condições axênicas, em vasos com solo e no campo, na UFLA (LACERDA et al., 2004; MOREIRA, 2005; SOARES et al., 2006).

Tabela 1 Identificação, origem (sistema de uso/estado) e características culturais da estirpe estudada (LACERDA et al., 2004)

Identificação	Designação		Características culturais em placa				
	SEMIA	Origem	TACI ¹	D ²	pH ³	AI ⁴	Cor
INPA 03-11B	6462	Terra firme/AM	7	1	Alcalino	Não	Branca

¹Tempo em dias para aparecimento de colônias isoladas, ²diâmetro da colônia, ³reação do meio de cultivo após crescimento de colônias e ⁴absorção de indicador do meio de cultivo.

Meios de cultura

Foram utilizados os seguintes meios de cultura: meio 79 (FRED; WAKSMAN, 1928), também conhecido como YMA (VINCENT, 1970), com azul de bromotimol e pH 6,8; e o meio industrial proposto por Lopreto; Mazza; Balatti (1972), acrescido de 5 mL de solução de micronutrientes de Zabriskie et al., (1980), com composição por litro: 0,22 g de ZnSO₄.7H₂O; 0,55 g de CaCl₂; 0,50 g de MnCl₂; 0,50 g de FeSO₄; 0,1 g L⁻¹ de (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O; 0,16 g de CuSO₄ e 0,16 g de CoCl₂. As composições dos meios de cultura e especificações de cada reagente encontram-se descritas nas Tabelas 2 e 3.

Produção do inóculo e inoculação

A estirpe INPA 03-11B foi previamente crescida no meio de cultura sólido, contido em placa de Petri, incubada a 28 °C, durante cinco dias. Após a etapa de crescimento da estirpe em placas, foi retirada uma alçada e adicionada a 100 mL de meio líquido de Lopreto, com pH entre 6,8 e 7,0, contido em Erlenmeyers de 250 mL (LOPRETO; MAZZA; BALATTI, 1972). Em seguida, as culturas foram incubadas a 28 °C, sob agitação constante de 120 rpm, durante 5 dias. Todo o procedimento foi realizado assepticamente e em três repetições.

Tabela 2 Composição dos meios de cultura utilizados para cultivo em placas e fermentação em meio líquido

79		Lopreto; Mazza; Balatti (1972)	
Componentes	Quantidade L ⁻¹	Componentes	Quantidade L ⁻¹
C ₆ H ₁₄ O ₆ (manitol)	10g	C ₃ H ₈ O ₃ (glicerol)	10,0 g
Extrato de levedura	0,4 g	Extrato de levedura	4,0 g
K ₂ HPO ₄ a 10%	1 mL	K ₂ HPO ₄	0,5 g
KH ₂ PO ₄ a 10%	4 mL	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O a 10%	2 mL	NaCl	0,1 g
NaCl a 10%	1 mL	KNO ₃	0,8 g
Azul de Bromothimol (0,5%) em KOH a 0,2N	5 mL	(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,3 g
Agar	15 g	FeCl ₃ a 10%	0,1 mL
		MnSO ₄ a 10 %	0,1 mL
pH	6,8	pH	6,8

Tabela 3 Reagentes utilizados para o preparo do meio de cultura e solução de micronutrientes (ZABRISKIE et al., 1980) para o cultivo da estirpe de *Bradyrhizoiium* INPA 3-11B, apresentando marcas e composição

Meio Lopreto	Composição (%)												
	Teor	N	K	Na	Cl	¹ MP	Fe	Ca	PO ₄	SO ₄	Mn	Mg	Lote
C ₃ H ₈ O ₃ (glicerol)– VETEC	99,5	-	-	-	0,003	0,0002	-	-	-	0,001	-	-	0904114
² Ext/o Levedura –HIMEDIA	10,5	³ 3,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0000073119
K ₂ HPO ₄ – SYNTH	98,0	0,001	-	-	0,01	0,0005	0,001	-	-	-	-	-	107784
MgSO ₄ .7H ₂ O – VETEC	98,0	*0,004	0,005	0,005	0,0005	0,0005	0,0005	0,02	-	-	0,0005	-	0903528
NaCl – ISOFAR	99,0	*0,004	0,005	-	-	0,0005	0,0002	0,002	0,0005	0,004	-	0,001	091418
KNO ₃ – VETEC	99,0	*--	-	0,005	0,002	0,0005	0,01	0,01	0,0005	0,003	-	0,01	0903403
(NH ₄) ₂ HPO ₄ – VETEC	98,0	*0,008	0,005	0,005	0,001	0,001	0,001	0,001	-	0,01	-	0,0005	0905147
FeCl ₃ .6H ₂ O – VETEC	97,0	*0,01	-	-	-	-	0,002	-	0,01	0,01	-	-	1000608
MnSO ₄ .H ₂ O – VETEC	98,0	-	0,01	0,05	0,005	0,002	0,002	0,005	-	-	-	0,005	0602324
Solução Zabriskie et al., (1980)													
ZnSO ₄ .7H ₂ O – VETEC	99,0	0,003	0,01	0,05	0,0005	0,003	0,001	0,005	-	-	0,0003	0,005	0900199
CaCl ₂ .2H ₂ O –PROQUÍMIOS	74,0	0,008	0,01	0,02	-	0,0005	0,001	-	-	0,01	-	0,005	08/0055
MnCl ₂ .4H ₂ O – VETEC	99,0	-	0,01	0,05	-	0,0005	0,0005	0,005	-	0,005	-	0,005	0703865
FeSO ₄ – VETEC	99,0	-	-	-	0,001	-	0,2	-	0,001	-	0,05	-	1001685
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O –SYNTH	81,0	0,003	-	-	0,002	0,001	-	0,001	0,001	0,02	-	-	113677
CuSO ₄ .5H ₂ O – MERCK	99,0	0,001	0,001	0,005	0,0005	0,005	0,003	0,001	-	-	-	-	A779290
CoCl ₂ .6H ₂ O – CINÉTICA	98,0	-	-	-	-	-	-	-	-	0,01	-	-	15565

* compostos nitrogenados, como NO₃, NO₂, NH₄; ¹MP: metais pesados como Pb. ² 5,0 g NaCl; ³N α-amino;

O procedimento de inoculação foi realizado através da adição de alíquotas do inóculo com densidade óptica a 600nm padronizado a 0,4, contendo 10^9 UFC mL⁻¹, em Erlenmeyer (500 mL), contendo 300 mL de meio Lopreto. O volume de inóculo adicionado ao meio foi de acordo com o determinado nos planejamentos experimentais.

Avaliações realizadas

A partir de todos os ensaios, foram realizadas as seguintes determinações: biomassa celular (peso seco de células em g L⁻¹); Produtividade (Log UFC L h⁻¹); e contagem (UFC mL⁻¹), pelo método da inoculação de microgotas (MILES; MISRA, 1938).

As avaliações foram realizadas de 24 em 24 horas, a partir de 0h. Para determinar a biomassa celular foram coletadas alíquotas de 2 mL das amostras, a partir do momento da inoculação, até o décimo dia de cultivo. A determinação da biomassa celular foi realizada mediante a centrifugação de amostra de 0,5 mL do meio, em microtubos (2 mL), centrifugada a 4°C a 8.176 g por 10 minutos. O sobrenadante foi separado e ressuspenso novamente em 1,5 mL de tampão salino-fosfato, constituído por 0.43 g de NaH₂PO₄, 1.48 g de Na₂HPO₄ e 7.2 g de NaCl por litro, por três vezes (PUVANESARAJAH et al., 1987). O precipitado (células precipitadas) foi colocado em estufa de secagem a 60°C, por 3 dias até atingir peso constante. Decorrido esse período, procedeu-se a pesagem.

A cada 24 horas, foram retiradas alíquotas de 1 mL para contagem de unidades formadoras de colônia (UFC mL⁻¹). Foram realizadas diluições decimais seriadas e inoculadas em Placas de Petri contendo meio 79, em triplicata. As culturas foram incubadas a 28 °C por 10 dias (MILES; MISRA, 1938), e em seguida, avaliado quanto ao número de UFC mL⁻¹.

Procedimento de otimização e delineamento experimental

Triagem das variáveis que afetam a produção de inoculante

A primeira etapa do estudo consistiu em identificar as variáveis do processo que tem efeito significativo na produção de células para inoculante. Foram estudadas as variáveis pH, temperatura, fonte de carbono (glicerol), extrato de levedura, inóculo e agitação, por meio do delineamento experimental estatístico Plackett–Burman de 12 ensaios e 3 pontos centrais (PLACKETT; BURMAN, 1946; RODRIGUES; IEMMA, 2009).

Na Tabela 4 é apresentada a faixa de valores investigada para cada variável independente, em valores codificados e reais. Cada variável independente foi testada com dois níveis, alto e baixo, os quais foram denominados de “1” e “-1”, respectivamente, e foram feitas três repetições no ponto central “0”. Para analisar os resultados dos ensaios foi utilizado o software STATISTICA 8.0 (STATISTICA, 2008). A importância do efeito de cada variável na produção de células foi medida avaliando-se o p-valor, sendo considerados efeitos estatisticamente significativos os valores menores que 0,10.

Tabela 4 Valores das variáveis do planejamento do tipo Plackett-Burman e seus respectivos níveis codificados para a produção de células da estirpe INPA 03-11B do gênero *Bradyrhizobium* sp.

Variáveis	Código	-1	0	1
Temperatura (°C)	X ₁	28	30	32
pH	X ₂	5,2	6,0	6,8
Glicerol (g L-1)	X ₃	8	10	12
Ext. Levedura (g L-1)	X ₄	2	4	6
Inóculo (%)	X ₅	4	7	10
Agitação (rpm)	X ₆	80	140	200

Delineamento Composto Central Rotacional e análise estatística

A partir do Delineamento Plackett-Burman, duas variáveis foram selecionadas, agitação e concentração de extrato de levedura e a faixa ótima de seus valores foi investigada. Em seguida, foi elaborado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para essas duas variáveis, em cinco níveis, para estudar a interação das variáveis em relação à produção de células, avaliado pela biomassa celular seca, contagem em placa de Petri, e produtividade de $\log \text{UFC mL}^{-1} (\text{Px})$, calculada pela equação 1.

O delineamento DCCR, seguiu uma matriz de dados constituída por 4 pontos fatoriais, 4 pontos axiais e três pontos centrais, totalizando 11 ensaios (RODRIGUES; IEMMA, 2009). Os níveis das variáveis foram alterados a partir dos resultados obtidos no delineamento anterior. Foram executadas três repetições do ponto central para dar a estimativa do erro experimental. Os valores codificados e reais das variáveis independentes encontram-se na Tabela 5. Os pontos experimentais foram planejados objetivando a avaliação de modelo quadrático. O ajuste do modelo foi verificado pelo coeficiente de determinação (R^2) e pela significância do teste F para a regressão por meio da Análise de Variância (ANOVA). Os resultados foram analisados com o software STATISTICA 8.0, e as condições ótimas foram determinadas usando-se a metodologia de superfície de resposta (MSR).

$$\text{Px} = (\log \text{UFC mL}^{-1}_{\text{F}} - \log \text{UFC mL}^{-1}_{\text{I}}) / t$$

(1),

Onde $\text{UFC mL}^{-1}_{\text{F}}$ – contagem de unidades formadoras de colônias no final do crescimento celular ($\times 10^9$);

$\text{UFC mL}^{-1}_{\text{I}}$ - contagem de unidades formadoras de colônias no início do crescimento celular;

t = tempo final de crescimento celular (h).

Tabela 5 Níveis codificados e reais para os fatores agitação e concentração de extrato de levedura usadas no delineamento experimental DCCR para a produção de células da estirpe INPA 3-11B de gênero *Bradyrhizobium* sp.

Variável	Código	-1,41	-1	0	1	1,41
Agitação (rpm)	X ₁	130	140	165	190	200
Ext. de Levedura (g L ⁻¹)	X ₂	0,0	0,9	3,0	5,1	6,0

Curvas de crescimento da estirpe INPA 03-11B

As curvas de crescimento para os 11 ensaios foram realizadas a partir das médias do Log de UFC mL⁻¹, plotando-se os valores observados, a partir de 0h, de 24 em 24 horas, até 240 horas de cultivo da bactéria. O tempo de geração de todos os ensaios, foi obtido dividindo-se um intervalo de tempo específico (entre 0 e 48 horas) em horas (na fase log) pelo número de gerações calculado de acordo com as equações utilizadas por FRANKENBERG; FREIRE; THOMAS (1995) para avaliar os parâmetros a partir de processo fermentativo na produção de inoculantes e apresentadas por Madigan et al., (2009). Os parâmetros foram calculados de acordo com as Equações 2 e 3, a seguir:

$$tg = t/n, \quad (2)$$

Onde,

t = tempo de crescimento exponencial em horas

n = número de gerações no período crescimento exponencial limitado

$$n = \log N - \log N_0 / \log 2, \quad n = \log N - \log N_0 / 0,301$$

(3)

Onde,

n = número de gerações

N = número final de células

N₀ = número inicial de células, na fase logarítmica

Validação experimental das condições otimizadas

Para validar as condições de otimização do processo de produção de inoculante foi realizado um ensaio, com três repetições, na região de maior biomassa seca. Este ensaio objetivou confirmar os resultados das análises da metodologia de superfície de resposta a partir do DCCR.

Resultados e Discussão

Avaliação dos fatores que afetam a produção de inoculante

Os resultados da triagem das variáveis estão apresentados na Tabela 6, onde consta a planilha de delineamento Plackett-Burman (PB) de 15 ensaios, em valores codificados e reais com as seis variáveis independentes (X_1 a X_6) e os resultados das 2 variáveis dependentes (biomassa e $\log \text{UFCmL}^{-1}$).

Na Tabela 7 encontram-se as análises dos resultados de biomassa e \log de UFC. Por meio da análise de variância foi observado que dentre as seis variáveis estudadas na triagem pelo Plackett-Burman, apenas a agitação apresentou efeito estatisticamente significativo, ao nível de 10% de significância, para ambas as respostas, sendo o coeficiente de determinação (R^2) 0,72 para biomassa seca e 0,84 para \log de UFC. Dentre as demais variáveis, o extrato de levedura foi o que mais interferiu no processo de produção de biomassa, pelos resultados da análise de biomassa seca, tendo um p -valor de 0,283 (Tabela 7). As duas variáveis apresentaram efeitos positivos, significando que um aumento de seus valores, provocou aumento na biomassa.

Tabela 6 Delineamento Plackett-Burman (PB) mostrando as seis variáveis com valores reais e os resultados observados na produção de células da estirpe de *Bradyrhizobium* INPA 3-11B

Ensaio	Variáveis							
	Independentes						Dependentes	
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	Biomassa (g L ⁻¹)	Log UFC mL ⁻¹
1	1 (6,8)	-1 (28)	1 (12,0)	-1 (2,0)	-1 (4,0)	-1 (80)	1,10	9,52
2	1 (6,8)	1 (32)	-1 (8,0)	1 (6,0)	-1 (4,0)	-1 (80)	1,54	9,58
3	-1 (5,2)	1 (32)	1 (12,0)	-1 (2,0)	1 (10,0)	-1 (80)	1,24	9,48
4	1 (6,8)	-1 (28)	1 (12,0)	1 (6,0)	-1 (4,0)	1 (200)	3,68	10,01
5	1 (6,8)	1 (32)	-1 (8,0)	1 (6,0)	1 (10,0)	-1 (80)	1,47	9,35
6	1 (6,8)	1 (32)	1 (12,0)	-1 (2,0)	1 (10,0)	1 (200)	2,56	10,23
7	-1 (5,2)	1 (32)	1 (12,0)	1 (6,0)	-1 (4,0)	1 (200)	2,48	10,21
8	-1 (5,2)	-1 (28)	1 (12,0)	1 (6,0)	1 (10,0)	-1 (80)	1,04	9,45
9	-1 (5,2)	-1 (28)	-1 (8,0)	1 (6,0)	1 (10,0)	1 (200)	2,62	10,05
10	1 (6,8)	-1 (28)	-1 (8,0)	-1 (2,0)	1 (10,0)	1 (200)	2,28	10,05
11	-1 (5,2)	1 (32)	-1 (8,0)	-1 (2,0)	-1 (4,0)	1 (200)	2,12	10,03
12	-1 (5,2)	-1 (28)	-1 (8,0)	-1 (2,0)	-1 (4,0)	-1 (80)	1,30	9,40
13	0 (6,0)	0 (30)	0 (10,0)	0 (4,0)	0 (7,0)	140	3,12	9,85
14	0 (6,0)	0 (30)	0 (10)	0 (4,0)	0 (7,0)	140	2,64	10,16
15	0 (6,0)	0 (30)	0 (10)	0 (4,0)	0 (7,0)	140	2,30	10,04

X₁ = pH; X₂ = temperatura; X₃ = glicerol (g L⁻¹); X₄ = extrato de levedura (g L⁻¹); X₅ = Volume de inóculo (%); X₆ = agitação (rpm).

Analisando-se a Tabela 6, verificou-se que a biomassa seca variou de 1,04 g L⁻¹ (ensaio 8) a 3,68 g L (ensaio 4). No ensaio 4, o pH, concentração de glicerol, extrato de levedura e a agitação estavam em seus maiores níveis, enquanto temperatura e volume de inóculo estavam em seus menores valores. Para contagem celular (UFC mL⁻¹), cujos valores estão representados em Log UFC mL⁻¹, situaram-se entre 9,35 (ensaio 5) e 10,23 (ensaio 6). Os maiores

valores de contagem de células em Log UFC mL⁻¹ foram alcançados nos ensaios 4, 6, 7, 9 10, 11, 14 e 15. Exceto os ensaios do ponto central (13, 14 e 15), que foram incubados sob agitação de 140 rpm, os demais ensaios que apresentaram valores de Log UFC mL⁻¹ superior 10, foram incubados em agitação de 200 rpm, o maior valor utilizado no delineamento PB.

Tabela 7 Análise estatística dos resultados de biomassa celular e Log UFC da estirpe INPA 3-11B obtidos no delineamento estatístico experimental PB, mostrando os efeitos, erro padrão, *t*- e *p*-valor

Variáveis	**Biomassa (g L ⁻¹) ^(a)				**Log UFC mL ⁻¹ (b)			
	Efeitos	*E. P	t(8)	p-valor	Efeito	*E. P.	t(8)	p-valor
Média	2,100	0,144	14,601	0,0000	9,832	0,044	223,517	0,0000
pH	0,306	0,322	0,951	0,3696	0,020	0,098	0,202	0,8449
T	-0,101	0,322	-0,314	0,7615	0,068	0,098	0,690	0,5100
Glic	0,128	0,322	0,397	0,7017	0,074	0,098	0,755	0,4719
Ext. Lev	0,372	0,322	1,158	0,2803	-0,009	0,098	-0,091	0,9298
Inóc	-0,168	0,322	-0,521	0,6162	-0,024	0,098	-0,246	0,8121
Agit	1,341	0,322	4,170	0,0031	0,633	0,098	6,436	0,0002

* E. P = Erro padrão. **Coeficiente de determinação (R^2): ^(a) = 0,72 e ^(b) = 0,84. X₁ = pH; T = Temperatura (°C); Glic = Glicerol (g L⁻¹); Ext. Lev = Extrato de Levedura (g L⁻¹); Inoc = Inóculo (%); Agit = Agitação (rpm).

Altas densidades celulares, acima de 1×10^{10} UFC mL⁻¹, semelhantes às que foram obtidas no presente estudo (Tabela 6), também foram alcançados em trabalhos com estirpes de *Bradyrhizobium* utilizando o mesmo meio (Tabela 2), com incubação a 28 °C e agitação de 110 rpm (BARBERI et al., 2004). Além disso, estes autores demonstraram que no meio de cultura com valor inicial de pH 5,5, ocorreu o maior crescimento, mas este fator não interferiu no presente trabalho. Comportamento distinto já foi observado com estirpes de *Bradyrhizobium* cultivadas em meio de cultura cuja fonte de carbono era o

manitol. Por exemplo, os autores Miguel e Moreira (2001), trabalhando com a mesma estirpe (INPA 03-11B), Kremer e Peterson (1983) com *Rhizobium* CB756 e Fernandes Júnior et al., (2009) com a estirpe de *Bradyrhizobium* BR 3267, utilizando o meio de cultura líquido YM (VINCENT, 1970), obtiveram valores de 10^9 UFC mL⁻¹, inferior, portanto ao alcançado neste estudo. Esta diferença pode estar relacionada à fonte de carbono (manitol) que os autores utilizaram no meio de cultura e à menor concentração de extrato de levedura, uma vez que este componente contém vitaminas, que estimulam o crescimento do micro-organismo (BEN REBAH; TYAGI; PRÉVOST, 2002; BEN REBAH et al., 2007). Em outro trabalho, utilizando o glicerol como fonte de carbono, na concentração de cerca de 12g L⁻¹, mas com 1 g L⁻¹ de extrato de levedura, obteve-se somente 10^9 UFC mL⁻¹ para a contagem de células (Daza et al., 2000).

A faixa de temperatura dos trabalhos relacionados à produção de células de *Bradyrhizobium* spp. está situada entre 25 °C e 32 °C, a maioria entre 28 °C e 30 °C. Os autores Kremer e Peterson (1983) trabalharam a 25°C e FRANKENBERG; FREIRE; THOMAS (1995), Fernandes Júnior et al., (2009) e Grassano et al., (2009) adotaram 28 °C, enquanto os trabalhos de Boiardi e Ertola (1985), Surpin e Maier (1998) e Ben Rebah et al., (2002) utilizaram 30 °C. Nesses trabalhos, notou-se que o fator temperatura não interferiu no processo. Em geral, as diferenças de crescimento têm sido atribuídas a outras variáveis, como fonte de carbono, extrato de levedura e agitação. Frankenberg (1990), trabalhando com 2,5 L de meio de cultura em fermentador de 5 L e testando temperatura variando de 22 °C a 38 °C, obteve máxima produção de células nas temperaturas de 28 °C, 30 °C e 34 °C. Os resultados do presente trabalho estão de acordo aos apresentados pela maioria dos trabalhos, confirmando assim, que variação de temperatura entre 28 a 32 °C, (Tabelas 5 e 6), não interfere no processo fermentativo de estirpe de *Bradyrhizobium*.

Os dados demonstraram que as variáveis glicerol, extrato de levedura, pH e inóculo não apresentaram efeitos significativos. Entretanto, a variável que apresentou menor p-valor entre essas foi o extrato de levedura (0,2803), para a biomassa seca. O extrato de levedura é uma variável muito importante para o crescimento microbiano, dependendo de sua concentração e marca utilizada favorece a obtenção de alta produção de células viáveis (Date, 1972) ou até inibe o crescimento produzindo células deformadas e com baixa viabilidade (Skinner et al., 1977). Embora, o glicerol seja uma fonte de carbono amplamente utilizada para o crescimento de *Bradyrhizobium* (Stowers, 1985), não foi observado efeito positivo na produção de biomassa. Isto implica que o uso de qualquer uma das concentrações utilizadas neste trabalho pode atender ao requerimento do micro-organismo por carbono. Para reduzir o custo de produção, optou-se pela concentração menor de glicerol, 8 g L⁻¹.

Em relação às demais variáveis (exceto o pH, com p-valor de 0,3696), as outras apresentaram valores acima de 0,6. Observando os efeitos das variáveis pH, temperatura, glicerol, extrato de levedura, inóculo e agitação, notou-se que a concentração de inóculo e a temperatura tiveram efeitos negativos na produção de biomassa, enquanto que as concentrações de inóculo e de extrato de levedura apresentaram efeitos negativos sobre a contagem celular. Dentre as demais variáveis, exceto a agitação com efeito de 1,34, os efeitos tiveram seus valores abaixo de 0,4 (Tabela 6).

Após a triagem pelo delineamento Plackett Burmann, foram selecionadas para o segundo delineamento (DCCR) as variáveis independentes, agitação e extrato de levedura. A agitação foi selecionada porque apresentou efeito altamente significativo. O extrato de levedura foi selecionado por ser um componente muito importante no metabolismo bacteriano, sendo um dos principais componentes do meio de cultura usado para o crescimento de rizóbios (Burton, 1984). É um componente utilizado pelo micro-organismo como fonte

de carbono, nitrogênio e fatores de crescimento (Boiardi e Ertola, 1985; PRADELLA; OLIVEIRA; URENHA, 2001). O pH foi mantido em 6,8, a temperatura em 28 °C, o inóculo em 4% e a concentração de glicerol em 8 g L⁻¹.

Otimização das condições de cultivo pela Metodologia de Superfície de Resposta

Foi realizado um DCCR com 4 pontos fatoriais, 4 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios para a otimização das condições de cultivo. Os resultados e efeitos da agitação e extrato de levedura encontram-se representados nas Tabelas 8 e 9. Analisando-se a Tabela 8, verifica-se que a biomassa variou de 1,46 a 5,86 g L⁻¹, a contagem em log UFC mL⁻¹ de 9,22 a 10,48 e a produtividade foi 0,011 (ensaio 7) a 0,024 (ensaio 10) log UFC L⁻¹ h⁻¹.

O termo linear do extrato de levedura apresentou efeitos significativamente positivos ao nível de 5% de significância para a produção de biomassa e para a contagem celular, sendo que para esse último, o termo quadrático da concentração de extrato de levedura também foi significativo. Para Produtividade (Px), apenas o termo quadrático da agitação apresentou significância. Não foi observada interação significativa entre as duas variáveis investigadas (Tabela 9).

Os valores dos coeficientes de determinação dos modelos ($R^2=0,90$ – biomassa; $R^2=0,86$ – UFC mL⁻¹; e $R^2=0,72$ - Px) foram bons, indicando que, no mínimo, 72% da variabilidade pode ser explicada pelos respectivos modelos.

Tabela 8 Valores codificados e reais das variáveis agitação (X1) e extrato de levedura (X2) e as respostas (biomassa, UFC e Px) para os ensaios do DCCR

Ensaio	Variáveis independentes		Respostas		
	X1	X2	Biomassa	Log UFC	Px
	Códigos/valores reais		g L ⁻¹	mL ⁻¹	Log UFC mL ⁻¹ h ⁻¹
1	-1 (140)	-1 (1,0)	1,860	9,78	0,015
2	+1 (190)	-1 (1,0)	2,200	9,80	0,018
3	-1 (140)	+1 (5,0)	3,500	10,04	0,016
4	+1 (190)	+1 (5,0)	4,260	10,14	0,018
5	-1,41 (130)	0 (3,0)	1,960	10,10	0,018
6	+1,41 (200)	0 (3,0)	4,200	10,48	0,019
7	0 (165)	-1,41 (0,0)	1,460	9,22	0,011
8	0 (165)	+1,41 (6,0)	5,860	10,33	0,019
9	0 (165)	0 (3,0)	3,660	10,14	0,018
10	0 (165)	0 (3,0)	3,920	10,10	0,024
11	0 (165)	0 (3,0)	4,200	10,20	0,022

Na Tabela 10 são apresentados os resultados da Análise de variância para as variáveis resposta biomassa, log UFC e Px. Para a variável biomassa seca, o F-calculado (8,89 a 5%) foi superior ao F-tabelado (5,05) e o *p*-valor para o modelo foi menor do que 0,00001, indicando boa concordância entre os valores experimentais e preditos e que o ajuste do modelo é bom. Semelhantemente, o F-calculado para a variável UFC mL (6,052) foi superior ao F-tabelado (5,05 a 5%), indicando também um bom ajuste e que o modelo foi significativo. Entretanto, isso não ocorreu para a variável Px, indicando que o ajuste do modelo não foi adequado. A partir destes resultados foi possível ajustar os seguintes modelos com as variáveis codificadas (equações 4 e 5):

$$\text{Biomassa seca} = 3,928 + 0,534.x_1 - 0,530.x_1^2 + 1,242.x_2 - 0,238.x_2^2 + 0,105.x_1.x_2 \quad (4)$$

$$\text{Log (UFC mL}^{-1}\text{)} = 10,148 + 0,083.x_1 + 0,0477.x_1^2 + 0,271.x_2 - 0,211.x_2^2 + 0,190.x_1.x_2 \quad (5)$$

Tabela 9 Coeficientes de regressão para a produção celular da estirpe de *Bradyrhizobium* INPA 3-11B, obtida com o DCCR, em que X_1 representa a agitação e X_2 , o extrato de levedura

Fatores	Coeficientes de regressão	Erro padrão	t(7/8)	*p-valor
*Biomassa seca (g L ⁻¹)				
Médias	3,9283	0,3488	11,2612	0,0001
X_1 (L)	0,5339	0,2139	2,4955	0,0548
X_1 (Q)	-0,5302	0,2553	-2,0770	0,0924
X_2 (L)	1,2417	0,2139	5,8040	0,0021
X_2 (Q)	-0,2385	0,2553	-0,9342	0,3931
$X_1 X_2$	0,1050	0,3021	0,3476	0,7423
**Log UFC mL ⁻¹				
Médias	10,1477	0,1029	98,6204	0,0000
X_1 (L)	0,0826	0,0631	1,3095	0,2473
X_1 (Q)	0,0477	0,0753	0,6330	0,5545
X_2 (L)	0,2707	0,0631	4,2891	0,0078
X_2 (Q)	-0,2105	0,0753	-2,7955	0,0382
$X_1 X_2$	0,0190	0,0891	0,2134	0,8395
Log Px				
Médias	0,0215	0,0014	15,1128	0,0000
X_1 (L)	0,0008	0,0009	0,9556	0,3831
X_1 (Q)	-0,0015	0,0010	-1,4246	0,2136
X_2 (L)	0,0016	0,0009	1,8723	0,1201
X_2 (Q)	-0,0034	0,0010	-3,2389	0,0230
$X_1 X_2$	-0,0003	0,0012	-0,2727	0,7960

p=0,05; L – linear e, Q – quadrático.

Por meio das superfícies de resposta geradas pelos modelos 4 e 5 (Figuras 1 e 2), pode-se observar que as condições de maior agitação e concentração de extrato de levedura resultaram em maior produção de biomassa e log UFC. Para biomassa, notou-se na superfície de resposta (Figura 1 A) e na

curva de contorno (Figura 1 B) que a faixa ótima de produção celular situa-se entre 170 e 180 rpm e acima de 4 g L⁻¹ de extrato de levedura. No intervalo estudado, podem-se alcançar valores de até 6 g L⁻¹ de biomassa seca.

Tabela 10 Análise de variância (ANOVA) para a produção de biomassa, Log UFC e produtividade

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F calculado	p-valor
Biomassa (g L ⁻¹)					
Regressão	16,2334	5,0000	3,2467	8,8934	0,0158
Resíduos	1,8253	5,0000	0,3651		
Total	18,0587	10,0000			
Log UFC mL ⁻¹					
Regressão	0,961207	5,0000	0,1922	6,0522	0,0351
Resíduos	0,158818	5,0000	0,031764		
Total SS	1,120025	10,0000			
Px					
Regressão	0,000093	5,0000	0,0000	3,0472	0,1234
Resíduos	0,000030	5,0000	0,000006		
Total	0,000123	10,0000			

F-tabelado = 5,05

A biomassa seca alcançada foi superior à relatada por Grassano et al., (2009), que trabalharam com estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* (E109, SEMIA 5079 e SEMIA 5080) e *Bradyrhizobium elkanii* (SEMIA 587 e SEMIA 5019), sendo todas inoculantes aprovados para a soja, exceto E109. Observa-se nas Figuras 1A e 1B, que a biomassa seca atingiu mais de 5 g L⁻¹, superior ao alcançado pelos autores acima mencionados, que trabalharam com frascos agitados a 250 rpm, incubados a 28 °C. Os mesmos autores obtiveram valores de biomassa que variaram de 3,12 a 3,91 g L⁻¹ no final do processo.

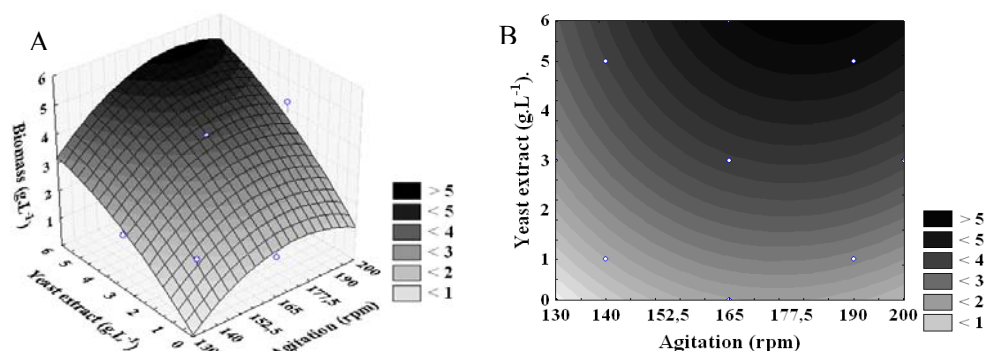


Figura 1 Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para a biomassa seca (g L^{-1}) mostrando o efeito da agitação e extrato de levedura sobre a produção de células da estirpe de *Bradyrhizobium* sp. INPA 3-11B.

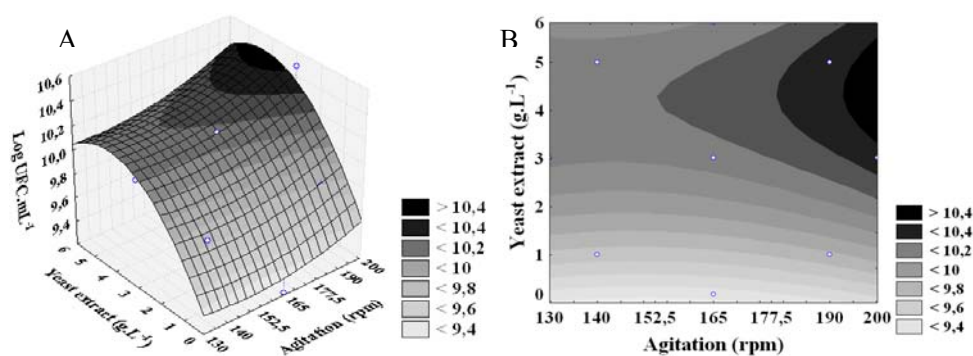


Figura 2 Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para Log UFC mL^{-1} da estirpe INPA 3-11B de *Bradyrhizobium* mostrando o efeito da agitação e extrato de levedura.

A agitação é um parâmetro importante no processo fermentativo. Ao analisar vários trabalhos desenvolvidos com estirpes de *Bradyrhizobium*, observa-se uma tendência ao uso de altos valores de agitação em processos fermentativos, a maioria acima de 150 rpm, chegando até 300 rpm. Por exemplo,

os autores Boiardi e Ertola (1985) obtiveram o máximo de UFC mL⁻¹ ($1,1 \times 10^{10}$) utilizando agitação de 300 rpm, enquanto Grassano et al (2009) obtiveram valores acima de 5×10^{10} com agitação de 250 rpm. No entanto, com valor de agitação bem inferior (110 rpm), Barberi et al., (2004) obtiveram valores de 10^{10} UFC mL⁻¹. No presente trabalho foi constatado que a faixa ótima de agitação, considerando a produção de biomassa variou de 170 a 180 rpm, o que permitiu a obtenção de aproximadamente 6,0 g L⁻¹.

Para a contagem de células em log UFC mL⁻¹ (Figuras 2A e B), a agitação entre 130 a 200 rpm permitiu a obtenção de valores de até 10^{10} UFC mL⁻¹. No entanto, a obtenção de valores acima de 1×10^{10} foi mais freqüente nos ensaios cuja agitação era superior a 150 rpm.. Ficou evidente que os maiores valores de agitação promovem maiores log UFC mL⁻¹, uma vez que, todos os ensaios incubados com os maiores valores atingiram acima de 1×10^{10} UFC mL⁻¹.

Embora a agitação acima de 150 rpm tenha sido frequentemente utilizada em cultivo de estirpes de *Bradyrhizobium*, a obtenção de valores de UFC mL⁻¹ superiores a 10^9 , ocorre nos meios de cultivo, cuja fonte de carbono é o glicerol, em substituição ao manitol. Geralmente, a concentração de extrato de levedura utilizado é de 4 g L⁻¹ (FRANKENBERG, 1990; BEN REBAH; TYAGI; PRÉVOST, 2002; BARBERI et al., 2004; GRASSANO et al., 2009). Concentração de 1 g L⁻¹ de extrato de levedura e aproximadamente 12 g L⁻¹ de glicerol, permitiram alcançar valores acima de 10^{10} UFC mL⁻¹ (RODRIGUÉZ-NAVARRO et al., 2003; ALBAREDA et al., 2008). Por outro lado, utilizando YMA (Vincent, 1970), em cuja composição há baixa concentração de extrato de levedura e a fonte de carbono é o manitol, os valores não ultrapassaram 10^9 UFC.mL (KREMER; PETERSON, 1983; MIGUEL; MOREIRA, 2001; Fernandes Júnior et al., 2009). Desta forma pode se constatar que as variáveis que mais interferiram no processo, além da agitação, foram a fonte de carbono e

o extrato de levedura. Para o extrato de levedura, sugere-se considerar que o processo otimizado é aquele em que a concentração seja menor possível e com alta concentração de células, uma vez que, o custo deste componente é um dos mais altos dentre os utilizados. Além disso, concentração acima de 0,35% pode não ser benéfica para algumas estirpes, provocando a produção de células deformadas e a redução da viabilidade celular (SKINNER; ROUGHLEY; CHANDLER, 1977; BEN REBAH et al., 2007). A estirpe INPA 3-11B, utilizada neste trabalho, não foi inibida com concentrações acima de 0,35% de extrato de levedura.

Portanto, para o crescimento celular, a faixa ótima de concentração de extrato de levedura foi entre 4 e 6 g L⁻¹ e a agitação entre 170 e 180 rpm, considerando-se também os custos. Nessa faixa, os valores de Log situaram-se em 10¹⁰ UFC mL⁻¹.

Curvas de crescimento da estirpe INPA 03-11B

Verificou-se que os ensaios 1 (140 rpm e 1 g de extrato de levedura L⁻¹), 2 (190 rpm e 1 g de extrato de levedura L⁻¹) e 7 (165 rpm e 0,0 g de extrato de levedura L⁻¹), apresentaram valores abaixo de 10¹⁰ UFC mL⁻¹ (Tabela 11 e Figura 3). O valor de 10¹⁰ UFC mL⁻¹ na maioria dos ensaios que alcançaram essa densidade ocorreu entre 144 h e 192 h de cultivo.

O tempo de geração obtido nos experimentos variou de 7,37 h (ensaio 5) a 16,05 h (ensaio 7) e foi definido considerando o intervalo de tempo durante a fase log, entre 0 e 48 horas, diferentemente do obtido por Barberi et al., (2004) com a estirpe BR 29 (SEMIA 5019), cujo tempo de geração foi de 11,55 em intervalo entre 24h e 120 horas. Essa diferença de tempo de geração pode estar relacionada à característica peculiar da estirpe, e também pelo fato da densidade inicial do inóculo ter sido mais concentrada no presente estudo, além disso, a

estirpe estudada foi diferente. No entanto, o tempo de geração foi semelhante ao alcançado por Frankenberg (1990) trabalhando com a estirpe de *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 587, em agitação operacional de 100 e 150 rpm, da ordem de 14 horas.

Tabela 11 Log de UFC mL⁻¹ em relação ao tempo (h) e número máximo (NM) de UFC mL⁻¹ obtidos a partir das curvas de crescimento da estirpe de *Bradyrhizobium* sp. INPA 3-11B do onze ensaios do DCCR, incluindo os três pontos centrais

Tempo	Ensaio								Ponto Central
	1	2	3	4	5	6	7	8	
0	7,69	7,70	7,68	7,71	7,68	7,68	7,68	7,68	7,67
24	8,37	8,29	8,61	8,58	8,53	8,38	8,18	8,64	8,62
48	9,05	9,07	9,57	9,30	9,64	9,16	8,58	9,62	9,39
72	9,37	9,40	9,86	9,66	9,70	9,65	8,90	9,78	9,72
96	9,67	9,63	9,79	9,69	9,73	9,81	8,92	9,94	9,86
120	9,67	9,80	9,80	9,81	9,83	9,98	8,96	9,90	10,02
144	9,78	9,77	10,04	9,57	9,80	10,52	9,22	10,16	10,12
168	9,76	9,40	9,81	9,79	10,07	10,02	9,04	10,35	10,23
192	9,65	9,54	10,24	10,07	10,14	9,99	9,16	10,25	10,07
216	9,65	9,51	10,19	10,14	10,16	9,98	9,15	10,31	10,16
240	9,62	9,65	10,44	10,17	10,03	10,18	9,14	10,37	10,18
NM	9,78	9,80	10,44	10,17	10,16	10,52	9,22	10,37	10,23
*Tg	10,62	10,54	7,64	9,08	7,37	9,76	16,05	7,44	8,40

*Tempo de geração em horas

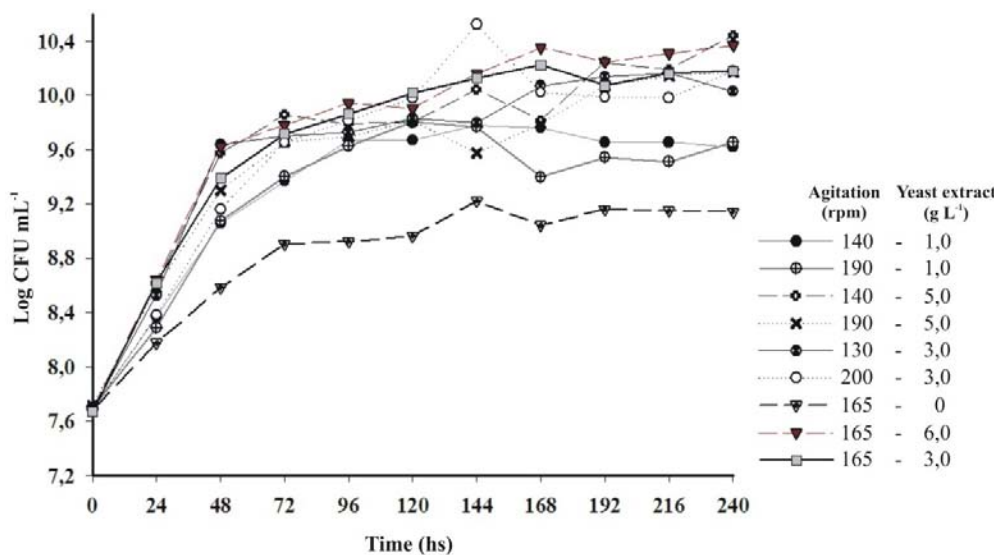


Figura 3 Curvas de crescimento da estirpe de *Bradyrhizobium* INPA 03-11B em meio de cultura líquido utilizado na indústria modificado de Lopreto; Mazza; Balatti (1972).

Validação experimental

A partir das análises pela metodologia de superfície de resposta foi possível verificar as faixas ótimas previstas de 4 a 6 g L⁻¹ de extrato de levedura e agitação de 170 a 180 rpm. Mediante esta constatação, foi realizado um ensaio em triplicata na faixa ótima, objetivando a validação experimental do modelo. As variáveis independentes foram padronizadas com os seguintes valores: pH 6,8; temperatura, 28 °C; glicerol, 8,0 g L⁻¹; extrato de levedura, 5,0 g L⁻¹; inóculo, 4%; e agitação, 170 rpm. Na Tabela 12 pode ser observado que os resultados das três variáveis respostas assemelharam-se aos previstos pelos modelos.

Tabela 12 Resultados preditos e experimentais obtidos nas condições de ponto ótimo do processo

Variável de Resposta	Resultado predito	Resultado experimental	Desvio Relativo (%)
Biomassa (g L ⁻¹)	5,035	4,95	1,66
Log UFC mL ⁻¹	10,239	10,15	0,88

Conclusões

O delineamento estatístico Plackett-Burman permitiu a identificação rápida de fatores importantes no processo de cultivo da estirpe INPA 03-11B, que foram a agitação e o extrato de levedura.

O DCCR indicou com poucos ensaios a faixa ótima para a produção de células da estirpe de *Bradyrhizobium* INPA 03-11B, inoculante do feijão-caupi. Os modelos definidos para biomassa seca e log UFC mL⁻¹ tiveram bom ajuste, sendo validados experimentalmente.

A composição e concentração ótimas do meio de cultura para obtenção de altos valores de UFC mL⁻¹ foram: C₃H₈O₃, 8,0 g L⁻¹; extrato de levedura, 5,0 g L⁻¹; K₂HPO₄, 0,5 g L⁻¹; MgSO₄.7H₂O, 0,2 g L⁻¹; NaCl, 0,1 g L⁻¹; KNO₃, 0,8 g L⁻¹; (NH₄)₂HPO₄, 0,3 g L⁻¹; e FeCl₃ (10%), 0,1 mL L⁻¹; MnSO₄ (10%), 0,1 mL L⁻¹ e 5,0 mL L⁻¹ de solução micronutrientes. As condições otimizadas foram: pH inicial ajustado a 6,8; temperatura de 28 °C; agitação de 170 rpm e 168h de incubação, como o tempo máximo para cultivo. A variável mais importante no processo a partir do segundo delineamento estatístico foi a concentração do extrato de levedura.

Os menores tempos de geração das bactérias obtidos foram entre 7 e 9 horas, nos ensaios 3, 4, 5, 6, 8 e o ponto central, e ambos atingiram valores de Log UFC mL⁻¹ superiores a 10¹⁰. Em até 96 horas de cultivo foi obtido uma

densidade celular de 10^9 , sendo, portanto, um período de tempo suficiente para uma produção celular que atenda às normas estabelecidas pelo MAPA para a produção de inoculante.

Agradecimentos À Secretaria de Estado de Educação de Mato Grosso – SEDUC-MT, pela Licença para Qualificação Profissional de P.M. Sousa, à CAPES pela bolsa de doutorado de S.M. Oliveira, ao CNPq bolsa de produtividade em pesquisa e grant de F.M.S. Moreira e R.F. Schwan e ao Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e CNPq pelo financiamento do trabalho através do projeto edital 64 CNPq/MAPA, processo nº 578635/2008-9.

Referências

ALBAREDA, M. et al., Alternatives to peat as a carrier for rhizobia inoculants: solid and liquid formulations. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 40, p.2771-2779, 2008.

ARIAS, A. ; MARTINEZ-DRETS, G. Glycerol metabolism in *Rhizobium*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 22, p. 150-153, 1976.

BARBERI, A. et al., Crescimento de *Bradyrhizobium elkanii* Estirpe BR 29 em meios de cultivo com diferentes valores de ph inicial. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 2, p. 397-405, 2004.

BEN REBAH, F. et al., Agro-industrial waste materials and wastewater sludge for rhizobial inoculant production: a review. **Bioresource Technology**, Washington, v. 98, p. 3535-3546, 2007.

BEN REBAH, F.; TYAGI, R. D.; PRÉVOST, D. Production of *S. meliloti* using wastewater sludge as a raw material: effect of nutrient addition and pH control. **Environmental Technology**, Oxford, v. 23, n. 6, p. 623-629, 2002.

BOIARDI, L.L.; ERTOLA, R.J. *Rhizobium* biomass production in batch and continuous culture with a malt-sprouts medium. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 1, p. 163-171, 1985.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 13, de 24 de março de 2011. Normas sobre especificações, garantias, registro, embalagem e rotulagem dos inoculantes destinados à agricultura. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, n. 58, 25 mar. 2011. Seção 1, p. 3-7.

BURTON, J. C. **Legume inoculant production manual**. Maui: NifTAL Center – MIRCEN, 1984. 96 p.

COCHRAN, W. G.; COX, G. M. **Experimental designs**. 2nd ed. New York: J. Wiley, 1966. 611p.

COSTA, E. M. et al., Nodulação e produtividade de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. por cepas de rizóbio em Bom Jesus, PI. **Revista Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 42, n. 1, p. 1-7, jan./mar. 2011.

DATE, R.A. Sources and Quantities of Yeast Extract for Growth of Rhizobia. **Journal of Applied Microbiology**, Malden, v. 35, p. 379-387, 1972.

DATE, R. A. Legume inoculant production. **Proceedings Indian National Science Academy**, New Delhi, v. 40, n. 6, p. 667-686, 1976.

DAZA, A. et al., Perlite as a carrier for bacterial inoculants. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.32, p.567-572, 2000.

FERNANDES JÚNIOR, P. I. et al., Polymers as carriers for rhizobial inoculant formulations. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 9, p. 1184-1190, set. 2009.

FRANKENBERG, C. L. C. **Tecnologia da produção de inoculantes de *Bradyrhizobium japonicum* em fermentador e em turfa**. 1990. 206 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1990.

FRANKENBERG, C. L. C.; FREIRE, J. R. J.; THOMAS, R. W. P. Growth and competition between two strains of *B. japonicum* in broth and in a peat-based inoculant: dinitrogen fixation efficiency and competition for nodulation sites. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 211-218, 1995.

FRED, E.B.; WAKSMAN, S.A. **Laboratory manual of general microbiology**. McGraw-Hill, New York, 1938.

GRASSANO, A. E. et al., Quantitative relationship between maximum growth rates and the intracellular pattern of α -esterase and β -esterase activity of leguminous infecting bacteria. **New Biotechnology**, Amsterdam, v. 26, n. 5, p. 234-238, Nov. 2009.

KALIL, S. J.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 35, p. 539–550, 2000.

KREMER, R. J.; PETERSON, H. L. Effects of carrier and temperature on Survival of *Rhizobium* spp. in legume inocula: development of an improved type of inoculant. **Applied and Environmental Microbiology**, Whashington, v. 45, n. 6, p. 1790-1794, 1983.

LACERDA, A. M. et al., Efeito de estirpes de rizóbio sobre a nodulação e produtividade do feijão-caupi. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 51, n. 293, p. 67-82, 2004.

LOPRETO, C. R.; MAZZA, L. A.; BALATTI, A. P. Influencia de los componentes del medio de cultivo sobre el tiempo de generacion de una cepa de *Rhizobium japonicum*. **Annales Sociedade Científica Argentina**, Buenos Aires, v. 193, n. 1/2, p. 35-47, 1972.

MACCIÓ, D.; FABRA, A.; CASTRO, S. Acidity and calcium interaction affect the growth of *Bradyrhizobium* sp. and the attachment to peanuts roots. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 34, p. 201-208, 2002.

MADIGAN, M.T. et al., **Brock biology of microorganisms**. Pearson Benjamin Cummings, San Francisco, 2009, 1061p

MAGALHÃES F.M.M. **Estado atual de conhecimento sobre fixação biológica de nitrogênio na Amazônia**. In: SIMPÓSIO SOBRE O TRÓPICO ÚMIDO, Anais, v. 1, p. 499-512, 1986.

MARTINS, L. M. V. et al., Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: a strategy for improving grain yield in the semi-arid region of Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, New York, v. 38, p. 333-339, 2003.

MIGUEL, D. L.; MOREIRA, F. M. S. Influencia do pH do meio de cultivo e da turfa no comportamento de estirpes de *Bradyrhizobium*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 25, n. 4, p. 873-883, out./dez. 2001.

MILES, A.A.; MISRA, S.S. The estimations of the bactericidal power of the blood. **Journal of Hygiene**, London, v. 38, n. 6, p. 732-749, 1938.

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

MOREIRA, F. M. S. **Estirpes de bactérias altamente eficientes que fornecem nitrogênio para o caupi foram selecionadas na UFLA e já são recomendadas para a produção de inoculantes comerciais**. Lavras: UFLA, 2005. 12 p. Boletim de Extensão. Disponível em: <[www.ufla.br/editora/publicações/boletim de extensão](http://www.ufla.br/editora/publicações/boletim_de_extensao)>. Acesso em: 19 abr. 2006.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. 729 p.

PLACKETT, R. L.; BURMAN, J. P. The design of optimum multifactorial experiments. **Biometrika**, Oxford, v. 33, n. 4, p. 305-325, 1946. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/2332195>>. Acesso em: 10 maio 2011.

PRADELLA, J. G. C.; OLIVEIRA, M. S.; URENHA, L. C. Produção de inoculantes Agrícolas. In: LIMA, U. A. et al., (Coord.). **Biotecnologia industrial**. São Paulo: E. Blücher, 2001. v. 3, p. 279-305.

PUVANESARAJAH, V. et al., Cell surface polysaccharides from *Bradyrhizobium japonicum* and a nonnodulating mutant. **J Bacteriol**, Washington, v. 169, n. 1, p. 137-141, 1987.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 2. ed. Campinas: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2009. 325 p.

RODRIGUEZ-NAVARRO, D.N. et al., Field assessment and genetic stability of *Sinorhizobium fredii* strain SMH12 for commercial soybean inoculants. **Europ. J. Agronomy**, Amsterdam, v. 19, n. 2, p. 299-309, 2003.

SINGLETON, P.; KEYSER, H.; SANDE, E. Development and evaluation of liquid inoculants. In: HERRIDGE, D. (Ed.). **Inoculants and nitrogen fixation of legumes in Vietnam**. Canberra: ACIAR Proceedings, 2002. Disponível em: <<http://aciar.gov.au/files/node/2110/pr109echapter07.pdf>>. Acesso em: 24 jun. 2011.

SKINNER, F.A.; ROUGHLEY, R.J.; CHANDLER, M.R. Effect of yeast extract concentration on viability and cell distortion in *Rhizobium* spp. **Journal of Applied Microbiology**, Malden, v. 43, p. 287-297, 1977.

SOARES, A. L. L. et al., Eficiência agronômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões (MG). I – Caupi⁽¹⁾. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 30, p. 795-802, 2006.

STATISTICA. **Data Analysis Software System 8.0**. Stat-Soft, Inc., USA (www.statsoft.com), 2008.

STOWERS, M. D. Carbon metabolism in *Rhizobium* species. **Annual Reviews Microbiology**, Netherlands, v. 39, p. 89-108, 1985.

SURPIN, M. A.; MAIER, R. J. Roles of the *Bradyrhizobium japonicum* terminal oxidase complexes in microaerobic H⁻ dependent growth. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, Amsterdam, v. 1364, n.1, p. 37-45, Apr. 1998.

VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria.**
Oxford: Blackwell Scientific, 1970. 164 p. (International Biological Programme Handbook, 15).

ZABRISKIE, D.W. et al., **Traders' guide to fermentation media formulation.**
Traders Protein, Memphis, Tenn, 1980.

ZILLI, J.É. et al., Contribuição de estirpes de rizóbio para o desenvolvimento e produtividade de grãos de feijão-caupi em Roraima. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 39, n. 4, p.749-758, 2009.

**ARTIGO 2 OTIMIZAÇÃO DO CULTIVO DA ESTIRPE DE
Bradyrhizobium UFLA 3-84, INOCULANTE DO FEIJÃO-CAUPI**

Normas da Revista World Journal of Microbiology and Biotechnology (Versão preliminar em Língua Portuguesa)

Pedro M. Sousa¹; Silvia M. Oliveira¹; José Guilherme L. F. Alves²; Disney R. Dias²; Rosane F. Schwan¹; Fatima M. S. Moreira^{3*}

¹Departamento de Biologia,

²Departamento de Ciência dos Alimentos, UFLA

³Departamento de Ciência do Solo, Universidade Federal de Lavras – UFLA, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000, Lavras – Minas Gerais – Brasil

* Autor para correspondência: fmoreira@dcs.ufla.br. tel: +55 35 3829 1254

RESUMO

O objetivo do trabalho foi otimizar as condições de cultivo da estirpe de *Bradyrhizobium* UFLA 3-84, aprovada como inoculante para a cultura do feijão-caupi. Foi utilizado um meio de cultura líquido e uma estratégia seqüencial de planejamentos experimentais, com o emprego dos delineamentos de Plackett-Burman (PB) e Composto Central Rotacional (DCCR). Foi investigada a influência das variáveis pH, temperatura(°C), glicerol (g L⁻¹), extrato de levedura (g L⁻¹), inóculo (%), micronutrientes (mL L⁻¹) e agitação (rpm) sobre o crescimento celular. Pelo delineamento de PB 12, foi observado que as variáveis que apresentaram maiores efeitos sobre biomassa seca e UFC mL⁻¹ foram glicerol, extrato de levedura e agitação. Em seguida, estas variáveis foram estudadas utilizando-se um DCCR, com total de 17 ensaios. Observou-se população celular superior a $1,0 \times 10^{10}$ UFC mL⁻¹ após 120h de incubação. Para obter produção celular superior a 1×10^{10} log UFC mL⁻¹, com biomassa de acima de 3 g L⁻¹ e Produtividade (PX) de pelo menos 0,02 log UFC mL⁻¹ h⁻¹, sugere-se o preparo do meio de cultura líquido com a seguinte composição: glicerol (7,0 g L⁻¹); extrato de levedura (2 g L⁻¹); K₂HPO₄ (0,5 g L⁻¹); MgSO₄.7H₂O (0,2 g L⁻¹); NaCl (0,1 g L⁻¹); KNO₃ (0,8 g L⁻¹); (NH₄)₂HPO₄ (0,3 g L⁻¹); FeCl₃ a 10% (0,1 mL L⁻¹) e MnSO₄ a 10% (0,1 mL L⁻¹). Ao meio de cultura, deve ser adicionado 1,0 mL L⁻¹ de solução micronutrientes. Além disso, o pH inicial do meio de cultura deve ser ajustado a 6,8, e o microrganismo incubado a 28 °C, com agitação de 170 rpm, no máximo por um período de 144h. Considerando a concentração de células 1×10^9 UFC mL⁻¹, a mínima exigida pelo Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, para produção de inoculantes microbianos, o tempo de 96 horas é suficiente, e mais vantajoso economicamente.

Palavras-chave: *Bradyrhizobium* - UFLA 3-84, inoculante, Feijão-caupi, Plackett-Burman, Delineamento Composto Central Rotacional.

ABSTRACT

The aim of this study was to optimize growing conditions of *Bradyrhizobium* strain UFLA 3-84, approved as inoculums for the culture of cowpea. It was used a liquid culture medium and two statistical designs: Plackett-Burman (PB) and Central Composite Rotatable Design (CCRD). It was evaluated the influence of the variables pH, temperature, glycerol, yeast extract, inoculum, micronutrients, and agitation upon cellular growth. Using Plackett-Burman design a significant effect of the variables glycerol, yeast and agitation on biomass was evaluated. The selected variables were studied using a Central Composite Rotatable Design (CCRD), with 17 experimental runs. It was observed cellular population bigger than 1.0×10^{10} CFU mL⁻¹ after 120h of incubation. For this cellular production, with biomass bigger than 3 g L⁻¹ and Productivity (Px) of at least 0.02 log CFU mL⁻¹ h⁻¹ it is suggested the preparation the liquid culture medium with the following composition: glycerol (7,0 g L⁻¹); yeast extract (2 g L⁻¹); K₂HPO₄ (0.5 g L⁻¹); MgSO₄.7H₂O (0.2 g L⁻¹); NaCl (0.1 g L⁻¹); KNO₃ (0.8 g L⁻¹); (NH₄)₂HPO₄ (0.3 g L⁻¹); 10% FeCl₃ (0.1 mL L⁻¹) and 10 % MnSO₄ a (0.1 mL L⁻¹). To the culture medium, it must be added 1.0 mL L⁻¹ solution micronutrients (Zabriskie). Also, the initial pH of the culture medium should be adjusted to 6.8, the microorganism should be incubated at 28 °C with agitation of 170 rpm, form a maximum period of 144h. Considering the concentration of 1×10^9 cells CFU mL⁻¹, which is the minimum required by the Department of Agriculture, Livestock and Supply, for the production of microbial inoculants, 96 hours for growth time is enough, and more economically advantageous.

Keywords: *Bradyrhizobium* – UFLA 3-84, Inoculant, Cowpea, Plackett-Burman, Central Composite Rotatable Design.

Introdução

A quantidade de N disponível no solo é insuficiente para atender toda a demanda dos ecossistemas naturais e agrícolas. Pois, à medida que a população mundial aumenta, exige-se maior produção agrícola, explorando maiores áreas e aperfeiçoando técnicas para alcançar maior produtividade. Para atender à crescente demanda por alimentos, tem-se o uso de adubação química nitrogenada como a principal via de suprimento de nitrogênio. Obviamente, que o uso do N na forma química em grandes quantidades promove aumento da produção agrícola. Entretanto, potencializam-se os problemas ambientais, tais como, poluição de lençóis freáticos, emissão de gases estufas, assim como interfere em outros ciclos biogeoquímicos, como o do carbono (Gruber e Galloway 2008). Embora, havendo estes aspectos preocupantes, a respeito do fornecimento de N de origem do processamento químico, a forma de suprimento por via biológica é altamente importante. A atuação de micro-organismos que convertem o N gasoso, pouco reativo à forma assimilável pelas plantas e demais organismos vivos é mais satisfatória do ponto de vista ecológico. Em se tratando de culturas que se beneficiam mais diretamente, como é o caso das leguminosas, o fornecimento de N por via biológica promove grandes vantagens econômicas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A simbiose rizóbio-leguminosa é uma das principais vias biológicas de suprimento do N às plantas e outros seres vivos, desempenhando assim, um importante papel na agricultura e no meio ambiente. A simbiose rizóbio-leguminosa promove um processo ecológico de alto valor aos ecossistemas, denominado de fixação biológica de nitrogênio atmosférico (FBN). É um processo ecológica e economicamente vantajoso, que se bem manejado pode substituir os onerosos adubos químicos nitrogenados utilizados na agricultura. Dessa forma, os benefícios da FBN podem ser maximizados para culturas de

interesse através da prática de inoculação de leguminosas com rizóbios selecionados. O manejo da FBN no Brasil é uma prática consolidada na cultura da soja, na qual a adubação química nitrogenada é totalmente substituída pela utilização de inoculantes contendo bactérias do gênero *Bradyrhizobium*. A adoção dessa prática, tem proporcionado uma economia significativa para o País, que somente na safra 2006/2007, economizou aproximadamente 3,3 bilhões de dólares (Moreira 2008).

No Brasil existem estirpes selecionadas e aprovadas para a produção de inoculantes para cerca de 100 espécies de leguminosas, incluindo o feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), mas poucas estirpes são utilizadas para a produção de inoculantes, cujo uso é restrito praticamente à soja. Um exemplo desta concentração é o fato de que do montante de aproximadamente 26 milhões de doses de inoculantes (produzidas no Brasil e importadas) comercializados em 2003, 99 % foram para a cultura da soja e apenas 1 % para as outras espécies, especialmente para o feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Provavelmente, o sucesso da tecnologia de inoculação na soja seja devido ser uma cultura de exportação, ter recebido altos investimentos em pesquisa ao longo do tempo, por parte do governo e empresas. Os investimentos objetivaram o melhoramento genético da planta e melhor aproveitamento da FBN, o que não ocorreu com outras culturas brasileiras, como é o caso do feijão-caupi.

O feijão-caupi é uma das espécies vegetais com alto potencial de ser beneficiada pelo processo FBN utilizando estirpes bacterianas selecionadas. Atualmente, existem estirpes eficientes selecionadas e testadas em campo em várias regiões do Brasil, e que estão aprovadas pelo Ministério da Agricultura Abastecimento e Pecuária para a produção de inoculantes (LACERDA et al., 2004; SOARES et al., 2006; ALMEIDA et al., 2010, COSTA et al., 2011, Sousa; Moreira, 2011).

A espécie feijão-caupi é rústica, bem adaptada às diferentes condições ambientais do Brasil e que apresenta excelente valor nutritivo, sendo uma espécie de grande valor sócio-econômico (Freire-Filho et al., 2005) para o País. Tem sido demonstrado que essa cultura pode ser beneficiada pela FBN, com aumentos significativos na produtividade. Em campo, por meio da inoculação com estirpes selecionadas e adubação básica com fósforo e potássio, no Sul de Minas, os rendimentos variaram entre 900 kg ha⁻¹ a 1.300 kg ha⁻¹ (LACERDA et al., 2004; SOARES et al., 2006), sendo estes superiores à média nacional que é de 500 kg ha⁻¹.

Atualmente, as estirpes bacterianas aprovadas como inoculantes para feijão-caupi são os microssimbiontes: UFLA 3-84 e INPA3-11B (LACERDA et al., 2004; Soares et al., 2006), e a BR 3267 (MARTINS et al., 2003). As duas primeiras estirpes, a UFLA 3-84 e INPA3-11B, demonstraram alto potencial de fixação em simbiose com feijão-caupi nas regiões Nordeste, Norte e Centro Oeste. No Piauí foram obtidos rendimentos de grãos de 1.370 com UFLA 3-84 e 1.950 kg ha⁻¹ com a INPA 03-11B (ALMEIDA et al., 2010) e 1.223 kg ha⁻¹ com a INPA 03-11B (COSTA et al., 2011). Sousa e Moreira (2011) obtiveram rendimento de aproximadamente 900 kg ha⁻¹ com a estirpe INPA 03-11B, em Confresa – MT. Zilli et al., (2009), com a mesma estirpe nos anos agrícolas 2005 e 2006 no estado de RR, em área de mata alterada e cerrado obtiveram rendimento de 1.759 e 1.104 kg ha⁻¹, e 1.653 e 1728 kg ha⁻¹, respectivamente.

Observa-se pelo exposto, que as estirpes inoculantes têm apresentado resultados de sucesso. No entanto, mesmo que as estirpes aprovadas pelo MAPA tenham sido bem estudadas, desde o princípio de seleção e demonstrado seu alto potencial de fixação no campo, o processo de obtenção de células em escala industrial ainda não foi definido, ou é desconhecido. Outro aspecto importante, dessas estirpes não terem sido utilizadas constantemente para a produção de inoculantes em escala comercial. O motivo pode ser porque o feijão-caupi é

predominantemente cultivado por pequenos agricultores, sendo, portanto um mercado potencial do varejo e não de atacado que é mais vantajoso para o setor industrial. Não havendo o investimento por parte do setor industrial, a produção e disponibilização de inoculantes poderiam ser viabilizadas, por exemplo, por pequenas empresas incubadas nas instituições públicas de ensino e pesquisa em ciências agrárias, geralmente localizadas em centros de produção agrícola. Baseando-se nesses pressupostos, existe a necessidade de serem definidas as condições ótimas de produção de biomassa celular para a elaboração do inoculante e sua disponibilização para uso na agricultura. A definição das condições depende do estudo de vários fatores que estão envolvidos no processo de cultivo bacteriano.

Os estudos para a definição das condições ótimas da produção de biomassa microbiana investigam diversas variáveis e requer a execução de vários ensaios laboratoriais. Geralmente, os estudos realizados requerem grande número de experimentos para determinação dos níveis ótimos de cada fator. Estudos realizados desta maneira, além de serem demorados, são onerosos e podem não mostrar as interações entre os componentes do processo. Esses problemas podem ser resolvidos, com a otimização do processo, utilizando planejamentos experimentais estatísticos que reduzem o número de ensaios. Além disso, pode ser observado o efeito combinado de todos os fatores envolvidos no processo de formação de biomassa. Para otimização confiável, o primeiro passo deve ser a seleção das variáveis importantes, buscando-se a estimativa dos níveis ideais dessas variáveis, seguido da otimização utilizando os fatores selecionados (KALIL; MAUGERI; RODRIGUES, 2000, RODRIGUES; IEMMA, 2009).

A otimização pode ser feita utilizando de uma sequência de planejamentos experimentais, como o Plackett-Burman (PB) e o Delineamento Composto Central Rotacional. O PB é um tipo de planejamento que pode

fornecer estas estimativas e auxiliar na redução do número de ensaios experimentais através de análises de diferentes variáveis. O segundo passo do processo é otimizar as variáveis selecionadas no Plackett-Burman, utilizando um planejamento fatorial como, por exemplo, o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) analisando pela Metodologia de Superfície de Resposta (RSM) (BOX; WILSON, 1951; COCHRAN, Cox, 1966; RODRIGUES; IEMMA, 2009). Finalmente, realizam-se os ensaios de validação experimental (KALIL; MAUGERI; RODRIGUES, 2000, RODRIGUES; IEMMA, 2009).

Há diversos estudos sobre rizóbios, que abordam desde a seleção de estirpes, a definição dos componentes do meio de cultivo até a produção de inoculantes (SHERWOOD, 1972; KREMER; PETERSON, 1983; BISSONNETTE; LALANDE; BORDELEAU, 1986; FRANKENBERG, 1990; MACCIÓ et al., 2002; SINGLETON; KEYSER; SANDE, 2002 BARBERI et al., 2004). No entanto, a maioria destes estudos, tem sido realizada utilizando delineamentos que demandam muito tempo e trabalho. Dessa forma, a otimização de variáveis independentes, tais como, fonte de carbono, nitrogênio, fatores de crescimento, e condições de cultivo, como pH, temperatura e agitação, entre outros, ocorre de forma isolada. A análise do efeito de uma variável independente é feita fixando-se todas as outras em determinado nível, demandando mais tempo e maior custo para a realização do estudo. Outro aspecto importante e que deve ser observado é que, quando os experimentos são baseados na otimização de fatores isolados, mantendo os outros em níveis constantes, não se consegue o efeito combinado de todos os fatores envolvidos no processo (RODRIGUES; IEMMA, 2009). Atualmente, há uma tendência à utilização de planejamentos estatísticos em estudos de rizóbios, como para a padronização de meio de cultura (ROJAS; GARRIDO; BONILLA, 2009; ROUSSI et al., 2010).

Portanto, enfatiza-se a importância da leguminosa feijão-caupi e a existência de estirpe eficiente para a produção de inoculante. Porém, o inoculante não está disponível e não tem sido definido as condições adequadas para a produção industrial de células. Por isso, este trabalho teve como objetivo otimizar o processo de produção de inoculante com a estirpe de *Bradyrhizobium* UFLA 3-84, inoculante de feijão-caupi, testando diferentes níveis da fonte de carbono, extrato de levedura, porcentagem de inoculo, pH inicial do meio e condições de incubação, utilizando planejamentos experimentais estatísticos, PB e DCCR.

Material e Métodos

O trabalho para otimização das condições de cultivo e meio de cultura para crescimento da estirpe de UFLA 3-84 foi realizado em duas etapas básicas e constituído por 32 ensaios. A primeira etapa constituiu-se de 15 ensaios, para a triagem das variáveis mais importantes para o crescimento celular, sendo que três destes ensaios representam o ponto central. Na segunda etapa, foram realizados 17 ensaios para identificar o nível ótimo das variáveis significativas para promover a melhor produção de biomassa e UFC mL⁻¹.

Origem da estirpe de Bradyrhizobium UFLA 3-84

A estirpe *Bradyrhizobium* sp. UFLA 3-84 (Tabela 1), pertence à Família Bradyrhizobiaceae, Filo α -Proteobacteria, Domínio Bacteria. Ela já é uma estirpe aprovada para a produção de inoculante para a cultura feijão-caupi pelo MAPA (Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento). A UFLA 3-84 foi isolada de *Centrosema* sp., em solo da Amazônia (MAGALHÃES, 1986), no estado de Rondônia. Apresenta algumas características, tais como, capacidade de

adaptação a altas temperaturas e condições de acidez predominantes nos solos brasileiros. Foi isolada no projeto ASB (Alternatives for Slash and Burn) a partir de solo de pastagem usando feijão-caupi como planta isca. A seleção ocorreu mediante a realização de vários experimentos na Universidade Federal de Lavras (UFLA) em condições axênicas, em vasos com solo e no campo (LACERDA et al., 2004; MOREIRA, 2005; SOARES et al., 2006).

Tabela 1 Identificação, origem (sistema de uso/estado) e características culturais da estirpe de *Bradyrhizobium* UFLA 3-84 (Lacerda et al., 2004)

Identificação	Designação		Características culturais em placa				
	SEMIA	Origem	TACI ¹	D ²	pH ³	AI ⁴	Cor
UFLA 3-84	6461	Pastagem/RO	6	1-2	Alcalino	Não	Branca

¹Tempo em dias para aparecimento de colônias isoladas, ²diâmetro da colônia, ³reação do meio de cultivo após crescimento de colônias e ⁴absorção de indicador do meio de cultivo.

Meios de cultura

Para o cultivo da estirpe UFLA 3-84, foram utilizados dois meios de cultura, o 79 (FRED; WAKSMAN, 1928), também conhecido como YMA (Vincent, 1970), com azul de bromotimol e pH 6,8; e o meio proposto por Lopreto; Mazza; Balatti (1972). Ao meio Lopreto foi adicionado solução de micronutrientes (ZABRISKIE et al., 1980), sendo o volume de acordo ao planejamento PB, cujos valores estão representados na Tabela 3. A solução de Zabriskie apresenta a seguinte composição por litro: 0,22 g de ZnSO₄.7H₂O; 0,55 g de CaCl₂; 0,50 g de MnCl₂; 0,50 g de 0,10 g de FeSO₄; (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O; 0,16 g de CuSO₄ e 0,16 g de CoCl₂. As composições dos meios de cultura e as especificações de cada reagente encontram-se descritas na Tabela 2. No meio 79, a bactéria foi cultivada para a contagem em placa de

unidades formadoras de colônias (UFC mL⁻¹). O meio líquido Lopreto foi utilizado para o cultivo massal de células.

Tabela 2 Composição dos meios de cultura utilizados para cultivo da estirpe UFLA 3-84 em placas e fermentação em meio líquido, constando marcas e purezas

79		Lopreto	
Componentes	Quantidade L ⁻¹	Componentes	Quantidade L ⁻¹
C ₆ H ₁₄ O ₆ (manitol)	10g	C ₃ H ₈ O ₃ (glicerol)	10,0 g
Extrato de levedura	0,4 g	Extrato de levedura	4,0 g
K ₂ HPO ₄ a 10%	1 mL	K ₂ HPO ₄	0,5 g
KH ₂ PO ₄ a 10%	4 mL	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O a 10%	2 mL	NaCl	0,1 g
NaCl a 10%	1 mL	KNO ₃	0,8 g
Azul de Bromothimol (0,5%) em KOH a 0,2N	5 mL	(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,3 g
Agar	15 g	FeCl ₃ a 10%	0,1 mL
		MnSO ₄ a 10 %	0,1 mL
pH	6,8	pH	6,8

Tabela 3 Reagentes utilizados para o preparo do meio de cultura e solução de micronutrientes (ZABRISKIE et al., 1980) para o cultivo da estirpe de *Bradyrhizium* UFLA 3-84, apresentando marcas e composição

Meio Lopreto	Especificações (%)													Lote
	Teor	N	K	Na	Cl	¹ MP	Fe	Ca	PO ₄	SO ₄	Mn	Mg		
C ₃ H ₈ O ₃ – Êxodo Científica	99,5	-	-	-	0,003	0,0002	-	-	-	-	-	-	G2819RA	
Ext/o Levedura –HIMEDIA	10,5	³ 3,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0000073119	
K ₂ HPO ₄ – SYNTH	98,0	0,001	-	-	0,01	0,0005	0,001	-	-	-	-	-	107784	
MgSO ₄ .7H ₂ O – VETEC	98,0	*0,004	0,005	0,005	0,0005	0,0005	0,0005	0,02	-	-	0,0005	-	0903528	
NaCl – ISOFAR	99,0	*0,004	0,005	-	-	0,0005	0,0002	0,002	0,0005	0,004	-	0,001	091418	
Ca(NO ₃) ₂ – VETEC	99,0	*--	-	0,005	0,002	0,0005	0,01	0,01	0,0005	0,003	-	0,01	0903403	
(NH ₄) ₂ HPO ₄ – VETEC	98,0	*0,008	0,005	0,005	0,001	0,001	0,001	0,001	-	0,01	-	0,0005	0905147	
FeCl ₃ .6H ₂ O – VETEC	97,0	*0,01	-	-	-	-	0,002	-	0,01	0,01	-	-	1000608	
MnSO ₄ .H ₂ O – VETEC	98,0	-	0,01	0,05	0,005	0,002	0,002	0,005	-	-	-	0,005	0602324	
Solução de Zabriskie														
ZnSO ₄ .7H ₂ O – VETEC	99,0	0,003	0,01	0,05	0,0005	0,003	0,001	0,005	-	-	0,0003	0,005	0900199	
CaCl ₂ .2H ₂ O –PROQUÍMIOS	74,0	0,008	0,01	0,02	-	0,0005	0,001	-	-	0,01	-	0,005	08/0055	
MnCl ₂ .4H ₂ O – VETEC	99,0	-	0,01	0,05	-	0,0005	0,0005	0,005	-	0,005	-	0,005	0703865	
FeSO ₄ – VETEC	99,0	-	-	-	0,001	-	0,2	-	0,001	-	0,05	-	1001685	
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O –SYNTH	81,0	0,003	-	-	0,002	0,001	-	0,001	0,001	0,02	-	-	113677	
CuSO ₄ .5H ₂ O – MERCK	99,0	0,001	0,001	0,005	0,0005	0,005	0,003	0,001	-	-	-	-	A779290	
CoCl ₂ .6H ₂ O – CINÉTICA	98,0	-	-	-	-	-	-	-	-	0,01	-	-	15565	

* compostos nitrogenados, como NO₃, NO₂, NH₄; ¹MP: metais pesados como Pb. ² 5,0 g NaCl; ³N α-amino.

Produção do inóculo e inoculação

Para a produção de inóculo a estirpe UFLA 3-84 foi crescida em placa de Petri com meio de cultura 79, a 28 °C, por cinco dias. Em seguida, foi preparado o inóculo, adicionando-se uma alçada de cultura a 100 mL de meio de cultura líquido de Lopreto; Mazza; Balatti (1972) em erlenmeyers (250 mL), com pH inicial ajustado para 6,8. Esse inóculo foi incubado a 28 °C, sob a agitação constante de 120 rpm, durante 6 dias. O procedimento foi realizado assepticamente e em três repetições.

A inoculação foi realizada, adicionando-se alíquotas do inóculo com Densidade Óptica (D.O) a (600nm) padronizada em 0,55 ($\sim 1,5 \times 10^9$ UFC mL⁻¹), em Erlenmeyer (500 mL) contendo meio líquido de Lopreto. O volume final, incluindo o meio de cultura líquido e o inóculo foi de 300 mL. A porcentagem de inóculo foi de acordo com o estabelecido pelo planejamento experimental específico.

Avaliações realizadas

Neste trabalho foram realizadas as seguintes determinações: biomassa celular (peso seco de células em g L⁻¹); Produtividade (Log UFC L⁻¹ h⁻¹); e UFC mL⁻¹ (analisado em Log UFC mL⁻¹), pelo método da inoculação de microgotas (MILES; MISRA, 1938).

As coletas das amostras celulares para as avaliações foram realizadas de 24 em 24 horas, a partir de 0h. A determinação da biomassa celular foi feita a partir de alíquotas de 2 mL das amostras, iniciada a partir do momento da inoculação, até o décimo dia de cultivo. Após a coleta determinou-se a biomassa celular mediante a centrifugação de amostra de 0,9 mL do meio, em microtubos (2 mL), centrifugada a 4°C a 8.176 g por 10 minutos. O sobrenadante resultante

da centrifugação foi separado e o precipitado ressuspenso em 1,8 mL de tampão salino fosfato, constituído por 0.43 g de NaH_2PO_4 , 1.48 g of Na_2HPO_4 e 7.2 g of NaCl por litro, por três vezes (PUVANESARAJAH et al., 1987). O precipitado (células precipitadas) denominado de pellet foi colocado em estufa de secagem a 60 °C, até atingir peso constante, quando procedeu-se a pesagem da biomassa.

Para a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC mL^{-1}), a cada 24 horas, foram retiradas alíquotas de 1 mL e realizadas diluições decimais seriadas e inoculadas em meio 79, em triplicata. As placas foram incubadas a 28 °C por 10 dias (Miles e Misra, 1938). A contagem de UFC mL^{-1} foi iniciada a partir do quarto até o décimo dia de incubação.

Procedimento de otimização e delineamento experimental

Triagem das variáveis que afetam a produção de inoculante

Iniciou-se o estudo para identificar as variáveis do processo que apresentam efeito significativo na produção de células para inoculante. A triagem das variáveis pH, temperatura, fonte de carbono, extrato de levedura, inóculo, micronutrientes e agitação foi realizada seguindo o o delineamento experimental estatístico Plackett–Burman (PB) de 12 ensaios e 3 pontos centrais (PLACKETT; BURMAN, 1946; RODRIGUES; IEMMA, 2009).

A faixa de valores investigada para cada variável independente, em valores codificados e reais está apresentada na Tabela 3. Cada variável independente foi testada com dois níveis, alto e baixo, os quais foram denominados de “1” e “-1”, respectivamente e foram feitas três repetições no ponto central “0”. Os resultados dos ensaios foram analisados com o software STATISTICA 8.0 (STATISTICA, 2008). A importância do efeito de cada

variável na produção de células foi medida avaliando-se o p-valor, sendo considerados efeitos estatisticamente significativos aqueles que apresentaram p-valor menor que 0,10.

Tabela 3 Valores das variáveis do planejamento PB e seus respectivos níveis codificados para a produção de células da estirpe de *Bradyrhizobium* sp. UFLA 3-84

Variáveis	Código	-1	0	1
pH	X ₁	5,2	6,0	6,8
Temperatura (°C)	X ₂	27	30	33
Glicerol (g L ⁻¹)	X ₃	5,0	10	15,0
Ext. Levedura (g L ⁻¹)	X ₄	1,0	4,0	7,0
Inóculo (%)	X ₅	1,0	4,0	7,0
Solução de Zabriskie (mL L ⁻¹)	X ₆	1,0	5,0	9,0
Agitação (rpm)	X ₇	80	140	200

Delineamento Composto Central Rotacional e análise estatística

A segunda parte do estudo foi realizada utilizando um outro delineamento estatístico com objetivo de estabelecer a faixa ótima das variáveis selecionadas anteriormente. Com o delineamento PB foram selecionadas três variáveis: glicerol, extrato de levedura e agitação. O Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) constituiu-se de 17 ensaios, seguindo uma matriz de dados, constituída por 4 pontos fatoriais, 6 pontos axiais e três pontos centrais (RODRIGUES; IEMMA, 2009), sendo as variáveis respostas a biomassa celular seca, contagem em placa de Petri e produtividade de biomassa (Px), calculada pela equação 1. Foram executadas três repetições do ponto central para dar a estimativa do erro experimental. Os valores codificados e reais das variáveis independentes encontram-se na Tabela 4.

$$P_x = (\text{UFC mL}^{-1}_F - \text{UFC mL}^{-1}_I) / t \quad (1)$$

onde UFC mL^{-1}_F – contagem de unidades formadoras de colônias no final do crescimento celular;

UFC mL^{-1}_I - contagem de unidades formadoras de colônias no início do crescimento celular;

t = tempo final de crescimento celular (h).

Tabela 4 Valores codificados e reais para glicerol, concentração de extrato de levedura e agitação utilizados no DCCR para a produção de células da estirpe de *Bradyrhizobium* UFLA 3-84

Variável	Código	-1,68	-1	0	1	+1,68
Glicerol (g L ⁻¹)	X ₁	5,0	7,0	10	13	15
Ext. de Levedura (g L ⁻¹)	X ₂	0,6	2,0	4,0	6,0	7,4
Agitação (rpm)	X ₃	163	170	180	190	197

Curvas de crescimento da estirpe UFLA 3-84

As curvas de crescimento para os 17 ensaios foram realizadas a partir das médias do Log de UFC mL^{-1} , plotando-se os valores observados, a partir de 0h, de 24 em 24 horas, até 240 horas de cultivo da bactéria. Foi obtido o tempo de geração de todos os ensaios, dividindo-se o intervalo de tempo específico, entre 24 e 48 horas (na fase log) pelo número de gerações calculado de acordo às equações utilizadas por FRANKENBERG; FREIRE; THOMAS (1995) para avaliar os parâmetros a partir de processo fermentativo na produção de inoculantes e apresentadas por Madigan et al., (2009). Os parâmetros foram calculados de acordo com as Equações 2 e 3, a seguir:

$$tg = t/n \quad (2)$$

Onde,

t = tempo de crescimento exponencial em horas

n = número de gerações no período crescimento exponencial limitado

$$n = (\log N - \log N_0) / 0,301 \quad (3)$$

Onde,

n= número de gerações

N = número final de células

N_0 = número inicial de células, na fase logarítmica

Resultados

Avaliação dos fatores que afetam a produção de inoculante

Os resultados da etapa inicial do trabalho, que consistiu na triagem das variáveis mais importantes para o crescimento celular da estirpe UFLA 3-84, estão apresentados na Tabela 5, onde consta a planilha do delineamento PB com os 15 ensaios, sendo 3 do ponto central. São apresentados os seus valores codificados e reais das sete variáveis independentes (X_1 a X_7) e os resultados das duas variáveis dependentes/respostas (biomassa g L^{-1} e $\log \text{UFC mL}^{-1}$). Observa-se que a biomassa variou de $0,5 \text{ g L}^{-1}$ (no ensaio 12) a $5,2 \text{ g L}^{-1}$ (no ensaio 7), enquanto o $\log \text{UFC mL}^{-1}$ variou de 8,9 (ensaio 9) a 10,4 (ensaio 7)

As análises dos resultados de biomassa celular (g L^{-1}) e $\log \text{UFC mL}^{-1}$ encontram-se representados na Tabela 6. Observa-se que das sete variáveis estudadas na triagem, utilizando o planejamento Plackett-Burman, apenas a agitação apresentou efeito estatisticamente significativo, ao nível de 10% de significância, para a biomassa e $\log \text{UFC mL}^{-1}$, tendo respectivamente, o coeficiente de determinação (R^2) 0,83 e 0,84. Dentre as demais variáveis, pelas análises de efeitos e p-valor, o glicerol e o extrato de levedura, foram as duas variáveis que mais interferiram no processo de produção de biomassa (Tabela 6).

Tabela 5 Delineamento PB mostrando as sete variáveis estudadas com valores reais e os resultados observados na produção de células da estirpe UFLA 3-83

Ensaio	Variáveis							Biomassa (g L ⁻¹)	Log UFC mL ⁻¹
	Independentes				Dependentes				
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇		
1	1 (6,8)	-1 (27)	1 (15,0)	-1 (1,0)	-1 (1,0)	-1 (1)	1 (200)	3,380	10,00
2	1 (6,8)	1 (33)	-1 (5,0)	1 (7,0)	-1 (1,0)	-1 (1)	-1 (80)	1,585	9,06
3	-1 (5,2)	1 (33)	1 (15,0)	-1 (1,0)	1 (7,0)	-1 (1)	-1 (80)	1,612	9,18
4	1 (6,8)	-1 (27)	1 (15,0)	1 (7,0)	-1 (1,0)	1 (9)	-1 (80)	2,015	9,20
5	1 (6,8)	1 (33)	-1 (5,0)	1 (7,0)	1 (7,0)	-1 (1)	1 (200)	3,963	10,17
6	1 (6,8)	1 (33)	1 (15,0)	-1 (1,0)	1 (7,0)	1 (9)	-1 (80)	1,965	9,29
7	-1 (5,2)	1 (33)	1 (15,0)	1 (7,0)	-1 (1,0)	1 (9)	1 (200)	5,214	10,40
8	-1 (5,2)	-1 (27)	1 (15,0)	1 (7,0)	1 (7,0)	-1 (1)	1 (200)	3,297	10,09
9	-1 (5,2)	-1 (27)	-1 (5,0)	1 (7,0)	1 (7,0)	1 (9)	-1 (80)	1,593	8,92
10	1 (6,8)	-1 (27)	-1 (5,0)	-1 (1,0)	1 (7,0)	1 (9)	1 (200)	3,190	10,00
11	-1 (5,2)	1 (33)	-1 (5,0)	-1 (1,0)	-1 (1,0)	1 (9)	1 (200)	2,857	9,99
12	-1 (5,2)	-1 (27)	-1 (5,0)	-1 (1,0)	-1 (1,0)	-1 (1)	-1 (80)	0,558	9,12
13	0 (6,0)	0 (30)	0 (10)	0 (4,0)	0 (4,0)	0 (5)	0 (140)	3,962	10,15
14	0 (6,0)	0 (30)	0 (10)	0 (4,0)	0 (4,0)	0 (5)	0 (140)	3,499	10,12
15	0 (6,0)	0 (30)	0 (10)	0 (4,0)	0 (4,0)	0 (5)	0 (140)	3,129	10,12

X₁ = pH; X₂ = temperatura; X₃ = glicerol (g L⁻¹); X₄ = extrato de levedura (g L⁻¹); X₅ = Volume de inóculo (%); X₆ = Micronutrientes (mL L⁻¹); X₇ = Agitação (rpm).

Tabela 6 Análise estatística dos resultados de biomassa e UFC obtidos com o delineamento estatístico experimental PB, mostrando os efeitos, erro padrão, *t*- e *p*-valor

Variáveis	**Biomassa (g L ⁻¹) ^(a)				**Log UFC mL ⁻¹ (b)			
	Efeitos	*E. P	t(8)	p-valor	Efeito	*E. P.	t(8)	p-valor
Média	2,7879	0,1799	15,4940	0,0000	9,7253	0,0826	117,8100	0,0000
X ₁	0,1611	0,4023	0,4000	0,7007	0,0032	0,1846	0,0200	0,9867
X ₂	0,5272	0,4023	1,3100	0,2314	0,1275	0,1846	0,6900	0,5122
X ₃	0,6229	0,4023	1,5480	0,1655	0,1508	0,1846	0,8200	0,4409
X ₄	0,6842	0,4023	1,7010	0,1328	0,0424	0,1846	0,2300	0,8250
X ₅	0,0018	0,4023	0,0040	0,9966	-0,0234	0,1846	-0,1300	0,9026
X ₆	0,4065	0,4023	1,0100	0,3459	0,0310	0,1846	0,1700	0,8715
X ₇	2,0955	0,4023	5,2080	0,0012	0,9784	0,1846	5,3000	0,0011

* E. P = Erro padrão. **Coeficiente de determinação (R^2): ^(a) = 0,83,45 e ^(b) = 0,84,73. X₁ = pH; X₂ = Temperatura (°C); X₃ = Glicerol (g L⁻¹); X₄ = Extrato de Levedura (g L⁻¹); X₅ = Inóculo (%); X₆ = Micronutrientes (mL L⁻¹); X₇ = Agitação (rpm).

Os maiores valores de contagem de UFC mL⁻¹ foram obtidos nos ensaios, cujos valores de agitação situaram-se entre 140 e 200 rpm (1, 5, 7, 8, 10, 13, 14 e 15). Exceto, o ensaio 10, que recebeu a concentração de 5,0 g L⁻¹ de glicerol e 1,0 g L⁻¹ de extrato de levedura, todos os demais (1, 5, 7 e 13 a 15), que também atingiram valores de 1×10^{10} log UFC mL⁻¹, receberam maiores concentrações de um ou outro componente ou dos dois ao mesmo tempo. Os demais fatores estudados, como o pH, temperatura, glicerol, e volume de inóculo, não influenciaram significativamente na produção de células. Embora não havendo efeito significativo, as variáveis que apresentaram p-valores próximo da significância foram o glicerol e o extrato de levedura, 0,16 e 0,13, respectivamente. Em relação às demais variáveis, todas apresentaram p-valor superior a 0,23 (Tabela 6).

Na seqüência do trabalho, objetivando uma condição ótima e de menor custo, foram selecionadas para o segundo delineamento (DCCR), a fonte de

carbono glicerol, o extrato de levedura e a agitação. A agitação foi selecionada porque apresentou efeito altamente significativo. O glicerol e o extrato de levedura foram escolhidos porque apresentaram p-valor para a biomassa, mais próximo da significância, 0,16 e 0,13, respectivamente. Além disso, o glicerol é um substrato amplamente utilizado em cultivos de rizóbios nos processos industriais e, o extrato de levedura, um componente muito importante no metabolismo bacteriano, sendo um dos principais componentes do meio de cultura usado para o crescimento de rizóbios (BURTON, 1984). O extrato de levedura é um componente utilizado pelo micro-organismo como fonte de carbono, nitrogênio e fatores de crescimento (BOIARDI; ERTOLA, 1985; URENHA et al., 1994). As variáveis temperatura, pH, concentração de inóculo e micronutriente foram fixadas, de forma a diminuir custos.

Otimização das condições de cultivo utilizando DCCR

A segunda etapa do estudo foi realizada seguindo um planejamento do tipo DCCR, fatorial completo 2^3 , com 6 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 17 ensaios para a otimização das condições de cultivo. Assim foram estudados cinco níveis das variáveis glicerol, extrato de levedura e agitação, cujas faixas de estudo situaram-se respectivamente, entre 5 a 15,0 g L⁻¹, 0,6 a 7,4 g L⁻¹ e 163 a 197 rpm (Tabela 7).

Observa-se que a biomassa variou de 2,74 a 4,66 g L⁻¹, a contagem em log UFC mL⁻¹ de 9,5 a 10,39 e Px foi de 0,011, nos ensaios 8 e 14, a 0,022 log UFC mL⁻¹ h⁻¹, no ensaio 13. Os maiores valores de biomassa, superiores a 4,0 g L⁻¹, foram obtidos com os ensaios 3, 5 e 7. Quanto, às células viáveis, verificou-se valores de log UFC mL⁻¹ superior a 10¹⁰ nos ensaios 1, 3, 5, 7, 9, 13. A produtividade (Px) atingiu valores de 0,018 a 0,022 log UFC mL⁻¹ h⁻¹, nos ensaios 1, 4, 10, 13 e 16. (Tabela 7).

Tabela 7 Valores codificados, valores reais das variáveis independentes, em que X1, X2 e X3, são respectivamente, glicerol (g L^{-1}), extrato de levedura (g L^{-1}) e agitação (rpm), e da respostas (biomassa celular, Log UFC mL^{-1} e Px) para os ensaios do Delineamento Composto Central Rotacional

Ensaio	Variáveis independentes			Variáveis dependentes		
	X ₁	X ₂	X ₃	Biomassa	Log UFC	Px
	Códigos/valores reais			g L^{-1}	mL^{-1}	Log UFC mL^{-1} h^{-1}
1	-1 (7,0)	-1 (2,0)	-1 (170)	3,050	10,380	0,019
2	1 (13,0)	-1 (2,0)	-1 (170)	3,660	9,845	0,016
3	-1 (7,0)	+1 (6,0)	-1 (170)	4,611	10,041	0,012
4	1 (13,0)	+1 (6,0)	-1 (170)	3,380	9,929	0,019
5	-1 (7,0)	-1 (2,0)	+1 (190)	4,660	10,398	0,013
6	1 (13,0)	-1 (2,0)	+1 (190)	3,000	9,802	0,016
7	-1 (7,0)	+1 (6,0)	+1 (190)	4,120	10,176	0,014
8	1 (13,0)	+1 (6,0)	+1 (190)	3,740	9,875	0,011
9	-1,68 (5,0)	0 (4,0)	0 (180)	3,680	10,021	0,015
10	1,68 (15,0)	0 (4,0)	0 (180)	3,388	9,740	0,020
11	0 (10,0)	-1,68 (0,6)	0 (180)	2,740	9,501	0,014
12	0 (10,0)	+1,68 (7,4)	0 (180)	3,480	9,885	0,016
13	0 (10,0)	0 (4,0)	-1,68 (163)	3,550	10,301	0,022
14	0 (10,0)	0 (4,0)	+1,68 (197)	2,890	9,889	0,011
15	0 (10,0)	0 (4,0)	(180)	3,290	9,929	0,016
16	0 (10,0)	0 (4,0)	(180)	3,190	9,802	0,018
17	0 (10,0)	0 (4,0)	(180)	3,230	9,835	0,016

A análise estatística dos resultados demonstra que para biomassa seca, nenhum termo, linear ou quadrático, apresentou efeito estatisticamente significativo (Tabela 8). Para a resposta log UFC mL^{-1} , apenas o termo linear do glicerol apresentou efeito significativo e negativo, indicando que um aumento na concentração do mesmo, diminuiu a contagem de colônias. Para a produtividade, a única variável que foi significativa foi o termo linear da agitação, apresentando efeito negativo. Não houve interação significativa entre os fatores investigados. Analisando-se os dados, sugere-se que para a bactéria UFLA 3-84, os menores

valores, para as três variáveis estudadas (glicerol, extrato de levedura e agitação), atendem ao objetivo de obtenção de alta produção de células viáveis. Esses níveis estão representados pelo ensaio 1, o qual atingiu \log UFC mL^{-1} superior a 1×10^{10} , biomassa seca de $3,05 \text{ g L}^{-1}$ e P_x de $0,019 \log$ UFC $\text{mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Tabela 7).

Para a contagem de células em \log UFC mL^{-1} , a agitação variando entre 163 a 197 rpm permitiu a obtenção de valores de até 10^{10} UFC mL^{-1} . No entanto, a obtenção de valores acima de 1×10^{10} tendeu a ocorrer nas agitações menores. Dessa forma, sugere-se adotar valor de agitação em torno de 165 rpm, como sendo suficiente para o processo fermentativo, promovendo alta densidade celular da UFLA 3-84 no meio de cultura líquido modificado de Lopreto; Mazza; Balatti (1972).

Portanto, para o crescimento celular, a faixa ótima de concentração de glicerol, extrato de levedura para a estirpe UFLA 3-84 está em torno de 7,0 e 2,0 g L^{-1} , respectivamente e a agitação de 165 rpm.

Curvas de crescimento da estirpe UFLA 3-84

Verificou-se que os ensaios: 2, 4, 6, 8, 10, 11, 12 e os pontos centrais, apresentaram valores abaixo de 10^{10} UFC mL^{-1} . A obtenção de valores de UFC mL^{-1} superior a 10^{10} na maioria dos ensaios, ocorreu a partir 144 h, prolongando até 216 h de cultivo. O tempo de geração, definido considerando o intervalo de tempo durante fase log, entre 24 e 48h, variou de 5,72, no ensaio 3, a 23,34 horas, no ensaio 14 (Tabela 9 e Figura 1).

Tabela 9 Log de UFC mL⁻¹ em relação ao tempo (h), número máximo (NM) de UFC mL⁻¹, tempo em horas de obtenção do número máximo de células (TMC) e de geração (Tg) obtidos a partir das curvas de crescimento para os 17 ensaios, incluindo os três pontos centrais, a partir do DCCR

Tempo	Ensaio														**Ponto Central
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
0	7,11	7,11	7,11	7,25	7,25	7,25	7,25	7,09	7,09	7,09	7,09	7,11	7,25	7,11	7,09
24	8,19	8,12	8,12	8,03	7,83	8,90	7,81	7,68	7,98	7,91	8,07	8,01	8,16	8,88	7,95
48	9,09	9,20	9,38	9,29	8,98	9,30	9,00	8,92	9,18	9,12	9,05	9,00	9,37	9,19	9,02
72	9,53	9,57	9,57	9,58	9,60	9,63	9,57	9,54	9,66	9,65	9,58	9,45	9,47	9,43	9,59
96	9,56	9,60	9,59	9,60	9,66	9,63	9,61	9,63	9,69	9,64	9,53	9,62	9,49	9,50	9,54
120	9,57	9,64	9,63	9,62	9,71	9,62	9,68	9,65	9,85	9,56	9,55	9,81	9,53	9,56	9,55
144	10,26	9,67	9,88	9,93	9,70	9,79	9,69	9,61	9,77	9,74	9,48	9,40	10,30	9,54	9,66
168	10,39	9,78	9,85	9,79	9,73	9,80	9,82	9,73	9,86	9,63	9,48	9,68	9,86	9,74	9,67
192	9,78	9,80	9,88	9,70	9,85	9,67	9,71	9,77	10,01	9,56	9,45	9,68	9,82	9,36	9,77
216	9,86	9,73	10,04	9,83	9,80	9,77	10,19	9,66	10,00	9,54	9,48	9,70	9,74	9,67	9,84
240	9,68	9,75	9,90	9,76	10,40	8,70	9,96	9,88	9,96	9,56	9,49	9,70	9,71	9,89	9,79
NM	10,39	9,80	10,04	9,93	10,40	9,80	10,19	9,88	10,01	9,74	9,58	9,81	10,30	9,89	9,84
TMC	168	192	216	144	240	168	216	240	216	144	72	120	144	240	216
*Tg	8,02	6,68	5,73	5,73	6,28	18,04	6,07	5,82	6,02	5,97	7,38	7,29	5,97	23,34	6,76

*Tempo de geração em horas. **Média dos três pontos centrais.

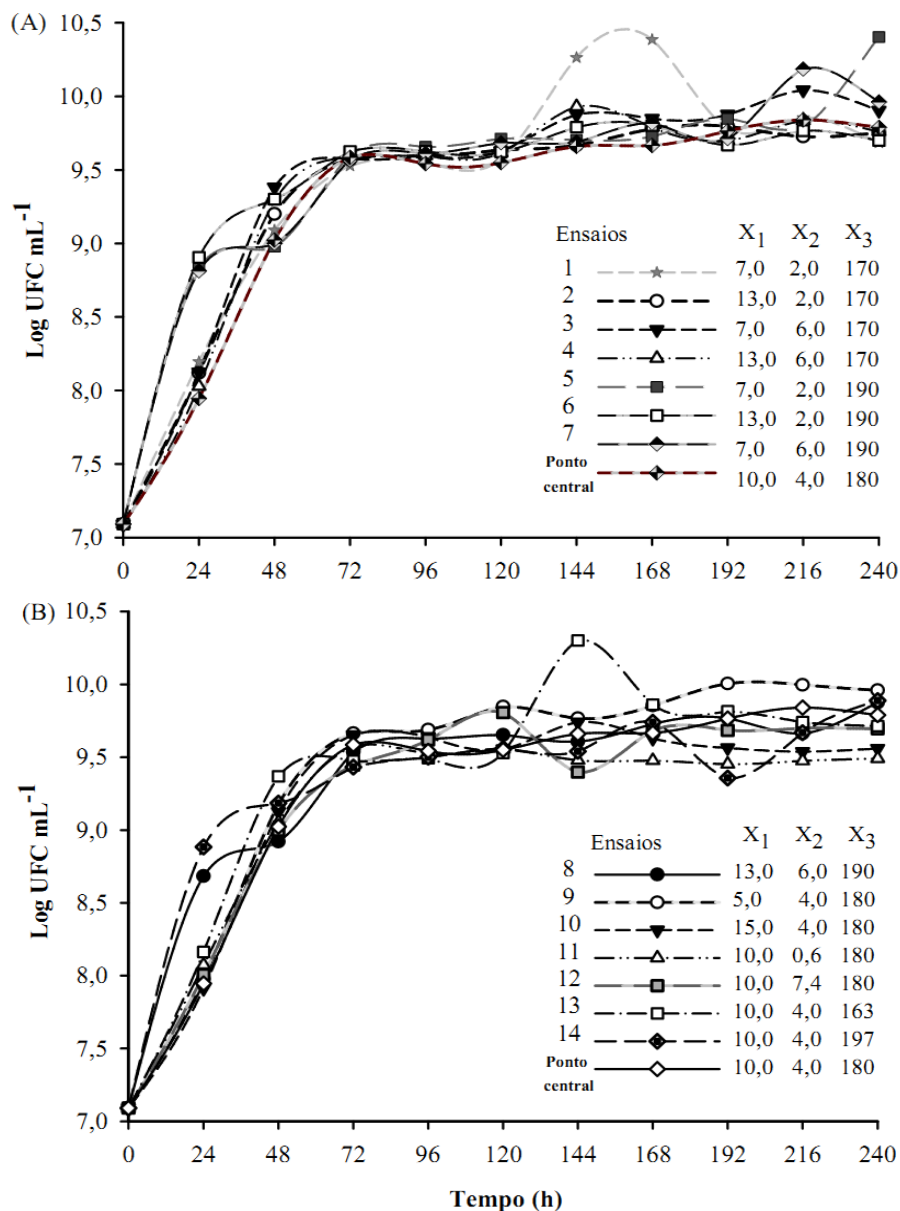


Figura 1 Curvas de crescimento da estirpe de *Bradyrhizobium* sp. UFLA 3-84, em meio de cultura líquido modificado de Lopreto; Mazza; Balatti (1972). A legenda mostra que: X₁ = glicerol (g L⁻¹), X₂ = Extrato de levedura (g L⁻¹) e X₃ = agitação (rpm).

Discussão

Avaliação dos fatores que afetam a produção de inoculante

Os micro-organismos, de forma geral, são muito diversos e versáteis, tanto em termos de diversidade, quanto de densidade (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006), conseqüentemente possuem requerimentos nutricionais e condições de crescimento diversificado e específico, dependendo da espécie. Os fixadores de nitrogênio, por sua vez, também apresentam requerimentos nutricionais e condições de cultivos específicos. As especificidades nutricionais e metabólicas são aspectos básicos utilizadas para a separação dos grupos em fixadores de crescimento rápido, intermediário e lento (STOWERS; ELKAN, 1984; STOWERS, 1985; BEN REBAH et al., 2007; Moreira, 2008). As bactérias fixadoras de nitrogênio que formam simbiose com leguminosas, como o feijão-caupi, pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* estão incluídos dentro do grupo de rizóbios de crescimento lento, cujo tempo varia entre 6 a 10 dias (BURTON, 1984; PRADELLA; OLIVEIRA; URENHA, 2001; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). A estirpe de *Bradyrhizobium* UFLA 3-84, inoculante do feijão-caupi, objeto de estudo do presente trabalho apresentou crescimento dentro da faixa mencionada acima. Além disso, produziu densidade celular suficiente para atender aos requisitos mínimos do MAPA, para a elaboração de inoculante (Tabelas 5).

Vários ensaios, constituídos pelo meio de cultura líquido modificado de Lopreto; Mazza; Balatti (1972), condições de cultivo e incubação, promoveram o crescimento satisfatório, permitindo a obtenção de altas densidades celulares da estirpe UFLA 3-84, observadas por meio da avaliação de biomassa seca e log UFC mL⁻¹ (Tabela 6). Analisando-se estes resultados obtidos, percebe-se que a agitação foi preponderante para o sucesso do crescimento microbiano, uma vez

que, as altas densidades de células e o maior valor de biomassa seca foram alcançados nos ensaios com os maiores valores de agitação (Tabela 5). Estes resultados corroboram o que tem sido observado em outros estudos com rizóbios adotam agitação de 150 rpm ou superior (FRANKENBERG; FREIRE; THOMAS, 1995; SINGLETON; KEYSER; SANDE, 2002; FERNANDES JÚNIOR et al., 2009; ALVAREZ et al., 2010). Entretanto, há estudo que obteve alta densidades celulares, semelhantes ao alcançado neste estudo (Tabela 5) com estirpes de *Bradyrhizobium* utilizando o mesmo meio, e com agitação inferior, de 110 rpm (MIGUEL; MOREIRA, 2001; BARBERI et al., 2004).

Apesar de não serem significativos, o glicerol e extrato de levedura apresentaram efeitos próximos da significância (Tabela 6). O glicerol é uma fonte de carbono de baixo custo e amplamente utilizada em cultivos microbianos e de bactérias do gênero *Bradyrhizobium* (Arias e Martinez-Drets 1976, STOWERS, 1985; PRADELLA; OLIVEIRA; URENHA, 2001; SINGLETON; KEYSER; SANDE, 2002; ITO et al., 2005; MOTA; SILVA; GONÇALVES, 2009; MARKOV; AVERITT; WALDRON, 2011). O extrato de levedura é um componente muito importante para o crescimento microbiano, dependendo de sua concentração e marca utilizada favorece a obtenção de alta produção de células viáveis (DATE, 1972) ou até inibe o crescimento produzindo células deformadas e com baixa viabilidade (SKINNER; ROUGHLEY; CHANDLER, 1977). Ainda sobre o extrato de levedura, é importante mencionar que este componente contém vitaminas, e outros constituintes que estimulam a eficiência de crescimento do micro-organismo (BEN REBAH; TYAGI; PRÉVOST, 2002; BEN REBAH et al., 2007)

Quanto às outras variáveis há diversas informações, que corroboram o presente trabalho e/ou apresentam resultados distintos. Por exemplo, tem sido demonstrado por Barberi et al., (2004), que quando o meio apresentou valor inicial de pH 5,5, ocorreu o maior crescimento, sendo que este fator não

interferiu no presente trabalho (Tabelas 5 e 6). Entretanto, já foi observado que com estirpes de *Bradyrhizobium* cultivadas em meio de cultura líquido YM (VINCENT, 1970), cuja fonte de carbono era o manitol, o crescimento foi distinto, sendo que o melhor desempenho foi obtido em pH 6,0, tanto em UFC quanto na produção de exopolissacarídeos.

Em relação à obtenção de UFC, nota-se que o meio de cultura exerce influência direta na produção de células viáveis. Por exemplo, os autores Miguel e Moreira (2001) trabalhando com a estirpe (INPA 03-11B) e Kremer e Peterson (1983) com *Rhizobium* CB756 e Fernandes Júnior et al., (2009) com estirpe de *Bradyrhizobium* BR 3267 utilizando o meio de cultura líquido YM (VINCENT, 1970) (semelhante ao meio 79) obtiveram valores de 10^9 UFC mL⁻¹, sendo inferior ao alcançado neste estudo. Provavelmente, esta diferença pode estar relacionada à fonte de carbono (manitol) que os autores utilizaram no meio de cultura e à menor concentração de extrato de levedura, uma vez que, este componente contém vitaminas, estimulando a eficiência de crescimento do micro-organismo (BEN REBAH; TYAGI; PRÉVOST, 2002; BEN REBAH et al., 2007). Este pressuposto corrobora o que foi observado em outro trabalho, que embora utilizando o glicerol como fonte de carbono, na concentração de 12 g L⁻¹, mas contendo apenas 1 g L⁻¹ de extrato de levedura, foi obtida uma densidade de células de somente 10^9 UFC mL⁻¹ (Daza et al., 2000).

Relacionado à temperatura, outro fator importante para o crescimento bacteriano, observa-se que faixa de temperatura utilizada para cultivo de *Bradyrhizobium* situa-se, em geral, entre 25 e 32 °C, prevalecendo valores entre 28 °C e 30 °C. Por exemplo, Kremer e Peterson (1983), trabalharam com 25°C, FRANKENBERG; FREIRE; THOMAS (1995), Fernandes Júnior et al., (2009) e Grassano et al., (2009) adotaram o valor 28 °C. Nos trabalhos de Boiardi e Ertola (1985), Surpin e Maier (1998) e Ben Rebah et al., (2002) o valor de temperatura utilizado foi 30 °C. Semelhantermente, ao observado no presente

estudo (Tabelas 5 e 6), notou-se que nos trabalhos abordados acima, o fator temperatura não interferiu significativamente no processo de produção de células.

Portanto, não foram observadas diferenças significativas de crescimento celular nos cultivos de rizóbios devido à temperatura. Por exemplo, Frankenberg (1990) e FRANKENBERG; FREIRE; THOMAS (1995), trabalhando com 2,5 L de meio de cultura em fermentador de 5 L e testando temperatura variando de 22 °C a 38 °C, obteve máxima produção de células nas temperaturas de 28 °C, 30 °C e 34 °C. Assim, os resultados observados no presente estudo estão de acordo aos apresentados pela maioria dos trabalhos apresentados anteriormente, confirmando dessa forma, que a variação de temperatura entre 27 a 32 °C, não interfere no processo fermentativo de estirpe de *Bradyrhizobium*, que foi a estirpe UFLA 3-84. Esta estirpe foi estudada em sua segunda etapa com o DCCR, avaliando-se as interações do glicerol, extrato de levedura e agitação, selecionadas por meio do delineamento PB.

Otimização das condições de cultivo utilizando DCCR

Em relação à biomassa seca, a alcançada no presente trabalho (Tabela 7), em geral, foi semelhante à relatada por Grassano et al., (2009). Estes autores trabalharam com estirpes *Bradyrhizobium japonicum* (E109, SEMIA 5079 e SEMIA 5080) e *Bradyrhizobium elkanii* (SEMIA 587 e SEMIA 5019), todas inoculantes aprovados para a soja, exceto E109. A biomassa seca entre 4,12 e 4,66 (Tabela 7), foi superior aos valores alcançados, pelos mesmos autores, que obtiveram entre 3,12 e 3,91 g L⁻¹, trabalhando com frascos agitados a 250 rpm, incubados a 28 °C.

Quanto à influência da agitação, observa-se em diversos trabalhos desenvolvidos com estirpes de *Bradyrhizobium*, uma tendência ao uso de altos

valores de agitação em processos fermentativos, sendo a maioria acima de 150 rpm, chegando até 300 rpm (FRANKENBERG; FREIRE; THOMAS, 1995; SINGLETON; KEYSER; SANDE, 2002 FERNANDES JÚNIOR et al., 2009; ALVAREZ et al., 2010). Por exemplo, os autores Boiardi e Ertola (1985) obtiveram o máximo de UFC mL ($1,1 \times 10^{10}$) utilizando valor de agitação de 300 rpm. Enquanto, Grassano et al., (2009), obtiveram valores acima de 5×10^{10} com agitação de 250 rpm. No entanto, com valor de agitação bem inferior (110 rpm), Barberi et al., (2004), obtiveram valores de 10^{10} UFC mL⁻¹. No presente trabalho, foi constatado que a faixa de agitação para a biomassa entre 163 e 197 rpm, não influenciou significativamente. A partir das informações da literatura apresentada, sugere-se utilizar, valores de agitação em torno de 165 rpm, o que provavelmente para um meio de cultura balanceado promoverá um alto crescimento celular. Propõe-se, este valor de agitação, pois uma rotação mais lenta propicia-se maior vida útil do equipamento.

Quanto ao extrato de levedura, geralmente, a concentração de utilizada é de 4 g L^{-1} (FRANKENBERG, 1990; BEN REBAH; TYAGI; PRÉVOST, 2002; BARBERI et al., 2004; GRASSANO et al., 2009). Entretanto, concentração de 1 g L^{-1} de extrato de levedura e aproximadamente 12 g L^{-1} de glicerol, permitiram alcançar valores acima de 10^{10} UFC mL⁻¹ (RODRIGUÉZ-NAVARRO et al., 2003; ALBAREDA et al., 2008). Porém, em trabalhos utilizando YM (VINCENT, 1970), em cuja composição há baixa concentração de extrato de levedura e a fonte de carbono é o manitol, os valores não ultrapassam 10^9 UFC mL (KREMER; PETERSON, 1983; MIGUEL; MOREIRA, 2001; FERNANDES JÚNIOR et al., 2009).

Para o extrato de levedura, sugere-se considerar que o processo otimizado é aquele em que a concentração seja menor possível e com alta concentração de células, uma vez que, o custo deste componente é um dos mais altos dentre os demais utilizados. Além disso, concentrações acima de 0,35%

podem não ser benéficas para algumas estirpes, provocando a produção de células deformadas e a redução da viabilidade celular (SKINNER; ROUGHLEY; CHANDLER, 1977; BEN REBAH et al., 2007). No entanto, a estirpe UFLA 3-84, utilizada neste trabalho, não foi inibida com concentrações acima de 0,35% de extrato e levedura, apresentando crescimento satisfatório em diferentes concentrações. Mas, demonstrou pouco crescimento quando a concentração de extrato de levedura foi superior a 6 g L⁻¹.

Curvas de crescimento da estirpe UFLA 3-84

O inoculante bacteriano utilizado para inoculação de leguminosas, como o feijão-caupi deve apresentar uma densidade celular mínima de 1×10^9 UFC mL⁻¹ (BRASIL, 2011). De forma geral, a produção celular de todos os ensaios atendeu à esta norma do MAPA (Figura 1). Além disso, alguns ensaios promoveram crescimento celular acima do mínimo exigido, obtendo-se valores de 10^{10} log UFC mL⁻¹. Esta densidade celular é superior à apresentada nos inoculantes comerciais. Observa-se que o tempo de geração de alguns ensaios, como o 1 e 13, que apresentaram maiores valores de log UFC mL⁻¹ (superior 10^{10}), foi 8,02 e 5,97, respectivamente (Tabela 9). Estes valores são melhores que o obtido por Barberi et al. (2004) com a estirpe BR 29 (SEMIA 5019), cujo tempo de geração foi de 11,55 h⁻¹, e semelhantes aos apresentados por Frankenberg; Freire, Thomas (1995), que trabalhando com a estirpe SEMIA 587, obteve valores entre 7,5 e 7,7 h⁻¹, cultivando respectivamente às temperaturas de 28 e 30 °C. Portanto, os resultados dos ensaios 1 e 13, são os que demonstram melhor performance de crescimento celular.

Conclusões

O delineamento estatístico Plackett-Burman permitiu a identificação rápida de fatores importantes no processo de cultivo da estirpe UFLA 3-84. Foram selecionadas a agitação, por ter apresentado efeito estatístico significativo e as variáveis glicerol e extrato de levedura por serem dois componentes importantes para o crescimento microbiano. O DCCR permitiu com poucos ensaios encontrar uma faixa ótima para a produção de células de *Bradyrhizobium*. Mas, nenhuma das variáveis apresentou efeito estatístico significativo.

Para a estirpe UFLA 3-84, a composição e concentração do meio de cultura para obtenção de altos valores de UFC mL⁻¹ são: glicerol (7,0 g L⁻¹); extrato de levedura (2 g L⁻¹); K₂HPO₄ (0,5 g L⁻¹); MgSO₄.7H₂O (0,2 g L⁻¹); NaCl (0,1 g L⁻¹); KNO₃ (0,8 g L⁻¹); (NH₄)₂HPO₄ (0,3 g L⁻¹); FeCl₃ a 10% (0,1 mL L⁻¹) e MnSO₄ a 10% (0,1 mL L⁻¹). Neste meio, adicionar 1,0 mL L⁻¹ de solução micronutrientes (Zabriskie). As condições de incubação foram: pH inicial ajustado a 6,8; temperatura de 28 °C; agitação de 170 rpm e o máximo de 144 h de incubação, para a obtenção de 1 x 10¹⁰ UFC mL⁻¹. Para produção celular de 1 x 10⁹ log UFC mL, que é a densidade mínima exigida pelo Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para a produção de inoculantes comerciais, o período de 96 horas de cultivo é suficiente, e mais vantajoso economicamente.

Agradecimentos À Secretaria de Estado de Educação de Mato Grosso – SEDUC-MT, pela Licença para Qualificação Profissional de P.M. Sousa, à CAPES pela bolsa de doutorado de S.M. Oliveira, ao CNPq bolsa de produtividade em pesquisa e grant de F.M.S. Moreira e R.F. Schwan e ao Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e CNPq pelo

financiamento do trabalho através do projeto edital 64 CNPq/MAPA, processo nº 578635/2008-9.

Referências

ALBAREDA, M. et al., Alternatives to peat as a carrier for rhizobia inoculants: solid and liquid formulations. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 2771-2779, 2008.

ALMEIDA, A.L.G. et al., Produtividade do feijão-caupi cv BR 17 Gurguéia inoculado com bactérias diazotróficas simbióticas no Piauí. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 5, n. 3, p. 364-369, 2010.

ALVAREZ, G.S. et al., Evaluation of sol-gel silica matrices as inoculant carriers for *Mesorhizobium* spp. Cells. **Formatex**, Badajoz, p. 160-167, 2010.

BARBERI, A. et al., Crescimento de *Bradyrhizobium elkanii* Estirpe BR 29 em meios de cultivo com diferentes valores de ph inicial. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 2, p. 397-405, 2004.

BEN REBAH, F. et al., Agro-industrial waste materials and wastewater sludge for rhizobial inoculant production: a review. **Bioresource Technology**, Washington, v. 98, p. 3535-3546, 2007.

BEN REBAH, F.; TYAGI, R. D.; PRÉVOST, D. Production of *S. meliloti* using wastewater sludge as a raw material: effect of nutrient addition and pH control. **Environmental Technology**, Oxford, v. 23, n. 6, p. 623-629, 2002.

BISSONNETTE, N.; LALANDE, R.; BORDELEAU, L.M. Large-Scale Production of *Rhizobium meliloti* on Wheyt. **Applied and Environmental Microbiology**, Wahsignton, v. 52, n. 4, p. 838-841, 1986.

BOIARDI, L.L.; ERTOLA, R.J. *Rhizobium* biomass production in batch and continuous culture with a malt-sprouts medium. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 1, p. 163-171, 1985.

BOX, G. E. P.; WILSON, K. B. Experimental attainment of optimum conditions. **Journal of the Royal Statistical Society**, Malden, v. 13, p. 1-45, 1951.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 13, de 24 de março de 2011. Normas sobre especificações, garantias, registro, embalagem e rotulagem dos inoculantes destinados à agricultura. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, n. 58, 25 mar. 2011. Seção 1, p. 3-7.

BURTON, J. C. **Legume inoculant production manual**. Maui: NifTAL Center – MIRCEN, 1984. 96 p.
COCHRAN, W. G.; COX, G. M. **Experimental designs**. 2nd ed. New York: J. Wiley, 1966. 611p.

COSTA, E. M. et al., Nodulação e produtividade de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. por cepas de rizóbio em Bom Jesus, PI. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 42, n. 1, p. 1-7, jan./mar. 2011.

DATE, R.A. Sources and Quantities of Yeast Extract for Growth of Rhizobia. **Journal of Applied Microbiology**, Malden, v. 35, p. 379–387, 1972.

DAZA, A. et al., Perlite as a carrier for bacterial inoculants. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.32, p.567-572, 2000.

FERNANDES JÚNIOR, P. I. et al., Polymers as carriers for rhizobial inoculant formulations. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 9, p. 1184-1190, set. 2009.

FRANKENBERG, C. L. C. **Tecnologia da produção de inoculantes de *Bradyrhizobium japonicum* em fermentador e em turfa**. 1990. 206 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1990.

FRANKENBERG, C. L. C.; FREIRE, J. R. J.; THOMAS, R. W. P. Growth and competition between two strains of *B. japonicum* in broth and in a peat-based inoculant: dinitrogen fixation efficiency and competition for nodulation sites. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 211-218, 1995.

FRED, E.B.; WAKSMAN, S.A. **Laboratory manual of general microbiology**. McGraw-Hill, New York, 1938.

FREIRE-FILHO, F.R. et al., **Melhoramento genético**. In: Feijão-caupi: avanços tecnológicos. Freire Filho FR, Lima JAA, Ribeiro V. Q. (Ed.). Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005.

GRASSANO, A. E. et al., Quantitative relationship between maximum growth rates and the intracellular pattern of α -esterase and β -esterase activity of leguminous infecting bacteria. **New Biotechnology**, Amsterdam, v. 26, n. 5, p. 234-238, Nov. 2009.

GRUBER, N.; GALLOWAY, J.N. An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. **Nature**, London, v. 451, p. 293-296, 2008.

ITO, T. et al., Hydrogen and Ethanol Production from Glycerol-Containing Wastes Discharged after Biodiesel Manufacturing Process. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 100, n. 3, p. 260–265, 2005.

KALIL, S. J.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 35, p. 539–550, 2000.

KREMER, R. J.; PETERSON, H. L. Effects of carrier and temperature on Survival of *Rhizobium* spp. in legume inocula: development of an improved type of inoculant. **Applied and Environmental Microbiology**, Whashington, v. 45, n. 6, p. 1790-1794, 1983.

LACERDA, A. M. et al., Efeito de estirpes de rizóbio sobre a nodulação e produtividade do feijão-caupi. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 51, n. 293, p. 67-82, 2004.

LOPRETO, C. R.; MAZZA, L. A.; BALATTI, A. P. Influencia de los componentes del medio de cultivo sobre el tiempo de generacion de una cepa de *Rhizobium japonicum*. *Annales Sociedade Cientifica Argentina*, Buenos Aires, v. 193, n. 1/2, p. 35-47, 1972.

MACCIÓ, D.; FABRA, A.; CASTRO, S. Acidity and calcium interaction affect the growth of *Bradyrhizobium* sp. and the attachment to peanuts roots. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v. 34, p. 201-208, 2002.

MADIGAN, M.T. et al., **Brock biology of microorganisms**. Pearson Benjamin Cummings, San Francisco, 2009, 1061p

MAGALHÃES F.M.M. **Estado atual de conhecimento sobre fixação biológica de nitrogênio na Amazônia**. In: SIMPÓSIO SOBRE O TRÓPICO ÚMIDO, Anais, v. 1, p. 499-512, 1986.

MARKOV, S.A.; AVERITT, J.; WALDRON, B. Bioreactor for glycerol conversion into H₂ by bacterium *Enterobacter aerogenes*. *International Journal of Hydrogen Energy*, Oxford, v. 36, p. 262 -266, 2011.

MARTINS, L. M. V. et al., Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: a strategy for improving grain yield in the semi-arid region of Brazil. *Biology and Fertility of Soils*, New York, v. 38, p. 333-339, 2003.

MIGUEL, D. L.; MOREIRA, F. M. S. Influencia do pH do meio de cultivo e da turfa no comportamento de estirpes de *Bradyrhizobium*. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, v. 25, n. 4, p. 873-883, out./dez. 2001.

MILES, A.A.; MISRA, S.S. The estimations of the bactericidal power of the blood. *Journal of Hygiene*, London, v. 38, n. 6, p. 732-749, 1938.

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

MOREIRA, F. M. S. **Estirpes de bactérias altamente eficientes que fornecem nitrogênio para o caupi foram selecionadas na UFLA e já são recomendadas para a produção de inoculantes comerciais.** Lavras: UFLA, 2005. 12 p. Boletim de Extensão. Disponível em: <[www.ufla.br/editora/publicações/boletim de extensão](http://www.ufla.br/editora/publicações/boletim_de_extensao)>. Acesso em: 19 abr. 2006.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo.** 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. 729 p.

MOTA, C. J. A.; SILVA, C. X. A.; GONÇALVES, V. L. C. Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da Glicerina de produção de biodiesel. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 639-648, 2009.

PLACKETT, R. L.; BURMAN, J. P. The design of optimum multifactorial experiments. **Biometrika**, Oxford, v. 33, n. 4, p. 305–325, 1946. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/2332195>>. Acesso em: 10 maio 2011.

PRADELLA, J. G. C.; OLIVEIRA, M. S.; URENHA, L. C. Produção de inoculantes Agrícolas. In: LIMA, U. A. et al., (Coord.). **Biotecnologia industrial.** São Paulo: E. Blücher, 2001. v. 3, p. 279-305.

PUVANESARAJAH, V. et al., Cell surface polysaccharides from *Bradyrhizobium japonicum* and a nonnodulating mutant. **J Bacteriol**, Washington, v. 169, n. 1, p. 137-141, 1987.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos.** 2. ed. Campinas: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2009. 325 p.

RODRIGUEZ-NAVARRO, D.N. et al., Field assessment and genetic stability of *Sinorhizobium fredii* strain SMH12 for commercial soybean inoculants. **European Journal of Agronomy**, Amsterdam, v. 19, n. 2, p. 299-309, 2003.

ROJAS, T. D. F.; GARRIDO, R. M. F.; BONILLA, B. R. R. Standardization of a complex culture media for multiplication of C50 *Rhizobium* sp. strain. **Revista Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuarias**, Mosquera, v. 10, n. 1, p. 70-80, 2009.

ROUSSI, T. et al., Centrifugal recovery of rhizobial cells from fermented starch industry wastewater and development of stable formulation. **Industrial Biotechnology**, USA, v. 6, n. 1, p. 41-49, 2010.

SHERWOOD, M. T. Inhibition of *Rhizobium trifolii* by yeast extracts or glycine is prevented by calcium. **Journal of General Microbiology**, Great Britain, v. 71, p. 351-358, 1972.

SINGLETON, P.; KEYSER, H.; SANDE, E. Development and evaluation of liquid inoculants. In: HERRIDGE, D. (Ed.). **Inoculants and nitrogen fixation of legumes in Vietnam**. Canberra: ACIAR Proceedings, 2002. Disponível em: <<http://aciarc.gov.au/files/node/2110/pr109echapter07.pdf>>. Acesso em: 24 jun. 2011.

SKINNER, F.A.; ROUGHLEY, R.J.; CHANDLER, M.R. Effect of yeast extract concentration on viability and cell distortion in *Rhizobium* spp. **Journal of Applied Microbiology**, Malden, v. 43, p. 287-297, 1977.

SOARES, A. L. L. et al., Eficiência agrônômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões (MG). I – Caupi⁽¹⁾. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 30, p. 795-802, 2006.

SOUSA, P. M.; MOREIRA, F. M. S. Potencial econômico da inoculação de rizóbios em feijão-caupi na agricultura familiar: um estudo de caso. **Em Extensão**, Uberlândia, v. 10, n. 2, p. 37-54, 2011.

STATISTICA. Data Analysis Software System 8.0. Stat-Soft, Inc., USA, 2008. (www.statsoft.com)

STOWERS, M. D. Carbon metabolism in *Rhizobium* species. **Annual Reviews Microbiology**, Netherlands, v. 39, p. 89-108, 1985.

STOWERS, M. D.; ELKAN, G. H. Growth and nutritional characteristics of cowpea rhizobia. **Plant and Soil**, New York, v. 80, p. 191-200, 1984.
SURPIN, M. A.; MAIER, R. J. Roles of the *Bradyrhizobium japonicum* terminal oxidase complexes in microaerobic H₂-dependent growth. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, Amsterdam, v. 1364, n.1, p. 37-45, Apr. 1998.

URENHA, L.C. et al., **Produção de biomassa celular de rizóbio**. In: Hungria M, Araujo RS Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola. EMBRAPA-SPI, Brasília, 1994.

VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific, 1970. 164 p. (International Biological Programme Handbook, 15).

ZABRISKIE, D.W. et al., **Traders' guide to fermentation media formulation**. Traders Protein, Memphis, Tenn, 1980.

ZILLI, J.É. et al., Contribuição de estirpes de rizóbio para o desenvolvimento e produtividade de grãos de feijão-caupi em Roraima. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 39, n. 4, p.749-758, 2009.