CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA
587 EM CULTURA SUBMERSA

ANA CÉLIA RIBEIRO SEVERO

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área de Concentração: Microbiologia Agrícola.

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo - Brasil
Setembro - 1992

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCAP/USP

Severo, Ana Célia Ribeiro
S498c Cinética de crescimento de Bradyrhizobium japonicum
Semia 587 em cultura submersa. Piracicaba, 1992.
143p. ilus.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Bactéria fixadora de nitrogênio - Crescimento - Ci
nética 2. Inoculante - Meio de cultura 3. Inoculante - Pro
dução - Tecnologia I. Escola Superior de Agricultura Luiz
de Queiroz, Piracicaba 1994
CDD 589.95

CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA

587 EM CULTURA SUBMERSA

ANA CÉLIA RIBEIRO SEVERO
Farmacêutica Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Álvaro Augusto Teixeira Vargas

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título Mestre em Agronomia, Área de Concentração: Microbiologia Agrícola.

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo - Brasil
Setembro - 1992

À minha avó
ISABEL

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Álvaro Augusto Teixeira Vargas pela orientação e apoio.

Ao Dr. José Geraldo da Cruz Pradella pela co-orientação, dedicação e amizade.

Aos colegas do IPT Elda Sabino da Silva, Régis Norberto Carvalho, Marisa Zuccolo, Marilda Keiko Taciro e Antonio Fernando Montemor pelas contribuições técnicas

Ao Dr. Antonio Bonomi, chefe do Agrupamento de Biotecnologia do IPT, pelo apoio e incentivo.

Aos Laboratórios de Fermentações Industriais e Microbiologia Industrial do Agrupamento de Biotecnologia/Divisão de Química/Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo S.A e Laboratório de Microbiologia dos Solos do Centro de Energia Nuclear na Agricultura/Universidade de São Paulo/USP por terem possibilitado a realização deste trabalho.

Aos colegas do IPT e do CENA que de algum modo contribuíram na realização deste trabalho.

Ao CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico
e Tecnológico - Programa RHAE pela concessão da bolsa de
mestrado

S U M Á R I O

	Página
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	x
NOMENCLATURA	xv
RESUMO	xvii
SUMMARY	xix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Introdução	4
2.2. Inibidores de crescimento	5
2.2.1. Sais minerais	5
2.2.2. Inibição por nucleotídeos	7
2.3. Assimilação de nitrogênio	10
2.4. Assimilação de carbono	16
2.5. Requerimentos nutricionais específicos.....	22
2.6. Eficiência simbiótica	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1. Microorganismos	24
3.1.1. Preparo da cultura utilizada nos ensaios	25
3.2. Preparo do inóculo	25
3.3. Preparo do meio de cultura líquido	26
3.4. Inoculação do ensaio	27
3.5. Controles analíticos	27

3.5.1. Concentração celular por densidade óptica	28
3.5.2. Concentração celular pelo número de células totais	29
3.5.3. Concentração de células viáveis por unidades formadoras de colônias	30
3.5.4. Concentração de glicerol	30
3.5.5. Concentração de aminoácidos totais livres	32
3.5.6. Concentração de amônio via eletrodo	34
3.5.7. Medida de pH	35
3.5.8. Determinação de atividade da glutamina sintetase	35
3.5.9. Avaliação do potencial de fixação biológica de nitrogênio atmosférico .	37
3.5.10. Determinação dos parâmetros cinéticos	40
4. RESULTADOS	44
5. DISCUSSÃO	83
5.1. Necessidades do extrato de levedura	83
5.2. Inibição de crescimento celular	91
5.3. Fator de conversão substrato a célula	93
5.4. Substituição do extrato de levedura por aminoácidos específicos	100
5.5. Perfil de nitrogênio amoniacal e mecanismo de regulação da glutamina sintetase	102
5.6. Consumo de glicerol	107
5.7. Utilização de ácidos carboxílicos como fonte de carbono	108
5.8. Produtividade celular global	111
5.9. Eficiência simbiótica	115

6. CONCLUSÕES	118
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120
ANEXO A - Meios de cultura	136
ANEXO B - Curvas de calibração utilizadas nos ensaios	139

LISTA DE FIGURAS

Figura N°	Título	Página
2.1	Assimilação de amônia em bactéria ...	13
2.2	Via de Entner-Doudoroff para assimilação de carbono	18
2.3	Via metabólica para o catabolismo de carbono em rizóbio de crescimento rápido	19
2.4	Via metabólica para o catabolismo de carbono em rizóbio de crescimento lento	20
4.1	Resultados de crescimento celular e consumo de substratos obtidos no ENSAIO 1	47
4.2	Resultados de crescimento celular e consumo de substratos obtidos no ENSAIO 2	49
4.3	Resultados de crescimento celular e consumo de substratos obtidos no ENSAIO 3	51
4.4	Resultados de crescimento celular e consumo de substratos obtidos no ENSAIO 4	53
4.5	Resultados de crescimento celular e consumo de substratos obtidos no ENSAIO 5	55
4.6	Resultados de crescimento celular e consumo de substratos obtidos no ENSAIO 6	57

4.7	Resultados de crescimento celular e consumo de substratos obtidos no ENSAIO 7	59
4.8	Resultados de crescimento celular e consumo de substratos obtidos no ENSAIO 8	61
4.9	Resultados de crescimento celular e consumo de substratos obtidos no ENSAIO 9	63
4.10	Resultados de crescimento celular e consumo de substratos obtidos no ENSAIO 10	65
4.11	Resultados de crescimento celular e consumo de substratos obtidos no ENSAIO 11	67
4.12	Resultados de crescimento celular e consumo de substratos obtidos no ENSAIO 12	69
4.13	Resultados de crescimento celular e consumo de substratos obtidos no ENSAIO 13	71
4.14	Resultados de crescimento celular e consumo de substratos obtidos no ENSAIO 14	73
4.15	Resultados de crescimento celular e consumo de substratos obtidos no ENSAIO 15	75
4.16	Resultados de crescimento celular e consumo de substratos obtidos no ENSAIO 16	77
4.17	Resultados de crescimento celular e consumo de substratos obtidos no ENSAIO 17	79

5.1	Concentração celular com o tempo de cultivo para os ensaios 1, 2, 7 e 8 de diferentes concentrações iniciais de extrato de levedura	84
5.2	Velocidade específica do crescimento celular em função do tempo para o ensaio 2	88
5.3	Fatores de conversão substrato a célula para glicerol [S ₁] e aminoácidos totais livres [S ₂], ensaio 5 (a) e 7 (b)	97
5.4	Degradação de aminoácidos.....	99
5.5	Concentração de nitrogênio amoniacal com o tempo de cultivo para os ensaios 5, 8 e 11	105

LISTA DE TABELAS

Tabela N°	Título	Página
4.0	Resumo das condições de ensaio realizados	45
4.1	Valores de pH, de concentração celular, de unidades formadoras de colônias, de células totais, de concentração de glicerol, de aminoácidos totais livres e de amônio com o tempo de cultivo para o ENSAIO 1.....	46
4.2	Valores de pH, de concentração celular, de unidades formadoras de colônias, de células totais, de concentração de glicerol, de aminoácidos totais livres e de amônio com o tempo de cultivo para o ENSAIO 2	48
4.3	Valores de pH, de concentração celular, de unidades formadoras de colônias, de células totais, de concentração de glicerol, de aminoácidos totais livres e de amônio com o tempo de cultivo para o ENSAIO 3	50
4.4	Valores de pH, de concentração celular, de unidades formadoras de colônias, de células totais, de concentração de glicerol, de aminoácidos totais livres e de amônio com o tempo de cultivo para o ENSAIO 4	52

4.5	Valores de pH, de concentração celular, de unidades formadoras de colônias, de células totais, de concentração de glicerol, de aminoácidos totais livres e de amônio com o tempo de cultivo para o ENSAIO 5	54
4.6	Valores de pH, de concentração celular, de unidades formadoras de colônias, de células totais, de concentração de glicerol, de aminoácidos totais livres e de amônio com o tempo de cultivo para o ENSAIO 6	56
4.7	Valores de pH, de concentração celular, de unidades formadoras de colônias, de células totais, de concentração de glicerol, de aminoácidos totais livres e de amônio com o tempo de cultivo para o ENSAIO 7	58
4.8	Valores de pH, de concentração celular, de unidades formadoras de colônias, de células totais, de concentração de glicerol, de aminoácidos totais livres e de amônio com o tempo de cultivo para o ENSAIO 8	60
4.9	Valores de pH, de concentração celular, de unidades formadoras de colônias, de células totais, de concentração de glicerol, de aminoácidos totais livres e de amônio com o tempo de cultivo para o ENSAIO 9	62
4.10	Valores de pH, de concentração celular, de unidades formadoras de colônias, de células totais, de concentração de glicerol, de aminoácidos totais livres e de amônio com o tempo de cultivo para o ENSAIO 10	64

4.11	Valores de pH, de concentração celular, de unidades formadoras de colônias, de células totais, de concentração de glicerol, de aminoácidos totais livres e de amônio com o tempo de cultivo para o ENSAIO 11	66
4.12	Valores de pH, de concentração celular, de unidades formadoras de colônias, de células totais, de concentração de glicerol, de aminoácidos totais livres e de amônio com o tempo de cultivo para o ENSAIO 12	68
4.13	Valores de pH, de concentração celular, de unidades formadoras de colônias, de células totais, de concentração de glicerol, de aminoácidos totais livres e de amônio com o tempo de cultivo para o ENSAIO 13	70
4.14	Valores de pH, de concentração celular, de unidades formadoras de colônias, de células totais, de concentração de glicerol, de aminoácidos totais livres e de amônio com o tempo de cultivo para o ENSAIO 14	72
4.15	Valores de pH, de concentração celular, de unidades formadoras de colônias, de células totais, de concentração de glicerol, de aminoácidos totais livres e de amônio com o tempo de cultivo para o ENSAIO 14	74
4.16	Valores de pH, de concentração celular, de unidades formadoras de colônias, de células totais, de concentração de glicerol, de aminoácidos totais livres e de amônio com o tempo de cultivo para o ENSAIO 16	76

4.17	Valores de pH, de concentração celular, de unidades formadoras de colônias, de células totais, de concentração de glicerol, de aminoácidos totais livres e de amônio com o tempo de cultivo para o ENSAIO 17	78
4.18	Atividade específica da glutamina sintetase com o tempo de cultivo, <i>in vitro</i> , de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> SEMIA 587 em diferentes condições de ensaio	80
4.19	Nodulação e atividade de nitrogenase em soja semeada com inóculo a base de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> SEMIA 587 obtido em diferentes condições de cultivo, média de três valores	81
4.20	Valores da parte aérea de soja semeada com inóculo a base de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> SEMIA 587 obtida em diferentes condições de cultivo, média de três valores	82
5.1	Velocidade específica máxima de crescimento celular da primeira fase exponencial para as diferentes condições de ensaio.....	89
5.2	Velocidade específica máxima de crescimento celular da segunda fase exponencial para as diferentes condições de ensaio.....	90
5.3	Fatores de conversão substrato a célula na primeira fase exponencial para as diferentes condições de ensaio.....	95
5.4	Fatores de conversão substrato a células na segunda fase exponencial para as diferentes condições de ensaio.....	96

5.5	Atividade específica da glutamina sintetase, μ_{max} e nitrogênio amoniacal para os ensaio 1, 7 e 11	107
5.6	Produtividade celular global obtidas com as diferentes condições de ensaio	112

NOMENCLATURA

ADP.....	adenosina 5'difosfato
AMP.....	adenosina 5'monofosfato
cAMP.....	adenosina 5'monofosfato ciclica
Ct.....	células totais
DHAP.....	di hidroxiacetona fosfato
f,1,6 P...	frutose 1,6 difosfato
GDH.....	glutamato desidrogenase
GMP.....	guanosina 3'5' monofosfato
cGMP.....	ciclo guanosina 3'5'monofosfato
GOGAT.....	glutamato sintase
GS.....	glutamina sintetase
GSI.....	glutamina sintetase fração um
GSII.....	glutamina sintetase fração dois
GTP.....	guanosina 5'trifosfato
KDPG.....	2-ceto-3 desoxi 6-gluconato
NADP ⁺	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato forma oxidada
NADPH.....	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato forma reduzida
Prod.....	produtividade celular global (g/l.h)
r.....	coeficiente de correlação
S.....	concentração de substrato (g/l)
S ₁	concentração de glicerol (g/l)

S_a.....concentração de aminoácidos totais livres (g/l)
t.....tempo de cultivo (h)
TCA.....ciclo tricarboxílico
TCA*.....ácido tricloro acético
UFC.....unidades formadoras de colônias
v.....velocidade de crescimento celular (g/l.h)
x.....concentração celular (g/l)
 μvelocidade específica de crescimento celular
 (h⁻¹)
 μ_{max}velocidade específica máxima de crescimento
 celular (h⁻¹)

CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA
587 EM CULTURA SUBMERSA

Autora: ANA CÉLIA RIBEIRO SEVERO

Orientador: Prof. ALVARO AUGUSTO TEIXEIRA VARGAS, Ph.D

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo o estudo da cinética de crescimento celular de *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 587 em cultura submersa buscando um melhor entendimento das limitações por substrato assim como a presença de possíveis inibidores de crescimento celular.

Em uma primeira etapa realizaram-se ensaios em incubador rotativo a 30°C e 250 rpm , com oito diferentes concentrações de extrato de levedura, mantendo-se constante a fonte de carbono na forma de glicerol. Os ensaios apresentaram duas fases exponenciais sucessivas de crescimento celular, sendo que a mudança de uma fase para outra deu-se por uma abrupta diminuição da velocidade específica de crescimento celular. Os melhores resultados obtidos foram com a utilização de 8,0 g/l de extrato de levedura onde obteve-se uma velocidade específica máxima de crescimento celular de 0,050 h⁻¹

e $0,026 \text{ h}^{-1}$ na primeira e segunda fase exponencial, respectivamente.

Em uma segunda etapa realizaram-se ensaios onde o extrato de levedura foi substituído parcialmente por um aminoácido específico. Nas substituições por glutamato não foram observadas alterações no perfil de crescimento celular. A substituição em até 50% do extrato de levedura por glutamato não apresentou uma diminuição nos valores de produtividade celular global.

A análise dos parâmetros cinéticos dos ensaios realizados, permitiu identificar o extrato de levedura como substrato limitante de crescimento e também como fornecedor de esqueletos carbônicos para a célula. Ficou também demonstrado uma inibição de crescimento celular para as condições testadas. Possivelmente uma inibição por polissacarídeos hidrossolúveis sintetizados pelo microorganismo.

GROWTH KINETICS OF *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 587 IN SUBMERGED CULTURE

Autora: ANA CÉLIA RIBEIRO SEVERO

Orientador: Prof. ALVARO AUGUSTO TEIXEIRA VARGAS, Ph.D

SUMMARY

The main objective of this work was to study the kinetics characteristics in the growth of *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 587 in submerged culture, search for substract limitation or possible inhibition during growth.

First a series of shaker cultures were carried out at 30 °C and 250 rpm using eight yeast extract concentration and glycerol as carbon source. The growth of *Bradyrhizobium japonicum* showed two exponential growth phases with a decrease in the cell growth rate in the second phase. The best results were obtained employging 8.0 g/l of yeast extract with a maximum specific growth rate of 0.050 h⁻¹ and 0.026 h⁻¹ for the first and second phase, respectively.

In a second stage, the yeast extract was replaced by specific aminoacid. With glutamate There was no differences on celular growth. Fifty percent (w/w) of yeast extract replaced by glutamate. The replacement of glutamate did not decrease cell mass productivity.

The kinetics parameters analyse allowed to identify yeast extract as limiting growth substract and as carbon skeleton supply. It was observed a inhibitory effect on growth during test condition, probably by water-solubre polysaccharides.

1. INTRODUÇÃO

A disponibilidade de nitrogênio em forma utilizável é pré requisito para o crescimento das plantas. Em condições de agricultura intensa, o nitrogênio é o principal fator limitante de produtividade o que torna necessário, na maioria das vezes, a introdução do mesmo no ecossistema, (SCHUBERT, 1982).

Gêneros bacterianos da família *Rhizobiaceae* são distinguidos pela sua habilidade em infectar plantas superiores. No caso de espécies dos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* este processo de infecção conduz a uma relação simbiótica onde a fixação do nitrogênio atmosférico ocorre em nódulos desenvolvidos nas raízes das plantas hospedeiras, família *Leguminosae*.

A fixação biológica é responsável por 69 % do total de nitrogênio mundialmente utilizado pelas plantas, enquanto os fertilizantes nitrogenados contribuem com apenas 15 % (SCHUBERT, 1982).

A inoculação de sementes de leguminosas com cultura artificial de rizóbio foi iniciada em 1896 e hoje é prática comum em vários países, (HOUGHLEY & PULSFORD, 1982).

A produção brasileira de inoculantes atualmente está em torno de 3000 toneladas por ano sendo constituída basicamente por estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* aplicado no plantio de soja (*Glicine max*). Essa inoculação artificial proporciona uma economia em fertilizantes nitrogenados da ordem de 1 bilhão de dólares por ano, (SIQUEIRA & FRANCO, 1989).

A tecnologia de produção de inoculantes atualmente disponível no Brasil carece de estudos relacionados à constituição do meio de cultura, condições de agitação e aeração, tipos de processos fermentativos, cinética de crescimento, veiculação, entre outros.

Os meios de cultura tradicionalmente utilizados no cultivo de rizóbio têm o extrato ou água de levedura como uma das fontes de nitrogênio e de fatores de crescimento. O grupo de Biotecnologia do Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo-IPT, desde 1985, vem desenvolvendo pesquisas visando a otimização do cultivo de *Bradyrhizobium japonicum*. Os resultados recentemente obtidos indicam a possibilidade de se obter produtividades e rendimentos maiores que os obtidos com os meios de cultura convencionais. Um estudo mais detalhado

da cinética de crescimento celular que contemple as várias fases de crescimento apresentadas pelo rizóbio, em função dos substratos disponíveis, é de fundamental importância para o estudo de outras alternativas de produção da bactéria como fermentação contínua e descontínua alimentada.

Este trabalho teve por objetivo a identificação de substratos limitantes, assim como verificar a existência de possíveis inibidores de crescimento celular.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - Introdução

A cinética de crescimento de *Bradyrhizobium japonicum* em cultura submersa vem sendo estudada, ao longo dos anos, visando a otimização da produção do microorganismo *in vitro*. Em ensaios realizados (BONOMI, 1986) com meio de cultura proposto por BALLATI & MAZZA (1978), meio frequentemente empregado pela indústria de inoculantes brasileira, foram observadas 3 fases de crescimento. Duas fases exponenciais com velocidade específica máxima de crescimento de 0,060 e 0,030 h^{-1} , respectivamente, seguida de uma fase linear com velocidade em torno de 0,030 g célula. $\text{l}^{-1}\text{h}^{-1}$. Os cultivos realizados sempre apresentaram um fator de conversão de glicerol a célula, substrato considerado como a principal fonte de carbono do meio de cultura, da ordem de 1,0 a 2,0 gramas de células por grama de glicerol consumido para as fases exponenciais, e da ordem de 0,4 a

0,5 gramas de células por grama de glicerol para a fase linear. Esses resultados levantaram dúvidas quanto a utilização de glicerol como única fonte de carbono. Além disso, a não continuidade da primeira fase exponencial de crescimento enquanto as concentrações de glicerol e de nitrogênio total ainda se mantinham em níveis elevados, indicavam a possível presença de algum inibidor de crescimento bacteriano. Trabalhos como os de MAZZA & BALLATI (1976), já tinham mostrado a presença de fases de crescimento exponenciais sucessivas no cultivo de *Bradyrhizobium japonicum* em meio de cultura complexo não levantando, no entanto, qualquer hipótese a respeito dos resultados obtidos.

2.2 - Inibidores de Crescimento

2.2.1 - Sais minerais

O efeito deletério ao crescimento de rizóbio devido à toxidez de íons minerais já foi estudada sob diferentes aspectos. Segundo SHERWOOD (1972) a toxidez atribuída ao extrato de levedura quando de sua utilização em cultivo (STRIJDON & ALLEN, 1966; BEARDSLEY, 1962; EISENSTADT et alii, 1959) pode ser devido à presença de espécies químicas resultantes da interação entre

aminoácidos do extrato de levedura e cátions monovalentes. Seus trabalhos demonstraram que o aminoácido glicina ligado ao íon sódio se comportava como um expressivo inibidor de crescimento de *Rhizobium trifolii*. Foi também observado que esse efeito tóxico podia ser eliminado acrescentando-se cálcio ao meio de cultivo.

ELSHEIKH & WOOD (1989b) detectaram graus de inibição variada para diferentes sais minerais. O crescimento de rizóbio foi inibido por sais como NaCl, MgCl₂, e KCl nas concentrações 0,25, 0,12, 0,10 molar respectivamente. Para MgSO₄ a inibição foi detectada em concentrações inferiores a 0,14 molar.

BOTSFORD (1984) encontrou evidências de que certos íons, em especial HCO₃⁻, são mais tóxicos que outros. Esse íon em particular pode estar relacionado aos níveis de pH da cultura exercendo assim influência no crescimento bacteriano. ELSHEIKH & WOOD (1989a) testaram diferentes fontes de carbono para estirpes de crescimento rápido e de crescimento lento e concluíram ser a assimilação, de uma ou outra fonte, afetada pela salinidade do meio de cultura. Segundo GREENWAY & MUNNS, (1980); YANCY et alii (1982), o efeito inibidor de alguns íons minerais pode ser devido a sua interferência na atividade de enzimas especificamente envolvidas na metabolização de substratos.

O acúmulo de produtos intracelulares como

glutamato pode ser induzido em células sob estresse salino, (CHUA et alii, 1982). Esses produtos acumulados teriam como função proteger as células dos efeitos deletérios originados pelos sais. Altas concentrações desses endoprodutos, no entanto, inibiriam a atividade enzimática, (CHUA et alii, 1986). BOTSFORD & LEWIS (1990), mostraram que *Rhizobium meliloti* sob estresse osmótico provocado por sódio, sacarose ou polietilenoglicol, acumulou glutamato e potássio. Para SADOWSKY et alii, (1983) diferentes respostas à mesma concentração de sal podem ocorrer em meios de cultura de diferentes composições. BOTSFORD & LEWIS (1990), não observaram tais diferenças de comportamento por mudanças nas fontes de carbono e nitrogênio ou adição de aminoácidos como isoleucina, glutamina, prolina e arginina no meio.

2.2.2 - Inibição por nucleotídeos

Ciclo guanosina 3'5'monofosfato (cGMP) e ciclo adenosina monofosfato (cAMP) são dois importantes nucleotídeos cuja função biológica ainda não é bem conhecida. Essas moléculas são encontradas em células procarióticas e eucarióticas e desempenham diferentes funções (AMRHEIN, 1978; GOLDBERG, 1977). Nos vários gêneros de bactérias onde esses dois nucleotídeos já foram

identificados, o foram em concentrações diminutas sendo que o cGMP em níveis ainda inferiores ao cAMP (BERNLOHR & HADDOK, 1974).

BOLSFORD (1985), em extensa revisão observou que o cGMP poderia regular a síntese de moléculas específicas como DNA, RNA e proteínas. Para CALCOT (1982), esses nucleotídeos estão envolvidos no controle de transcrição das enzimas do metabolismo de carbono e nitrogênio. Em se tratando de *Bradyrhizobium japonicum* os relatos existentes a respeito da função desses nucleotídeos no microorganismo são um tanto quanto contraditórios. LIN & SCOTT (1979), não observaram inibição de crescimento quando da utilização de cGMP exógeno no cultivo dessa bactéria. Por outro lado, estes autores constatarem a inibição da expressão da nitrogenase, enzima responsável pela fixação do nitrogênio atmosférico. JONES et alii (1985), em seus trabalhos, não constatarem efeito específico de cGMP na síntese de nitrogenase porém, ficou caracterizada uma inibição de crescimento bacteriano. A presença do nucleotídeo no meio de cultivo ocasionou uma inibição tardia no crescimento fazendo com que a cultura saísse de uma fase exponencial com velocidade específica de crescimento em torno de $0,070 \text{ h}^{-1}$ para uma fase linear mais vagarosa e dependente do inibidor adicionado. Essa inibição ocorreu independentemente das fontes de carbono e nitrogênio

utilizadas. Também não foram constatadas diferenças significativas no grau de inibição em função de um ou outro substrato.

Quanto ao cAMP, este pode estar envolvido em mecanismos de repressão catabólica (ULLMANN, 1980). A síntese de enzimas envolvidas nos mecanismos de repressão catabólica teriam a sua transcrição regulada complexamente por cAMP. As concentrações intracelulares de cAMP, determinadas em última instância pelas fontes de carbono disponíveis para as células, induziram os operons responsáveis pela iniciação da transcrição dessas enzimas (BOTSFORD, 1985). Em *Bradyrhizobium japonicum* cAMP está relacionado com o mecanismo que regula a utilização de hidrogênio quando cultivado em diferentes fontes de carbono (LIM & SHANMUGAM, 1979). Em cultivos onde a tomada de hidrogênio foi inibida devido a utilização de malato como fonte de carbono, a adição de cAMP em concentrações na faixa de 1mM reverteu o processo estimulando o crescimento. Por outro lado LIM & SHANMUGAM (1979) constataram altos níveis de cAMP quando cultivaram *Bradyrhizobium japonicum* utilizando glutamato como fonte de carbono e nitrogênio. UPCHURCH & ELKAN (1978), observaram acentuada inibição das enzimas assimilatórias de NH_4^+ quando cAMP foi adicionado ao meio de cultivo de *Bradyrhizobium japonicum*.

2.3 - Assimilação de Nitrogênio

Muitos meios de cultura já foram propostos para o crescimento de rizóbio em grande escala (ROUGHLEY, 1970; BURTON, 1979; GULATI, 1979; BALLATI, 1985). Esses meios de cultura geralmente incluem sais minerais, manitol, sacarose ou glicerol como fonte de carbono, extrato ou água de levedura como fonte de nitrogênio e fatores de crescimento. Água de levedura, macerado de milho ou hidrolisado de caseína são algumas das opções utilizadas em substituição ao extrato de levedura. Resíduo industrial de maltaria é indicado por BOIARDI & ERTOLA (1986) como componente de meio de cultivo de rizóbio, em escala industrial, por conter fatores de crescimento e fontes de nitrogênio com a vantagem de ser de baixo custo.

PRADELLA et alii (1989), acrescentaram glutamato monossódico, grau alimentício, ao meio de cultura e verificaram sensível melhora no crescimento de *Bradyrhizobium japonicum* cultivado em batelada. Essa melhora refletiu-se em um prolongamento da primeira fase exponencial mantendo a velocidade específica de crescimento em torno de $0,050 \text{ h}^{-1}$.

Glutamato é um intermediário na síntese de glutamina, componente chave de todas as células vivas. O nitrogênio amídico da glutamina pode ser utilizado na síntese de importantes moléculas como

glicosamina-6-fosfato e histidina assim como também faz parte das reações biossintéticas dos anéis de purina e vários outros compostos biológicos significativos (SHU & SHULLER, 1989).

LUDWIG (1978) cultivou *Rhizobium* 32H1 em meio líquido e constatou a preferência do microorganismo por nitrogênio orgânico como L-glutamato. Segundo POLLE et alii (1985b), aminoácidos encontrados em altas concentrações nos nódulos de leguminosas hospedeiras de rizóbio podem ser utilizados como fonte de nitrogênio e carbono.

As formas preferenciais de nitrogênio do rizóbio, até o momento, ainda não estão bem definidas. Alguns autores relatam que o rizóbio cultivado *in vitro* tem acentuada preferência por formas de nitrogênio orgânico como L-glutamato em lugar de amônia (TUBB, 1976; LUDWIG, 1978). Outros como BROWN & DILWORTH (1975) afirmam ter resultados comprovando maior crescimento de rizóbio em meios de cultura cuja fonte de nitrogênio utilizada foi a amônia. O'GARA & SHANMUGAM (1976a) concluíram com seus estudos que o rizóbio é capaz de assimilar NH_4^+ para o crescimento apenas quando suplementado com fontes de nitrogênio orgânico como L-aspartato, L-leucina e L-serina. A adição de L-glutamato, ao contrário, bloqueou a utilização de NH_4^+ .

O metabolismo de nitrogênio pode ser

dividido em duas classes: uma via assimilatória necessária para a utilização de nitrogênio proveniente de compostos disponíveis no meio e uma via biossintética que leva a produção de compostos celulares que contêm nitrogênio (TYLER, 1978). A FIGURA 2.1 mostra, simplificada, a via de assimilação de amônia em bactérias entéricas para a produção de glutamato e glutamina assim como alguns dos papéis desses compostos no metabolismo intermediário.

Segundo TYLER, 1978 a ordem preferencial de assimilação de compostos de nitrogênio em procariotos é amônia seguida por uma grande variedade de compostos orgânicos, nitrato e nitrogênio molecular. Essa assimilação é regulada complexamente e pode, em termos didáticos, ser dividida em duas classes:

- a) regulação mediada pela glutamina sintetase (L-glutamato:amônia ligase, EC 6.3.1.2)
- b) regulação independente da glutamina sintetase

A primeira classe é considerada a mais crítica, isso porque a atividade dessa enzima envolve mecanismos regulatórios complexos e diferentes entre si. Entre os mecanismos reguladores até agora estudados podemos citar:

- interconversão de formas inativa/ativa em resposta à variação na concentração de cátions divalentes como Mg^{2+} e Mn^{2+} ;

- inibição tipo *feed back* devido ao acúmulo de vários endoprodutos do metabolismo de glutamina e alteração covalente da enzima devido a adenilação reversível do resíduo tirosil de cada subunidade.

Os principais metabólitos inibidores da enzima até agora detectados são: *p*-aminobenzoato, carbamil fosfato, triptofano, histidina, cGMP e cAMP, glicina e alanina. Excesso de NH_4^+ pode levar a uma menor atividade biossintética na medida em que favorece uma maior adenilação da enzima.

Outra enzima que cataliza a transferência de grupos amida da glutamina em várias reações biossintéticas é a glutamato sintase (L-glutamato: NADP^+ oxido redutase, EC 1.4.13). Pouco é conhecido sobre a regulação da glutamato sintase (GOGAT), (Gln-oxoglutarato, aminotransferase, EC 2.6.1.53).

Quando existe uma grande quantidade de nitrogênio orgânico no meio de cultura, glutamato desidrogenase, (GDH) ou (L-glutamato: NADP^+ oxidoreductase, EC 1.4.1.4 é provavelmente a enzima chave na assimilação de íons amônio (SHU & SHULLER, 1989). A regulação dessa enzima é realizada por Zn^{2+} , ADP, NAD^+ , GTP e muitos outros efetores (LENINGHER, 1989).

Principais reações envolvidas no metabolismo de nitrogênio:

É geralmente aceito que assimilação de amônia por rizóbio ocorre através da via glutamina sintetase (GS) --- glutamato sintase (GOGAT), (OSBURN & SIGNER, 1980; LUDIWIG, 1978; KEISTER et alii, 1987). Ao contrário de outras bactérias, rizóbio possui duas formas de glutamina sintetase. A GSI, comum a todos os outros procariotos e a GSII, de menor peso molecular e mais sensível a temperatura. Esse fato torna ainda mais complexo o estudo da assimilação de amônia por esse microorganismo. Trabalhos realizados com *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* (BRAVO & MORA, 19889) demonstraram que a GSI é regulada com base na cinética de crescimento e na quantidade de esqueletos carbônicos como

α -cetoglutarato e metabólitos de nitrogênio, como a glutamina. A GSII foi inativada por elevadas concentrações de amônia e a inativação não foi diminuída quando os microorganismos foram transferidos para outro meio de cultura contendo glutamato.

Estirpes mutantes de *Rizobium* e *Bradyrhizobium* GSI⁺ e GSII⁻ quando estudadas, mostraram ser a GSI inteiramente responsável pelo suprimento de glutamina na célula. Para *Bradyrhizobium japonicum* 61A76 foi constatado através de estudos cinéticos que ambas as formas, GSI e GSII são responsáveis pela síntese de glutamina nas células (BRAVO & MORA, 1988).

Rizóbio pode também crescer em meio heterotrófico contendo nitrato de amônio duas diferentes formas de nitrogênio inorgânico. Essas diferenças preferenciais em relação a forma de nitrogênio pode estar relacionada ao fato de diferentes estirpes diferirem em seus requerimentos nutricionais (DALTON, 1980).

2.4 - Assimilação de Carbono

Rizóbio é descrito como uma bactéria quimiorganotrófica e portanto dependente de compostos orgânicos para sua constituição e obtenção de energia. O catabolismo de carbono via Entner-Doudoroff (ED) foi

encontrado em todas as espécies do gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, até agora estudados (GLENN et alii, 1984; KEELE et alii, 1970). Quanto a via Embden-Meyerhof-Parnas e Pentose fosfato (PP), os resultados até agora obtidos demonstram baixos níveis ou nenhuma atividade das principais enzimas dessas vias para a grande maioria das espécies.

Em se tratando do ciclo tricarboxílico (TCA) já está bem caracterizada sua presença nesse grupo de bactérias (STOWERS & ELKAN, 1983). Sua função como em outras bactérias heterotróficas é a de fornecer NADH_2 para a cadeia respiratória e precursores na biossíntese de constituintes celulares.

A FIGURA 2.2 apresenta de forma simplificada a via de assimilação de carbono Entner-Doudoroff segundo ARMAUD & GUIRAUD (1985).

PARKE & ORNSTON (1984) observaram diferentes comportamentos, em relação a utilização de fontes de carbono, entre rizóbio de crescimento rápido (como *Rhizobium trifolii*, *Rhizobium meliloti* e *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*) e rizóbio de crescimento lento (como *Bradyrhizobium japonicum*). Os de crescimento lento são mais restritos quanto a assimilação de carbono. Eles são incapazes de utilizar dissacarídeos, trissacarídeos e ácidos orgânicos, (STOWERS, 1985). Em contradição ao exposto por STOWERS (1985), TULLY (1985) encontrou as

Figura 2.2: via de Entner-Doudoroff (ARMAUD & GUIRAUD, 1985)

maiores velocidades de crescimento para *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 cultivando-o em meio com ácidos orgânicos intermediários do ciclo tricarboxílico como α -cetoglutarato, succinato e L-malato.

A fonte de carbono mais utilizada no cultivo de rizóbio é o glicerol, embora diferentes espécies apresentem diferentes velocidades de crescimento quando de sua utilização (ARIAS & MARTINEZ-DE DRETES, 1976). A assimilação de glicerol assim como outros álcoois de dá por difusão facilitada. Segundo LIN (1976), a afinidade dessas substâncias pela bicamada fosfolipídica das membranas celulares é que permite a entrada do álcool nas células bacterianas dessa maneira.

O metabolismo de glicerol ocorre via glicerol quinase (EC 2.7.1.30) e glicerol desidrogenase (EC 1.1.1.8). As FIGURAS 2.3 e 2.4, propostas por STOWERS (1985), apresentam respectivamente as vias metabólicas para o catabolismo de diferentes fontes de carbono em rizóbio de crescimento lento e crescimento rápido.

Para DE VRIS (1982) o transporte de glicerol em rizóbio é regulado por repressão catabólica. Essa afirmação vai de encontro às colocadas por BOTSFORD (1981) que relaciona o efeito repressor do AMPc sobre as enzimas envolvidas no catabolismo de fontes de carbono e nitrogênio.

Figura 2.3: via metabólica para o catabolismo de carbono em rizóbio de crescimento rápido, (STOWERS 1985).

Figura 2.4: via metabólica para o catabolismo de carbono em rizóbio de crescimento lento. (STOWERS, 1985).

2.5 - Requerimentos Nutricionais Específicos

Quanto aos requerimentos nutricionais específicos como vitaminas e fatores de crescimento, bradyrizóbio, ao contrário de rizóbio, é pouco exigente. Para DALTON (1980) diferentes estirpes podem diferir em seus requerimentos nutricionais podendo exigir aminoácidos e/ou vitaminas como nutrientes complementares. Segundo STOWERS & EAGLESHAN (1984) entre várias estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* apenas uma respondeu favoravelmente ao incremento de vitaminas quando crescido em meio com manitol e glutamato como fonte de carbono e nitrogênio. Quanto a estirpe 587 em estudo é algo a ser esclarecido.

2.6 - Eficiência Simbiótica

A eficiência simbiótica é o objetivo final de quem cultiva rizóbio *in vitro*. Trabalhos como os de SKINNER et alii (1977) e STRIDJON & ALLEN (1966) relatam a ocorrência de variação na eficiência de fixação de nitrogênio atmosférico em função do meio utilizado no cultivo das células.

RAO, (1982) constatou diminuição na atividade da nitrogenase de *Bradyrhizobium japonicum* 61A76, USDA e *Rhizobium* sp 32H1. A enzima foi reprimida em

função da concentração de amônia, alguns aminoácidos e complexos como casaaminoácidos e extrato de levedura.

RAMASWAMY & BAL, (1986); REDING & LEPO (1989) observaram alterações na morfologia das células em função da fonte de carbono utilizada. Meios suplementados com succinato e arabinose resultaram em indução e aumento de atividade da nitrogenase em bacteróides de *Bradyrhizobium* sp 32H1.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram realizados 17 ensaios de cultivo do microorganismo *in vitro*, onde variou-se as concentrações de extrato de levedura assim como, a substituição de parte desse extrato por aminoácidos específicos como valina e glutamato. Realizou-se também um experimento em casa de vegetação onde o inóculo utilizado foi obtido em diferentes condições de cultivo do microorganismos.

3.1 - Microorganismo

O microorganismo utilizado nos ensaios foi o *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 587.

A cultura foi fornecida na forma liofilizada pelo Microbiological Resources Center (MIRCEN) - Rio Grande do Sul - Brasil ao Banco de Cepas do Laboratório de Microbiologia Industrial - Agrupamento de Biotecnologia do Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo S.A-IPT. Nesse laboratório o liofilizado foi reativado, propagado e avaliado quanto a pureza e efetividade na

fixação de nitrogênio atmosférico. Após esses testes a cultura foi novamente liofilizada e armazenada em geladeira.

3.1.1 - Preparo da cultura utilizada nos ensaios

* Reativação

O liofilizado foi ressuspense em 0,5ml de solução salina isotônica (NaCl 0,85%) e transferido para erlenmeyer de 125 ml de capacidade contendo 50ml de meio líquido. O meio utilizado foi o sugerido por MAZZA & BALATTI (1976). A cultura foi incubada em agitador rotativo (Controlled Environment Incubation Shaker) a 30°C e 250 rpm (rotações por minuto) por um período de 5 dias.

Após essa reativação a cultura foi propagada em meio sólido inclinado (ANEXO A.I). Os frascos foram incubados em estufa bacteriológica a 30°C por 8 dias. Decorrido esse período a cultura foi utilizada no preparo dos inóculos ou guardada em geladeira para utilização posterior.

3.2 - Preparo do Inóculo

As células cultivadas em meio sólido contidas em dois frascos foram ressuspensas em 10ml de

solução salina (NaCl 0,85%) e transferidas para um erlenmeyer de 1000ml contendo 200ml de meio líquido. A cultura foi incubada em agitador rotativo a 30°C e 250 rpm por 5 dias. Após essa incubação avaliou-se a concentração celular por densidade óptica, expressa em gramas por litro através de uma curva de calibração previamente construída (descrita em detalhes no item 3.5.1).

Conhecida a concentração celular inoculou-se erlenmeyer de 1000ml contendo 200ml de meio de cultura líquida com um volume de cultura bacteriana tal que a concentração celular inicial em cada frasco estivesse entre 0,2 e 0,3 g/l. Os erlenmeyers foram incubados nas condições acima citada. Após 60 horas de incubação essa cultura foi utilizada na inoculação dos frascos do ensaio.

Essa metodologia foi assim estabelecida para garantir que os frascos dos ensaios fossem inoculados com células em um mesmo estágio fisiológico, predominantemente, células na fase exponencial de crescimento.

Em todas as etapas de repique, em meio sólido ou líquido, foi realizado o controle de pureza da cultura através de coloração de gram (*Bradyrhizobium japonicum* é gram negativo) e observação da forma e tempo de surgimento de colônias (4 a 5 dias de incubação) formadas por repique em meio sólido.

3.3 - Preparo do Meio para Cultura Líquida

O meio de cultura empregado em todos os ensaios foi constituído por sais sugerido por MAZZA & BALATTI (1976) (ANEXO A.II) mais os seguintes substratos: glicerol (Analítica) 5,0 e 10,0 g/l, extrato de levedura (Difco) em concentrações variando de 0,0 g/l a 10,0g/l, glutamato monossódico (Ajinomoto) de 0,0g/l a 7,5g/l, L-valina (Sigma) 0,0 g/l a 4,0 g/l, α -cetoglutarato dissódico (Sigma) 0,0g/l e 2,5g/l e Succinato dissódico hexaidratado (Sigma) 0,0g/l e 4,5g/l.

O pH inicial de todos os meios de cultura foi acertado em 6,8 com ácido clorídrico ou hidróxido de sódio 0,1N.

Os meios de cultura foram distribuídos em erlenmeyers de 250ml de volume, 50ml de meio por frasco, e esterilizados em autoclave a 1,1 atmosfera de pressão e 121°C por 30 minutos.

3.4 - Inoculação do ensaio

As células cultivadas por 60 horas, como descrito acima, foram lavadas em solução salina isotônica e ressuspensas a um volume tal que inoculando-se de 5,0 a 6,0ml desse caldo, a concentração inicial de células em cada frasco de 50ml estivesse em torno de 0,3g/l.

3.5 - Controles Analíticos

O acompanhamento dos ensaios foi feito

através de amostragens realizadas periodicamente, a cada 4 horas até 48 horas de cultivo e a cada 8 horas de 48 até o final do cultivo. A cada amostragem duas aliquotas, uma de 25,0 e outra de 20,0 ml foram centrifugadas (Sorval-RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge) a 5°C, 11,000g por 10 minutos. O precipitado de uma das aliquotas foi utilizado para determinação da concentração celular e o sobrenadante das duas aliquotas guardado em geladeira para posterior determinação de glicerol, aminoácidos totais livres e amônio. A cada 8 horas foi também retirado 1,0ml de cultura para determinação do número de células total e a cada 24 horas 1,0ml para determinação de células viáveis.

Para algumas condições de ensaio foram realizadas determinações de atividade enzimática intracelular no microorganismo cultivado *in vitro* (glutamina sintetase) e avaliação do potencial de fixação biológica de nitrogênio atmosférico em soja cultivada em casa de vegetação.

3.5.1 - Concentração celular por densidade óptica

O precipitado resultante da centrifugação de 25,0ml de cultura bacteriana foi ressuspenso com água destilada em balão volumétrico e a transmitância da solução resultante lida em espectrofotômetro (Pelkin-Elmer-Coleman 295) a 610nm contra um branco

constituído de água destilada. A concentração celular foi calculada segundo uma curva de calibração previamente estabelecida.

* Curva de calibração utilizada nos ensaios para determinação de massa seca -

Centrifugaram-se duas alíquotas de 20,0ml de caldo bacteriano (cultivado por 70 horas em meio de cultura descrito no item 3.1.1) a 5°C, 11,000g por 10 minutos. Com o material sedimentado em um dos tubos fez-se a determinação de massa seca por filtração em membrana Millipore 0,22 micra e posterior secagem em estufa a 105°C até peso constante.

Com o material do outro tubo fez-se a ressuspensão com água destilada e sucessivas diluições sempre utilizando-se de pipetas e balões volumétricos. Mediu-se a porcentagem de transmitância a 610nm de todas as diluições e relacionou-se com a concentração celular obtida por massa seca. Obteve-se assim uma curva de calibração utilizada em todos os ensaios, (ANEXO B.I).

3.5.2 - Concentração celular pelo número de células totais

O número de células totais foi determinado segundo SOMASEGARAN & HODBEN (1985), com as seguintes modificações:

- a amostra de 1,0ml de cultura foi diluída 10 vezes em solução de clorofórmio a 10% em água;
- a cultura diluída foi fervida por 30 minutos, resfriada e adequadamente diluída para as contagens em câmara.

Esse tratamento foi realizado com o objetivo de diminuir a motilidade do microorganismo e assim facilitar as leituras ao microscópio óptico, visto que a câmara utilizada para leitura foi a de Neubauer.

3.5.3 - Concentração de células viáveis por unidades formadoras de colônias

O número de células viáveis foi determinado pelo método das gotas como descrito por SOMASEGARAN & HODDEN (1985).

As amostras de 1,0ml coletadas a cada 24 horas, foram diluídas sucessivamente em solução salina (NaCl 0,85%) e gotejadas em placas de petri contendo meio de cultura semelhante ao do referido ensaio acrescido de 15g/l de agar. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 30°C por 6 dias.

3.5.4 - Concentração de Glicerol

O método, (AOCS 1982) constitui-se na

determinação de glicerol por oxidação com periodato de sódio. É aplicável na determinação de glicerol ou poliálcoois contendo três ou mais grupos hidroxila adjacentes. O glicerol reage com periodato de sódio em solução ácida formando aldeído e ácido fórmico. O ácido fórmico é titulado com hidróxido de sódio e corresponde a concentração de glicerol na amostra.

*** Reagentes**

- solução de periodato de sódio: 60g de NaIO_4 dissolvido em água destilada acrescido 120ml de H_2SO_4 0,1N e com posterior diluição a 1 litro;
- solução NaOH aproximadamente 0,125N, padronizada com biftalato de potássio (fenolftaleína como indicador);
- solução NaOH aproximadamente 0,05N;
- solução H_2SO_4 aproximadamente 0,2N;
- solução etilenoglicol 50% em água destilada.

*** Procedimento analítico**

- pesou-se a amostra (sobrenadante do centrifugado) em béquer pequeno conforme a tabela a seguir:

concentração esperada de glicerol (g)	massa de amostra (g)
8 a 10	5
5 a 8	10
2 a 5	15
menor que 2	20

- transferiu-se a amostra para béquer de 250 ml, lavando o béquer de pesagem com água destilada algumas vezes;
- adicionou-se H_2SO_4 0,2N até que o pH atingisse valor igual ou inferior a 3,0;
- adicionou-se NaOH 0,05N até que o pH atingisse o valor $8,1 \pm 0,1$;
- preparou-se um branco contendo 50ml de água destilada e procedeu-se o mesmo ajuste de pH da amostra;
- adicionou-se 10ml de solução de periodato de sódio, homogeneizou-se o conteúdo, cobriu-se com vidro de relógio e colocou-se em repouso por 30 minutos no escuro a temperatura ambiente, nunca superior a 35°C ;
- adicionou-se 2,0ml de solução etilenoglicol 50% e deixou-se em repouso por 20 minutos;
- diluiu-se a aproximadamente 100ml e titulou-se com NaOH 0,125N, utilizando-se medidor de pH. pH $6,5 \pm 0,1$ para o branco e pH $8,1 \pm 0,1$ para a amostra.

$$\text{Cálculo: \% glicerol} = \frac{(V_a - V_b) \cdot N \cdot 9.2095}{m}$$

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

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

N = normalidade do NaOH

m = massa de amostra (g)

3.5.5 - Concentração de Aminoácidos Totais Livres

A concentração de aminoácidos totais livres

foi determinada segundo metodologia fornecida pela Ajinomoto do Brasil. O método constitui-se numa adaptação do método de determinação de proteína por biureto (GORNAL et alii, 1949) e tem se mostrado adequado na determinação de aminoácidos totais livres em processos fermentativos cujo meio utilizado é constituído por extrato de levedura e/ou glutamato monossódico.

* Reagentes:

-solução A: diluir 20g de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (borato de sódio) mais 60g de cloreto de sódio em água destilada e completar a 1000ml em balão volumétrico.

-solução B: diluir 20g de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (cloreto de cobre) em água destilada e completar o volume em balão volumétrico de 100ml.

* Procedimento analítico

-pipetou-se 4,5ml de solução A em tubo de ensaio;

-pipetou-se 15,0ml de amostra, (sobrenadante do centrifugado) sobre a solução A;

-agitou-se o tubo energeticamente por 30 segundos;

-pipetou-se 0,2ml da solução B;

-agitou-se o tubo energeticamente por 30 segundos;

-descansou-se o tubo por 10 minutos

-filtrou-se o conteúdo em papel de filtração lenta;

-mediu-se a transmitância do filtrado a 655nm;

-verificou-se a concentração de aminoácidos totais em uma curva de calibração previamente determinada, (ANEXO B.II).

3.5.6 - Concentração de amônio via eletrodo específico

O método permite a determinação de nitrogênio na forma de amônio via eletrodo específico (Orion Ammonia gas - Sensing Electrode Model 95-12) através da conversão de amônio a amônia.

Esse eletrodo é constituído por uma membrana hidrofóbica gás permeável que separa a solução de amostra da sua solução interna. A amônia dissolvida na amostra difunde-se através da membrana até que as pressões parciais do lado interno e externo à membrana se igualem. A pressão parcial de amônia será proporcional à concentração presente na amostra.

* Preparo das amostras

Foram preparadas curvas de calibração com soluções padrão de sulfato de amônio em diferentes concentrações a cada lote de amostras analisadas.

Amostras e soluções padrão foram analisadas sempre a temperatura ambiente.

* Procedimento analítico

-adicionou-se 0.2ml de solução NaOH 10N em 20.0ml de amostra (sobrenadante do centrifugado) ou solução padrão, no momento da leitura. Com esse procedimento o amônio presente na solução passa para a forma de amônia sendo então determinado.

- amostras e padrões foram agitados com agitador magnético
- realizou-se as leituras no condutivímetro, em milivolt, a cada 30 segundos até que a corrente se estabilizasse.
- o eletrodo foi lavado com água destilada entre as medidas de uma amostra e outra e posteriormente colocado em uma solução de descanso (solução padrão 10 ppm).
- a concentração de amônio foi calculada segundo a curva de calibração obtida com as soluções padrão (ANEXO B.III).

3.5.7 - Medida de pH

As determinações de pH foram realizadas em potenciômetro (Orion-Digital Ionalyzer) com eletrodo de vidro diretamente mergulhado na cultura bacteriana.

3.5.8 - Determinação de atividade da glutamina sintetase

A atividade da glutamina sintetase foi determinada em extrato celular, sem distinção entre a GSI e GSII.

* Preparação do extrato celular

O extrato celular foi preparado como sugerido por SHAPIRO & STADTMAN (1970). As células

cultivadas nas condições de ensaio foram centrifugadas, congeladas imediatamente em nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas em freezer a -20°C até o momento de determinação. As células congeladas foram recondicionadas a temperatura ambiente sendo ressuspensas em tampão (HEPES-50mM, Ditiotreitól-5mM, EDTA-0.25mM 1:1:1) a uma concentração celular aproximadamente de 30g de células por 100ml de tampão. Para romper as células utilizou-se um sonicador (Ultratip- Labsonic System) a 100HZ por 15 minutos. A concentração proteica do extrato foi determinada segundo LOWRY (1951).

* Determinação da atividade enzimática

O método utilizado foi o *in vitro* de FARNDEN & ROBERTSON (1980). Adicionou-se em tubo de ensaio os reagentes na seguinte sequência:

-0,2ml de tampão TRIS-HCl-250mM pH 7,0;

-0,2ml de glutamato 50mM;

-0,2ml de ATP 30mM pH 7,0;

-0,2ml de $\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 500mM;

-0,2 ml de solução hidroxilamina NH_2OH -1M +NaOH-0.1M na proporção 1:1);

-0,5ml de extrato celular;

-Agitou-se muito bem os tubos e colocou-se em banho a 30°C por 30 minutos;

-adicionou-se 0,5ml de solução férrica ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ + HCl-0.2M 10% (p/v); TCA* 24% (p/v) e HCl 50% (v/v)) na

proporção 1:1:1 para interroper a reação;

-centrifugou-se a 7000g por 20 minutos para clarificar a solução resultante;

-fez-se a leitura da reação em espectrofotômetro (Bausch Lomb-spectronic 20D) a 540 nm contra um branco feito nas condições de reação sem o extrato celular. A atividade glutamina sintetase foi expressa em Unidades por mg de proteína. Cada unidade corresponde a nmol de glutamil hidroxamato.min⁻¹.

3.5.9 - Avaliação do potencial de fixação biológica de nitrogênio atmosférico

O experimento foi conduzido em casa de vegetação em vasos de Leonard contendo sílica gel e vermiculita na proporção 1:2 e solução nutritiva para plantas sem nitrogênio (ANEXO A. III). Os vasos foram esterilizados em autoclave a 121°C e 1.1 atm de pressão por um período de 3,0 horas.

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado com 3 repetições e os seguintes tratamentos:

a) Testemunho (sem inoculação)

b) inoculação com a estirpe cultivada em diferentes condições

As sementes da planta hospedeira (*Glicine max*) variedade IAC-13, fornecida pelo Instituto Agrônomo de Campinas, foram esterilizadas superficialmente com etanol 95% por tres minutos, solução de hipoclorito 10% por cinco minutos seguida de seis lavagens sucessivas com água destilada e esterilizada. Foram utilizadas seis sementes por vaso. O plantio foi realizado com auxílio de uma pinça e um bastão de vidro estéreis sendo as sementes introduzidas a 5 cm de profundidade. Uma semana após a germinação foi feito desbaste, permanecendo duas plantas por vaso.

Os inoculantes foram aplicados na forma de suspensões celulares crescidas em diferentes condições de ensaio, coletadas após 70 horas de cultivo em shaker. Os vasos foram inoculados logo após a germinação das sementes com 2.0ml de cultura por vaso numa concentração de aproximadamente 10^9 células por ml. Após a primeira semana de cultivo das plantas fez-se regas alternadas com água estéril e solução nutritiva a cada 2 dias. No vigésimo dia após a emergência foram colocadas estacas de madeira como suporte para crescimento das plantas.

As plantas foram colhidas aos 50 dias após a semeadura para avaliação de peso de matéria seca e N-total da parte aérea, número e peso de nódulos secos e atividade da enzima nitrogenase (EC 1.7.99.2).

A parte aérea foi separada do sistema radicular e levada a estufa a 60°C a fim de se obter o peso da matéria seca. Determinou-se o nitrogênio total da planta pelo método semi-micro Kjeldahl (SARRUGE & HAGG, 1974).

* Determinação da atividade enzimática

O método baseia-se no fato de a nitrogenase, enzima responsável pela fixação do nitrogênio atmosférico, também poder reduzir outras moléculas, entre elas o gás acetileno (C_2H_2) à etileno (C_2H_4). A razão teórica é de 5 moles de C_2H_2 reduzido para 1 mol de N_2 fixado (RICE & PAUL, 1971).

No ato da colheita foram cortadas as raízes contendo os nódulos e imediatamente colocados dentro de vidros limpos e bem vedados com tampas de borracha. Com uma seringa retirou-se 50ml de ar neles contido, substituindo-se pelo mesmo volume de gás acetileno. Após 30 minutos da introdução do acetileno retirou-se uma alíquota 0,5 ml para a medida de atividade por cromatografia gasosa utilizando-se um cromatógrafo Beckman GC-85.

$$\text{Ativ (Nase)} = AP \cdot A \cdot K \cdot R \cdot V_f \cdot V_j^{-1} \cdot t^{-1} \cdot \text{gnod}$$

onde:

Ativ (Nase) = atividade da nitrogenase

AP = altura do pico cromatográfico (mm)

A = atenuação do aparelho

$K = 11,16 / \text{altura pico padrão} \times \text{velocidade do aparelho}$

$R = \text{velocidade do aparelho}$

$V_f = \text{volume do frasco (l)}$

$V_j = \text{volume da injeção (ml)}$

$t = \text{tempo (no caso 0,5 horas)}$

$\text{gnod} = \text{grama de nódulo (peso seco)}$

$\text{Unidade} = \mu\text{moles de } C_2H_4 \cdot h^{-1} \cdot g \text{ nódulo}^{-1}$

3.5.10 - Determinação dos parâmetros cinéticos

Os resultados obtidos nos diferentes ensaios foram submetidos a tratamento matemático para determinação de parâmetros cinéticos como velocidade de crescimento celular, velocidade específica de crescimento celular, fator de conversão substrato a célula e produtividade celular global. Apenas para facilitar a discussão, relembramos abaixo os conceitos e definições relacionadas a esses parâmetros.

Num processo fermentativo descontínuo, a partir da curva de concentração celular (x) em função do tempo define-se a velocidade de crescimento celular como:

$$(1) \quad v = \frac{dx}{dt} \quad (g/l \cdot h)$$

Essa velocidade é influenciada pelas condições de cultivo e também pela concentração celular no instante

considerado. Para melhor comparar as velocidades sem interferência da quantidade de células presentes, define-se a velocidade específica de crescimento celular:

$$(2) \quad \mu = \frac{1}{x} \cdot \frac{dx}{dt} \quad (h^{-1})$$

Durante a fase exponencial de crescimento celular, o valor de μ é máximo e constante o que nos permite integrar a equação (2) obtendo:

$$(3) \quad \log x = \log x_0 + \frac{\mu_{\max}}{2.303} (t-t_0)$$

A equação (3) nos permite distinguir as fases exponenciais em um gráfico semi-logarítmico de x em função do tempo pelo alinhamento dos pontos nessas fases. O coeficiente angular da reta ajustada representa o valor de $\mu_{\max}$.

O fator de conversão ($Y_{x/s}$) expressa a quantidade de biomassa produzida por grama de substrato degradado, substrato este utilizado como fonte de energia ou fonte de carbono.

A produtividade (grama de biomassa produzida por litro de meio e por hora de cultivo) é frequentemente utilizada para avaliar um processo fermentativo. Esse parâmetro pode servir como critério no dimensionamento de uma instalação de fermentação. No nosso caso a produtividade (Prod) foi calculada levando-se em consideração apenas o tempo estritamente necessário para o crescimento microbiano:

$$(4) \quad \text{Prod} = \frac{x_f - x_0}{t_x} \quad \text{onde}$$

x_f = concentração de x máximo (g/l)

x_0 = concentração inicial de x (g/l)

t_x = tempo de cultivo para o x máximo

Os valores de x utilizados nos cálculos desse parâmetro foram retirados de uma curva ajustada, traçada a partir de pontos experimentais obtidos em cada ensaio.

As velocidades e os fatores de conversão substrato a célula foram determinados segundo um programa computacional desenvolvido no Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo S.A. - IPT por BONOMI, (1987). Esse programa fez o tratamento de dados experimentais na seguinte sequência:

impressão das condições experimentais;

impressão dos dados experimentais;

traçado de gráfico da concentração celular - massa seca (x), concentração de glicerol (S_1) e concentração de aminoácidos totais livres (S_2) em função do tempo;

traçado do gráfico de $\ln x$ vs. t , para definir $a(s)$ fase(s) exponencial (is) do crescimento celular medido pela massa seca;

definição das fases exponenciais - massa seca (até 20 tentativas) através de regressões lineares de $\ln x$ e t ;

escolha da(s) fase(s) exponencial (is) - massa seca (até 5) traçado do(s) gráfico(s) $\ln x$ vs. t com ajuste (s)

escolhido (s);

definição da fase linear - massa seca (até 20 tentativas) através de regressões lineares de x e t ;

escolha da fase linear - massa seca - traçado do gráfico x vs. t com o ajuste escolhido;

ajuste de um polinômio (até grau 6) para os dados experimentais de S_1 e S_2 - escolha pelo fator de correlação e pela curva com significado físico - traçado de gráfico S vs. t com o ajuste escolhido;

redefinição de todas as fases de crescimento calculadas como descrito acima para pequenos ajustes de concordância entre as fases e/ou alterações das próprias fases;

impressão da tabela com os valores de X , S_1 e S_2 ajustados em intervalos de 1 hora;

definição dos valores de Y_x/s (até 20 tentativas) através de regressões lineares de X e S_1 (S_2) - se possível definir um Y_x/s para cada fase de crescimento;

traçado do gráfico X vs. S com o (s) ajuste (s) para o cálculo do (s) valor (es) de Y_x/s escolhido (s);

A análise estatística aplicada aos resultados do experimento em casa de vegetação foi realizada segundo um programa desenvolvido no Instituto Agronômico de Campinas.¹

¹ ZONITA, P. E.; MACHADO, A. A. (Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, SP) Comunicação pessoal, 1992.

4. RESULTADOS

Os resultados obtidos nos 17 ensaios estão apresentados nas tabelas e figuras a seguir. A Tabela 4.0 resume as condições de cultivo dos ensaios realizados.

Nas Tabelas 4.1 à 4.17 são apresentados os resultados obtidos nesses ensaios. Os valores de Unidades formadoras de colônias (UFC) e células totais (Ct) representam a média de 5 valores com um desvio padrão inferior $0,4 \times 10^9$.

As Figuras 4.1 à 4.17 (a e b) representam os resultados de concentração celular em massa seca, de glicerol, de aminoácidos totais livres e de amônio com o tempo de cultivo dos ensaios 1 à 17.

A Tabela 4.18 apresenta os resultados de atividade da enzima glutamina sintetase, intracelular do *Bradyrhizobium japonicum* nos ensaios de número 1, 7 e 11.

Nas Tabelas 4.19 e 4.20 apresenta-se os resultados da eficiência simbiótica de *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 587, obtida em diferentes condições de cultivo. As sementes de soja inoculadas e crescidas em casa de vegetação após 50 dias de plantio. Caracteres da parte aérea e características da nodulação.

Tabela 4.0: Resumo das condições de ensaios realizadas.

Ensaio	Glicerol (g/l)	Extrato de levedura (g/l)	aminoácido (g/l)	ácido carboxílico (g/l)
1	5,0	-	-	-
2	5,0	2,0	-	-
3	5,0	4,5	-	-
4	5,0	5,0	-	-
5	5,0	5,5	-	-
6	5,0	6,0	-	-
7	5,0	8,0	-	-
8	5,0	10,0	-	-
9	10,0	8,0	-	-
10	5,0	5,5	2,5 ^(a)	-
11	5,0	4,0	4,0 ^(a)	-
12	5,0	2,5	5,5 ^(a)	-
13	5,0	0,5	7,5 ^(a)	-
14	5,0	5,5	2,5 ^(b)	-
15	5,0	4,0	4,0 ^(b)	-
16	5,0	5,5	-	4,5 ^(c)
17	5,0	5,5	-	2,5 ^(d)

(a) glutamato monossódico

(b) L-valina

(c) succinato monossódico hexa hidratado

(d) ácido α -cetoglutárico

ENSAIO 1

Tabela 4.1: pH, concentração celular (X), unidades formadoras colônias (UFC), células totais (Ct), concentração de glicerol (S₁), concentração de aminoácidos totais livres (S₂) e concentração de amônio com o tempo de cultivo (t).

t (h)	pH	X (g/l)	UFC. 10 ⁹ /ml	Ct. 10 ⁹ /ml	S ₁ (g/l)	S ₂ (g/l)	NH ₄ ⁺ (mg/l)
0,0	6,85	0,213	1,7	1,6	5,22	0,00	48,79
3,0	6,81	0,229	-	-	5,06	0,00	45,18
7,0	6,73	0,224	-	1,9	5,07	0,00	43,47
11,0	6,64	0,213	-	1,9	5,00	0,00	40,25
15,0	6,62	0,253	-	-	4,91	0,00	37,27
23,0	6,53	0,269	1,9	2,1	5,00	0,00	33,21
28,5	6,43	0,317	-	-	4,72	0,18	30,14
31,0	6,34	0,381	-	2,6	4,73	0,18	27,91
35,0	6,37	0,402	-	-	4,79	0,18	25,84
39,0	6,17	0,430	-	3,0	4,62	0,18	21,32
43,0	6,04	0,452	-	-	4,58	0,18	17,59
47,0	5,93	0,466	3,2	3,3	4,59	0,18	14,51
51,0	5,38	0,497	-	-	4,37	0,00	9,96
55,0	4,72	0,528	-	3,7	4,16	0,00	7,03
63,0	4,31	0,597	-	4,2	4,38	0,00	5,16
71,0	4,18	0,615	3,8	4,4	4,37	0,00	4,25
79,0	5,02	0,634	-	4,4	4,12	0,00	2,26
87,0	3,93	0,696	-	4,9	4,08	0,00	3,09
96,0	3,99	0,709	4,1	5,0	4,09	0,00	2,75
100,0	4,40	0,723	-	-	2,25	0,00	2,86

(-) = não determinado

FIGURA 4.1 [a]: crescimento celular (●) e consumo de glicerol (▲), [b]: consumo de aminoácidos totais livres (×) e nitrogênio amoniacal (□) com o tempo de cultivo.

ENSAIO 2

Tabela 4.2: pH, concentração celular em massa seca (X), unidades formadoras de colônias (UFC), células totais (Ct), glicerol (S₁), aminoácidos totais livres (S₂), e amônio com o tempo de cultivo (t).

t (h)	pH	X (g/l)	UFC. 10 ⁹ /ml	Ct. 10 ⁹ /ml	S ₁ (g/l)	S ₂ (g/l)	NH ₄ ⁺ (mg/l)
0,0	6,80	0,202	1,7	1,6	5,26	1,76	52,69
3,0	6,98	0,246	-	-	5,33	1,76	56,90
7,0	7,09	0,293	-	2,2	5,25	1,62	56,90
11,0	7,21	0,342	-	2,5	5,16	1,43	59,13
15,0	7,35	0,427	-	-	5,16	1,18	61,45
23,0	7,43	0,579	3,9	4,0	4,90	0,82	61,45
28,5	7,38	0,538	-	-	4,58	0,71	60,21
31,0	7,48	0,817	-	5,6	4,61	0,62	55,76
35,0	7,37	0,903	-	-	4,30	0,57	51,63
39,0	7,28	0,933	-	6,3	4,21	0,52	46,00
43,0	7,23	0,994	-	-	4,14	0,46	42,60
47,0	7,09	1,124	7,7	7,6	3,92	0,38	33,82
51,0	6,98	1,156	-	-	3,72	0,23	25,21
55,0	6,83	1,228	-	8,0	3,55	0,20	17,80
63,0	6,51	1,404	-	9,0	3,12	0,20	0,27
71,0	6,50	1,634	13,0	10,0	2,91	0,20	0,20
79,0	6,25	1,806	-	21,0	2,65	0,20	0,20
87,0	6,64	2,019	-	22,0	2,22	0,20	0,16
96,0	6,67	1,988	21,0	20,0	1,82	0,20	0,15
100,0	6,64	2,083	-	-	1,80	0,20	0,18

FIGURA 4.2 [a]: crescimento celular (●) e consumo de glicerol (Δ), [b]: consumo de aminoácidos totais livres (✱) e nitrogênio amoniacal (□) com o tempo de cultivo.

ENSAIO 3

Tabela 4.3 : pH, concentração celular em massa seca (X), unidades formadoras de colônias (UFC), células totais (Ct), glicerol (S₁), aminoácidos totais livres (S₂) e amônio com o tempo de cultivo (t).

t (h)	pH	X (g/l)	UFC. 10 ⁹ /ml	Ct. 10 ⁹ /ml	S ₁ (g/l)	S ₂ (g/l)	NH ₄ ⁺ (mg/l)
0,0	7,10	0,354	2,2	2,2	6,41	4,42	50,73
5,0	7,44	0,497	-	-	6,06	4,37	57,53
9,0	7,60	0,597	-	3,9	5,85	3,84	62,56
13,0	7,77	0,710	-	-	5,75	3,29	70,94
21,0	7,95	1,042	7,0	7,0	5,33	2,46	95,32
25,0	7,93	1,125	-	-	5,07	2,19	95,32
29,0	7,75	1,424	-	9,1	4,70	1,78	81,06
33,0	7,83	1,433	-	-	4,51	1,66	84,41
37,0	7,81	1,553	-	9,7	4,20	1,56	81,06
41,0	7,83	1,839	-	-	3,85	1,37	68,93
45,0	7,71	1,974	18,0	19,0	3,60	1,25	57,60
49,0	7,59	2,185	-	-	3,26	1,06	45,10
53,0	7,40	2,408	-	36,0	2,73	0,87	17,66
61,0	7,63	2,114	-	-	2,38	0,83	19,17
69,0	7,53	2,185	25,0	28,0	1,60	0,79	-
78,0	7,45	3,232	-	-	0,71	0,70	4,89
85,0	7,52	3,310	-	56,0	0,35	0,70	0,39
96,0	7,58	3,232	56,0	56,0	0,27	0,66	0,32
100,0	7,59	3,170	-	-	0,18	0,66	0,36

FIGURA 4.3 [a]: crescimento celular ($\circ$) e consumo de glicerol (Δ), [b]: consumo de aminoácidos totais livres ($*$) e nitrogênio amoniacal ($\square$) com o tempo de cultivo.

ENSAIO 4

Tabela 4.4: pH, concentração celular em massa seca (X), unidades formadoras de colônias (UFC), células totais (Ct), glicerol (S₁), aminoácidos totais livres (S₂) e amônio com o tempo de cultivo (t).

t (h)	pH	X (g/l)	UFC. 10^9 /ml	Ct. 10^9 /ml	S ₁ (g/l)	S ₂ (g/l)	NH ₄ ⁺ (mg/l)
0,0	7,10	0,348	2,2	2,2	6,33	4,91	50,73
5,0	7,44	0,497	-	-	6,15	4,72	57,53
9,0	7,63	0,597	-	4,1	6,12	4,25	62,24
13,0	7,77	0,697	-	-	5,68	3,74	70,94
21,0	7,94	1,058	6,7	6,9	5,33	2,97	91,54
25,0	8,08	1,194	-	-	5,15	2,39	99,27
29,0	7,83	1,364	-	8,7	4,87	2,13	91,54
33,0	7,75	1,615	-	-	4,37	1,78	81,06
37,0	7,83	1,839	-	13,0	4,11	1,72	84,41
41,0	7,72	1,974	-	-	3,67	1,61	58,61
45,0	7,72	2,185	27,0	26,0	3,42	1,37	59,99
49,0	7,67	2,221	-	-	3,26	1,25	57,60
53,0	7,76	2,257	-	29,0	2,90	1,15	53,09
61,0	7,57	2,686	-	-	2,02	0,87	12,75
69,0	7,51	2,897	41,0	40,0	1,50	0,81	4,59
78,0	7,42	3,232	-	-	0,62	0,74	0,34
85,0	7,67	3,075	-	48,0	0,27	0,74	0,34
96,0	7,68	3,232	56,0	52,0	0,18	0,74	1,03
100,0	7,63	3,170	-	-	0,09	0,74	2,31

FIGURA 4.4 [a]: crescimento celular (○) e consumo de glicerol (△), [b]: consumo de aminoácidos totais livres (×) e nitrogênio amoniacal (□) com o tempo de cultivo.

ENSAIO 5

Tabela 4.5: pH, concentração celular em massa seca (X), unidades formadoras de colônias (UFC), células totais (Ct), glicerol (S₁), aminoácidos totais livres (S₂) e amônio com o tempo de cultivo (t).

t (h)	pH	X (g/l)	UFC. 10 ⁹ /ml	Ct. 10 ⁹ /ml	S ₁ (g/l)	S ₂ (g/l)	NH ₄ ⁺ (mg/l)
0,0	6,92	0,287	2,0	2,0	4,06	5,60	65,19
3,0	7,08	0,355	-	-	3,71	5,60	70,40
7,0	7,42	0,408	-	2,9	3,87	5,38	73,16
11,0	7,62	0,459	-	-	3,72	4,97	82,11
15,0	7,79	0,529	-	3,7	3,54	4,58	92,15
23,0	8,03	0,789	5,4	5,3	3,41	3,79	107,47
27,0	8,03	0,903	-	-	3,19	3,20	111,76
31,0	8,06	1,159	-	7,6	2,83	2,71	115,93
35,0	7,90	1,212	-	-	3,97	2,51	124,74
39,0	7,92	1,286	-	8,3	3,81	2,27	129,39
43,0	7,90	1,424	-	-	3,11	2,01	124,74
49,0	7,86	1,709	17,0	16,0	2,41	1,73	127,91
55,0	7,79	1,906	-	20,0	1,96	1,56	118,76
63,0	7,96	2,185	-	26,0	1,31	1,36	110,28
71,0	7,86	2,564	35,0	36,0	0,70	1,05	85,07
80,0	7,64	2,686	-	36,0	0,18	0,88	69,79
87,0	7,95	2,686	-	38,0	0,00	0,76	69,79
95,0	8,19	2,686	35,0	38,0	0,00	0,65	77,89
100,0	8,22	2,727	-	-	0,00	0,54	97,03

FIGURA 4.5 [a]: crescimento celular ($\circ$) e consumo de glicerol (Δ), [b]: consumo de aminoácidos totais livres ($*$) e nitrogênio amoniacal ($\square$) com o tempo de cultivo.

ENSAIO 6

Tabela 4.6: pH, concentração celular em massa seca (X), unidades formadoras de colônias (UFC), células totais (Ct), glicerol (S₁), aminoácidos totais livres (S₂) e amônio como o tempo de cultivo (t).

t (h)	pH	X (g/l)	UFC. 10 ⁹ /ml	Ct. 10 ⁹ /ml	S ₁ (g/l)	S ₂ (g/l)	NH ₄ ⁺ (mg/l)
0,0	6,70	0,202	1,7	1,6	5,92	5,89	77,29
6,5	7,07	0,355	-	-	5,69	5,73	90,22
10,5	7,24	0,430	-	3,0	5,67	5,56	97,48
14,5	7,42	0,513	-	-	5,62	5,17	101,32
22,5	7,74	0,903	5,6	5,0	5,11	4,35	118,28
26,5	7,83	0,963	-	-	4,92	3,50	129,96
30,5	7,82	1,026	-	6,1	4,76	3,29	129,96
34,5	7,84	1,190	-	-	4,64	3,05	135,21
37,5	7,86	1,267	-	7,8	4,35	2,76	135,21
46,5	7,90	1,552	10,0	10,0	3,73	2,18	140,67
50,5	7,87	1,719	-	-	3,52	1,88	133,23
54,5	7,68	2,116	-	25,0	3,12	1,60	109,42
62,5	8,00	2,332	-	29,0	2,44	1,60	105,20
70,5	7,69	2,446	33,0	31,0	2,04	1,27	101,13
78,5	7,77	2,686	-	35,0	1,42	0,96	86,96
86,5	7,59	3,010	-	43,0	0,97	0,86	-
94,5	7,41	3,262	49,0	50,0	0,40	0,88	41,33
102,5	7,88	3,170	-	-	0,28	0,88	51,95
106,0	7,90	3,262	-	-	0,28	0,88	42,86

FIGURA 4.8 [a]: crescimento celular (O) e consumo de glicerol (Δ), [b]: consumo de aminoácidos totais livres (%) e nitrogênio amoniacal (□) com o tempo de cultivo.

ENSAIO 7

Tabela 4.7: pH, concentração celular em massa seca (X), unidades formadoras de colônias (UFC), células totais (Ct), glicerol (S₁), aminoácidos totais livres (S₂) e amônio com o tempo de cultivo (t).

t (h)	pH	X (g/l)	UFC. 10 ⁹ /ml	Ct. 10 ⁹ /ml	S ₁ (g/l)	S ₂ (g/l)	NH ₄ ⁺ (mg/l)
0,0	6,98	0,202	2,0	1,5	6,16	8,27	86,74
6,0	7,42	0,381	-	-	6,11	8,14	100,97
10,0	7,66	0,437	-	3,0	6,01	8,02	108,94
14,0	7,79	0,545	-	-	5,83	7,77	117,54
22,0	8,02	0,776	5,0	4,6	5,70	6,93	142,14
26,0	7,95	0,933	-	-	5,43	6,22	145,95
30,0	8,17	1,091	-	6,8	5,26	5,69	145,95
34,0	8,13	1,344	-	-	4,87	5,02	151,64
38,0	8,03	1,525	-	9,9	4,64	4,39	151,64
42,0	8,02	1,709	-	-	4,09	3,53	145,95
46,0	8,06	1,974	16,0	19,0	3,69	3,25	145,95
50,0	7,93	2,294	-	-	3,24	2,97	122,24
54,0	7,83	2,485	-	31,0	2,72	2,59	99,47
62,0	7,82	2,985	-	-	1,36	2,05	74,54
70,0	7,87	3,419	45,0	47,0	0,36	1,63	45,46
78,0	7,97	3,419	-	-	0,00	1,73	55,08
86,0	8,47	3,292	-	53,0	0,00	1,63	70,53
95,5	8,50	3,292	53,0	53,0	0,00	1,76	83,18
100,0	8,50	3,292	-	-	0,00	1,66	73,50

FIGURA 4.7 [a]: crescimento celular (○) e consumo de glicerol (Δ), [b]: consumo de aminoácidos totais livres (*) e nitrogênio amoniacal (□) com o tempo de cultivo.

ENSAIO 8

Tabela 4.8: pH, concentração celular em massa seca (X), unidades formadoras de colônias (UFC), células totais (Ct), glicerol (S₁), aminoácidos totais livres (S₂) e amônio com o tempo de cultivo (h).

t (h)	pH	X (g/l)	UFC. 10 ⁹ /ml	Ct 10 ⁹ /ml	S ₁ (g/l)	S ₂ (g/l)	NH ₄ ⁺ (mg/l)
0,0	6,97	0,202	2,0	1,5	6,29	10,76	93,58
6,0	7,50	0,381	-	-	6,24	10,61	104,88
10,0	7,65	0,466	-	3,0	6,14	10,46	117,54
14,0	7,71	0,522	-	-	5,93	10,46	131,74
22,0	8,02	0,817	6,3	5,3	5,56	8,53	159,29
26,0	7,94	1,026	-	-	5,32	8,69	170,06
30,0	8,17	1,194	-	7,0	5,21	8,23	176,69
34,0	8,09	1,383	-	-	4,92	7,17	183,57
38,0	8,01	1,646	-	15,0	4,50	6,40	183,57
42,0	8,02	1,974	-	-	3,92	5,51	190,72
46,0	8,18	2,257	19,0	23,0	3,50	4,70	183,57
50,0	7,99	2,408	-	-	3,34	4,34	153,53
54,0	7,89	2,645	-	31,0	2,97	3,84	108,02
62,0	7,87	3,359	-	-	1,91	3,11	144,14
70,0	7,98	3,419	51,0	50,0	0,73	2,75	108,02
78,0	8,22	3,548	-	-	0,00	2,51	115,66
86,0	8,78	3,168	-	56,0	0,00	2,12	142,14
95,5	8,75	3,292	47,0	56,0	0,00	1,03	142,14
100,0	8,66	3,292	-	-	0,00	2,51	142,14

FIGURA 4.8 [a]: crescimento celular (○) e consumo de glicerol (Δ), [b]: consumo de aminoácidos totais livres (*) e nitrogênio amoniacal (□) com o tempo de cultivo.

ENSAIO 9

Tabela 4.9: pH, concentração celular em massa seca (X), unidades formadoras de colônias (UFC), células totais (Ct), glicerol (S₁), aminoácidos totais livres e amônio com o tempo de cultivo (t).

t (h)	pH	X (g/l)	UFC. 10 ⁹ /ml	Ct. 10 ⁹ /ml	S ₁ (g/l)	S ₂ (g/l)	NH ₄ ⁺ (mg/l)
0,0	7,04	0,202	1,7	1,5	11,60	7,79	68,96
4,0	7,48	0,329	-	-	11,26	7,58	74,65
10,5	7,56	0,409	-	3,2	11,07	7,37	80,79
14,5	7,76	0,554	-	-	10,98	6,97	98,49
18,5	7,82	0,597	-	4,2	10,67	6,77	106,61
26,0	7,89	0,762	4,9	5,4	10,31	5,85	120,06
30,0	8,05	0,933	-	-	9,92	5,05	128,88
34,0	8,12	1,125	-	7,6	9,87	4,78	128,88
38,0	8,10	1,344	-	-	9,62	4,26	133,97
42,0	8,05	1,466	-	9,2	9,36	3,90	-
50,0	7,34	1,906	21,0	24,0	7,34	3,66	119,29
54,0	7,93	2,185	-	-	8,30	3,04	122,83
58,0	7,91	2,257	-	37,0	7,83	2,70	118,20
66,0	7,98	2,727	-	43,0	6,76	2,46	93,84
74,0	7,80	2,985	49,0	48,0	5,80	2,13	71,70
82,0	7,65	3,561	-	64,0	4,92	1,40	50,77
90,0	7,49	3,998	-	71,0	4,26	1,25	28,42
99,5	7,56	4,238	67,0	65,0	3,19	1,15	0,59
108,0	7,63	4,912	-	73,0	1,97	1,15	0,63
122,5	7,60	5,455	62,0	69,0	1,18	1,15	-
132,0	7,58	6,005	-	66,0	0,13	1,10	0,50
146,5	7,66	5,974	70,0	72,0	0,13	1,10	-

FIGURA 4.9 [a]: crescimento celular ($\circ$) e consumo de glicerol (Δ), [b]: consumo de aminoácidos totais livres ($*$) e nitrogênio amoniacal ($\square$) com o tempo de cultivo.

ENSAIO 10

Tabela 4.10: pH, concentração celular em massa seca (X), unidades formadoras de colônias (UFC), células totais (Ct), glicerol (S₁), aminoácidos totais livres (S₂) e amônio com o tempo de cultivo (t).

t (h)	pH	X (g/l)	UFC. 10 ⁹ /ml	Ct. 10 ⁹ /ml	S ₁ (g/l)	S ₂ (g/l)	NH ₄ ⁺ (mg/l)
0,0	7,00	0,246	2,1	1,8	6,52	8,08	64,34
4,5	7,41	0,355	-	-	6,09	7,87	69,58
8,5	7,49	0,423	-	3,7	5,91	7,68	72,36
12,5	7,64	0,497	-	-	5,83	7,48	78,25
16,5	7,74	0,615	-	5,0	5,59	6,93	78,25
24,5	7,89	0,873	6,4	6,3	5,05	6,09	81,38
28,5	7,86	1,194	-	-	4,89	5,48	101,32
32,5	7,90	1,274	-	16,0	4,62	4,98	97,48
37,0	7,95	1,509	-	-	4,09	4,39	97,48
40,5	8,03	1,709	-	23,0	3,83	4,14	101,32
44,5	8,04	1,991	-	-	3,48	3,61	101,32
48,5	8,31	2,130	18,0	22,0	3,04	3,16	101,32
54,5	8,27	2,275	-	-	2,35	2,42	118,55
56,5	8,33	2,349	-	-	2,18	2,19	105,78
60,5	8,30	3,075	-	37,0	1,12	1,58	105,78
68,5	8,26	3,262	50,0	49,0	0,32	1,45	105,78
76,5	8,20	3,561	-	56,0	0,00	1,35	132,86
83,5	8,52	3,561	-	54,0	0,00	1,27	138,04
92,5	8,45	3,561	55,0	56,0	0,00	1,10	109,75
100,0	8,75	3,460	-	-	0,00	1,00	85,70

FIGURA 4.10 [a]: crescimento celular (o) e consumo de glicerol (Δ), [b]: consumo de aminoácidos totais livres (*) e nitrogênio amoniacal ($\square$) com o tempo de cultivo.

ENSAIO 11

Tabela 4.11: pH, concentração celular em massa seca (X), unidades formadoras de colônias (UFC), células totais (Ct), glicerol (S₁), aminoácidos totais livres (S₂) e amônio com o tempo de cultivo (t).

t (h)	pH	X (g/l)	UFC. 10 ⁹ /ml	Ct. 10 ⁹ /ml	S ₁ (g/l)	S ₂ (g/l)	NH ₄ ⁺ (mg/l)
0,0	7,00	0,246	2,1	1,9	6,57	8,28	66,91
4,5	7,40	0,355	-	-	6,47	8,28	72,36
8,5	7,47	0,416	-	2,9	6,31	8,07	75,25
12,5	7,64	0,497	-	-	6,05	7,76	81,38
16,5	7,73	0,615	-	-	5,79	7,46	88,00
24,5	7,90	0,873	6,3	6,3	5,30	6,57	91,52
28,5	7,84	1,230	-	-	4,79	6,01	97,48
32,5	7,92	1,286	-	16,0	4,63	5,79	97,48
37,0	7,99	1,509	-	-	4,09	5,36	97,48
40,5	8,10	1,709	-	18,0	3,81	5,09	97,48
44,5	8,06	1,991	-	-	3,73	4,64	101,32
48,5	8,27	2,043	18,0	22,0	3,24	4,33	101,32
54,5	8,27	2,331	-	-	2,53	3,77	118,55
56,5	8,52	2,645	-	-	2,08	3,25	109,88
60,5	8,30	2,985	-	37,0	1,29	2,61	123,14
68,5	8,39	3,262	50,0	51,0	0,45	2,29	127,91
76,5	8,39	3,561	-	56,0	0,00	1,94	132,86
83,5	8,65	3,561	-	57,0	0,00	1,40	138,04
92,5	8,50	3,561	52,0	56,0	0,00	1,20	109,75
100,0	8,66	3,460	-	-	0,00	1,20	125,00

FIGURA 4.11 [a]: crescimento celular (p) e consumo de glicerol (Δ), [b]: consumo de aminoácidos totais livres (x) e nitrogênio amoniacal ($\square$) com o tempo de cultivo.

ENSAIO 12

Tabela 4.12: pH, concentração celular em massa seca (X), unidades formadoras de colônias (UFC), células totais (Ct), glicerol (S₁), aminoácidos totais livres (S₂) e amônio com o tempo de cultivo(t).

t (h)	pH	X (g/l)	UFC. 10 ⁹ /ml	Ct. 10 ⁹ /ml	S ₁ (g/l)	S ₂ (g/l)	NH ₄ ⁺ (mg/l)
0,0	7,27	0,246	2,1	2,0	6,32	8,14	54,09
6,0	7,55	0,342	-	-	6,11	8,04	58,36
10,0	7,68	0,363	-	2,7	5,84	7,83	62,97
14,0	7,79	0,448	-	-	5,82	7,73	65,40
22,0	8,02	0,684	4,4	4,5	5,35	7,24	67,94
26,0	8,00	0,776	-	-	5,42	6,96	82,43
30,0	7,99	0,933	-	6,2	5,25	6,68	85,66
34,0	8,09	1,058	-	-	5,03	6,32	85,66
38,0	8,14	1,267	-	8,2	4,75	5,98	85,66
42,0	8,12	1,384	-	-	4,30	5,64	85,66
46,0	8,20	1,492	9,0	9,5	4,13	5,50	89,02
50,0	8,23	1,709	-	-	3,83	5,02	91,60
54,0	8,23	1,806	-	22,0	3,67	4,96	95,24
62,0	8,32	2,078	-	27,0	2,63	3,99	102,94
70,0	8,35	2,408	38,0	40,0	2,43	3,66	107,03
78,0	8,60	2,604	-	44,0	1,59	3,45	104,81
95,0	8,57	3,359	57,0	60,0	0,35	2,54	122,57
100,0	8,59	3,359	-	-	0,00	2,29	117,87
102,0	8,60	3,262	-	61,0	0,22	1,97	122,57

FIGURA 4.12 [a]: crescimento celular ($\circ$) e consumo de glicerol (Δ), [b]: consumo de aminoácidos totais livres ($\times$) e nitrogênio amoniacal ($\square$) com o tempo de cultivo.

ENSAIO 13

Tabela 4.13: pH, concentração celular em massa seca (X), unidades formadoras de colônias (UFC), células totais (Ct), glicerol (S₁), aminoácidos totais livres (S₂) e amônio com o tempo de cultivo (t).

t (h)	pH	X (g/l)	UFC. 10 ⁹ /ml	Ct. 10 ⁹ /ml	S ₁ (g/l)	S ₂ (g/l)	NH ₄ ⁺ (mg/l)
0,0	7,29	0,257	2,1	2,0	6,20	8,04	62,97
6,0	7,50	0,342	-	-	5,95	7,93	67,94
10,0	7,67	0,322	-	2,5	5,65	7,83	70,57
14,0	7,83	0,405	-	-	5,52	7,73	76,14
22,0	8,04	0,538	3,6	3,8	5,36	7,63	82,15
26,0	8,04	0,658	-	-	5,34	7,24	62,98
30,0	8,08	0,736	-	5,2	5,16	7,14	62,98
34,0	8,17	0,789	-	-	4,98	6,90	65,45
38,0	8,25	0,963	-	6,4	4,80	6,77	62,98
42,0	8,22	1,026	-	-	4,59	6,74	65,45
46,0	8,24	1,058	6,5	6,8	4,50	6,66	62,98
50,0	8,32	1,065	-	-	4,30	6,09	72,53
54,0	8,40	1,174	-	7,6	3,99	6,09	72,53
62,0	8,50	1,344	-	8,9	3,81	5,94	81,51
70,0	8,52	1,462	13,0	9,5	3,36	5,36	84,74
78,0	8,66	1,492	-	9,7	3,30	5,46	86,18
95,0	8,73	1,646	16,0	16,0	2,99	5,30	93,20
100,0	8,74	1,709	-	-	2,68	5,00	100,79
102,0	8,74	1,646	-	-	2,64	5,00	96,92

FIGURA 4.13 [a]: crescimento celular ($\circ$) e consumo de glicerol (Δ), [b]: consumo de aminoácidos totais livres ($*$) e nitrogênio amoniacal ($\square$) com o tempo de cultivo.

ENSAIO 14

Tabela 4.14: pH, concentração celular em massa seca (X), unidades formadoras de colônias (UFC), células totais (Ct), glicerol (S₁), aminoácidos totais livres (S₂) e amônio com o tempo de cultivo (t).

t (h)	pH	X (g/l)	UFC. 10 ⁹ /ml	Ct. 10 ⁹ /ml	S ₁ (g/l)	S ₂ (g/l)	NH ₄ ⁺ (mg/l)
0,0	6,51	0,318	2,5	2,7	6,57	6,15	79,31
5,5	7,01	0,409	-	-	6,41	6,08	89,00
9,5	7,22	0,497	-	3,0	6,13	5,92	92,49
13,5	7,41	0,561	-	-	6,00	5,70	99,86
21,5	7,71	0,817	4,3	4,7	5,79	5,21	112,09
25,5	7,75	0,963	-	-	5,59	4,94	116,49
29,5	7,87	1,124	-	7,6	5,28	4,48	121,03
33,5	7,87	1,383	-	-	4,94	4,26	116,47
37,5	7,67	1,520	-	9,3	4,75	4,16	121,04
45,5	7,72	1,710	14,0	16,0	4,25	3,85	146,69
49,5	7,65	1,870	-	-	4,14	3,85	115,51
53,5	7,69	2,150	-	22,0	3,62	3,52	102,92
69,5	7,55	2,730	30,0	36,0	2,60	3,04	88,25
76,5	7,51	3,080	-	41,0	2,04	2,61	91,83
80,5	7,58	3,260	-	46,0	1,70	2,61	99,27
84,5	7,60	3,410	-	58,0	1,31	2,24	91,83
93,5	7,60	3,880	59,0	62,0	0,40	1,74	67,27
105,5	7,63	4,000	-	63,0	0,06	1,53	78,60
120,0	8,48	4,085	60,0	67,0	0,00	1,49	125,37

FIGURA 4.14 [a]: crescimento celular (○) e consumo de glicerol (Δ), [b]: consumo de aminoácidos totais livres (*) e nitrogénio amoniacal (□) com o tempo de cultivo.

ENSAIO 15

Tabela 4.15: pH, concentração celular em massa seca (X), unidades formadoras de colônias (UFC), células totais (Ct), glicerol (S₁) aminoácidos totais livres (S₂) e amônio com o tempo de cultivo (t).

t (h)	pH	X (g/l)	UFC. 10 ⁹ /ml	Ct. 10 ⁹ /ml	S ₁ (g/l)	S ₂ (g/l)	NH ₄ ⁺ (mg/l)
0,0	6,52	0,318	2,5	2,7	6,34	6,72	76,31
5,5	6,97	0,423	-	-	6,08	6,72	82,44
9,5	7,23	0,521	-	3,1	5,92	6,39	85,64
13,5	7,31	0,561	-	-	5,79	6,39	89,00
21,5	7,62	0,762	4,0	3,9	5,56	6,00	92,49
25,5	7,55	0,874	-	-	5,39	5,77	92,49
29,5	7,54	0,994	-	5,8	5,32	5,77	88,98
33,5	7,61	1,159	-	-	5,09	5,59	92,47
37,5	7,48	1,320	-	8,5	4,93	5,22	88,98
45,5	7,64	1,460	9,0	8,6	4,58	4,96	82,40
49,5	7,43	1,550	-	-	4,48	4,96	88,25
53,5	7,48	1,680	-	16,0	4,18	4,83	84,92
69,5	7,40	2,110	20,0	19,0	3,40	4,54	81,72
76,5	7,41	2,490	-	31,0	2,95	2,05	88,33
80,5	7,44	2,900	-	40,0	2,38	1,88	72,71
84,5	7,50	3,080	-	43,0	2,21	1,69	64,70
93,5	7,48	3,360	50,0	55,0	1,59	1,46	67,27
105,5	7,12	4,120	-	58,0	0,74	1,23	45,58
124,0	7,93	4,085	46,0	65,0	0,06	1,01	81,72

FIGURA 4.15 [a]: crescimento celular (o) e consumo de glicerol (Δ), [b]: consumo de aminoácidos totais livres (*) e nitrogênio amoniacal ($\square$) com o tempo de cultivo.

ENSAIO 16

Tabela 4.16: pH, concentração celular em massa seca (X), unidades formadoras de colônias (UFC), células totais (Ct), glicerol (S₁), aminoácidos totais livres (S₂) e amônio com o tempo de cultivo (t).

t (h)	pH	X (g/l)	UFC. 10 ⁹ /ml	Ct. 10 ⁹ /ml	S ₁ (g/l)	S ₂ (g/l)	NH ₄ ⁺ (mg/l)
0,0	7,01	0,293	2,4	2,1	6,53	5,20	65,13
4,0	7,48	0,409	-	-	6,16	5,36	70,47
8,0	7,84	0,503	-	3,5	5,95	5,36	70,47
12,0	8,04	0,585	-	-	5,49	5,03	65,13
16,0	8,25	0,684	-	5,0	5,38	4,87	67,75
24,0	8,27	0,920	18,0	6,3	4,87	4,17	65,13
28,0	8,16	1,092	-	-	4,43	3,14	49,44
32,0	8,47	1,267	-	7,9	4,23	2,78	53,42
36,0	8,35	1,404	-	12,0	3,78	2,43	59,99
40,0	8,46	1,634	-	-	3,32	2,10	53,42
44,0	8,53	1,634	-	-	2,74	1,88	53,42
48,0	8,60	1,988	11,0	19,0	2,06	0,94	36,28
52,0	8,54	2,097	-	-	1,87	0,94	26,33
56,0	8,41	1,974	-	21,0	1,54	0,94	40,29
64,0	8,39	2,330	-	27,0	0,85	0,94	28,45
72,0	8,30	2,850	7,9	30,0	0,00	0,94	8,47
80,0	8,66	2,293	-	26,0	0,00	1,03	0,57
90,0	8,57	2,348	-	-	0,00	1,00	0,00
100,0	8,94	2,129	7,2	29,0	0,00	1,03	0,00

FIGURA 4.16 [a]: crescimento celular (○) e consumo de glicerol (Δ), [b]: consumo de aminoácidos totais livres (*) e nitrogênio amoniacal (□) com o tempo de cultivo.

ENSAIO 17

Tabela 4.17: pH, concentração celular em massa seca (X), unidades formadoras de colônias (UFC), células totais (Ct), glicerol (S₁), aminoácidos totais livres (S₂) e amônio com o tempo de cultivo (t).

t (h)	pH	X (g/l)	UFC. 10 ⁹ /ml	Ct. 10 ⁹ /ml	S ₁ (g/l)	S ₂ (g/l)	NH ₄ ⁺ (mg/l)
0,0	7,02	0,305	2,6	2,4	6,27	5,36	62,63
4,0	7,59	0,474	-	-	6,22	5,53	67,75
8,0	7,80	0,526	-	3,8	5,98	5,20	70,77
12,0	7,91	0,597	-	-	5,76	4,87	73,30
16,0	8,05	0,736	-	5,6	5,49	4,55	76,24
24,0	8,02	1,021	12,0	7,0	5,00	3,65	73,30
28,0	7,91	1,204	-	-	4,79	3,63	70,03
32,0	8,16	1,384	-	9,0	4,42	3,25	64,81
36,0	8,06	1,600	-	-	3,97	2,88	57,72
40,0	8,27	1,926	-	22,0	3,28	2,63	45,76
44,0	8,30	2,182	-	-	2,85	2,43	32,31
48,0	8,48	2,318	30,0	32,0	2,40	2,11	20,31
52,0	8,08	2,572	-	-	2,27	1,52	4,62
56,0	8,10	3,260	-	55,0	1,42	1,41	0,55
64,0	8,30	3,170	-	51,0	0,85	1,31	0,80
72,0	8,27	3,880	51,0	60,0	0,00	1,02	0,42
80,0	8,87	3,613	-	60,0	0,00	0,87	1,02
90,0	8,63	3,679	-	-	0,00	0,40	1,02
100,0	8,76	3,419	53,0	62,0	0,00	0,40	0,00

FIGURA 4.17 [a]: crescimento celular (○) e consumo de glicerol (Δ), [b]: consumo de aminoácidos totais livres (*) e nitrogênio amoniacal (□) com o tempo de cultivo.

Tabela 4.18: Atividade específica da glutamina sintetase com o tempo de cultivo, *in vitro*, de *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 587 em diferentes condições de cultivo.

Glicerol (g/l)	extrato de levedura (g/l)	glutamato (g/l)	t (h)	GS (U/mg de proteína)
(1) 5.0	0,0		11	133
			35	710
			57	295
(7) 5.0	8,0		11	389
			35	507
			57	367
(11) 5.0	4,0	4,0	11	173
			35	506
			57	361

1U = nmol γ -glutamil hidroxamato.min⁻¹

(1) = ensaio 1

(7) = ensaio 7

(11) = ensaio 11

Tabela 4.19: Nodulação e atividade nitrogenase em soja semeada com inóculo a base de *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 587 obtido em diferentes condições de cultivo, média de três valores.

INÓCULO (ensaidio nº)	NODULAÇÃO/PLANTA		ATIVIDADE NITROGENASE * U/g matéria sec nod)
	nº nodulos	mg matéria seca	
1	93 cd	540 cd	35 cd
2	100 bc	471 fg	35 cd
3	93 cd	516 de	25 ef
4	71 e	316 i	56 a
6	113 ab	434 dh	32 de
7	100 bc	484 fg	32 de
8	88 d	502 ef	35 cd
10	124 a	666 a	35 cd
11	106 b	620 b	33 cd
12	92 cd	547 c	48 b
13	92 cd	518 de	40 c
15	112 ab	606 b	57 a
16	103 bc	481 fg	23 f
testemunho	10 f	64 j	14 g

D. M. S.

(Tuckey 5 %)

13

26

7

Medias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado.

* 1U = $\mu\text{moles C}_2\text{H}_2/\text{h}$

Tabela 4.20: Valores da PARTE AEREA de soja semeada com inóculo a base de *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 587 obtido em diferentes condições de cultivo, média de três valores.

INÓCULO (ensaio nº)	MATERIA SECA (g/planta)	NITROGENIO TOTAL (mg/planta)
1	5,94 ^{bc}	174 ^d
2	4,92 ^c	161 ^e
3	5,16 ^{de}	184 ^c
4	3,45 ^f	84 ^f
6	11,33 ^a	356 ^a
7	5,22 ^{de}	175 ^d
8	4,93 ^e	160 ^e
10	5,26 ^b	203 ^b
11	6,02 ^{bc}	198 ^b
12	5,26 ^{de}	164 ^e
13	6,17 ^b	190 ^c
15	5,60 ^{cd}	167 ^e
16	4,99 ^e	161 ^e
Testemunho	1,40 ^g	11 ^g
D.M.S. (Tuckey 5%)	0,50	7

medias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significancia indicado.

5. DISCUSSÃO

5.1 - Necessidades de extrato de levedura

Os ensaios objetivando o melhor entendimento da cinética de crescimento de *Bradyrhizobium japonicum* em cultura submersa, apresentaram diferenças de comportamentos em função das concentrações do extrato de levedura utilizado. A Figura 5.1 apresenta curvas de log da concentração celular em função do tempo de cultivo para ensaios com diferentes concentrações iniciais desse substrato. Na curva correspondente ao ensaio 1 (sem adição de extrato de levedura) observamos uma fase lag de 11 horas. Esse período de latência, normalmente relacionado às necessidades de adaptação do microorganismo ao novo ambiente, nesse caso é explicado pela diferença constitucional do meio de preparação do inóculo (item 3.2) e o utilizado nesse ensaio em particular. Essa fase lag foi seguida de uma fase exponencial de 18 horas de duração, com μ_{max} de $0,024 \text{ h}^{-1}$, entrando em seguida em uma fase linear de velocidade igual a $0,005 \text{ g/l.h.}$ De

FIGURA 5.1: Concentração celular com o tempo de para os ensaios (○) 1; (△) 2; (□) 7 e (*) 8 de diferentes concentrações iniciais de extrato de levedura.

acordo com os resultados apresentados na Tabela 4.1 em nenhum momento o meio de cultura ficou limitado em glicerol ou nitrogênio amoniacal. A presença desses substratos, no entanto, não foi suficiente para que o microorganismo atingisse velocidades de crescimento compatíveis com um cultivo em escala industrial.

O ensaio 2 onde utilizamos 2,0 g/l de extrato de levedura apresentou uma fase logarítmica que estendeu-se por 35 horas com um valor de velocidade específica máxima de crescimento celular de $0,043 \text{ h}^{-1}$. Ao final desse período ocorreu uma diminuição abrupta desse μ_{max} para $0,016 \text{ h}^{-1}$.

Um ponto de inflexão na curva de concentração celular em função do tempo corresponde normalmente, do ponto de vista bioquímico, à limitação de componentes do meio de cultura necessários ao crescimento do microorganismo ou ao acúmulo de produtos resultantes do metabolismo bacteriano. Nesses casos esses produtos se comportam como inibidores de crescimento celular. Assim, a massa celular continua a aumentar enquanto que a velocidade específica de crescimento diminui ao longo do tempo.

Os resultados referentes à utilização de 2,0 g/l de extrato de levedura apresentados na Tabela 4.2 mostram que por ocasião da diminuição brusca de μ_{max} as concentrações de glicerol (4,30 g/l) e nitrogênio amoniacal (51,63 mg/l), tanto quanto no ensaio 1, não

podem ser entendidas como limitantes de crescimento. As concentrações de aminoácidos totais livres (0,57 g/l) para o mesmo instante indicam que ao longo do tempo estes foram requeridos em quantidades maiores do que o glicerol.

Concentrações em torno de 0,5 g/l de extrato são as utilizadas em meios de cultura como o YMB (extrato de levedura - manitol) considerado por autores como BURTON (1967), suficientes para suprir microorganismos da família *Rhizobiaceae* de vitaminas e moléculas como GMPc e AMPc. A análise do consumo de todos os componentes do extrato de levedura demandaria tempo e diferentes metodologias e apesar de considerarmos importante não seria oportuno adentrarmos nesta direção. Em relação ao consumo de extrato nossas análises restringiram-se às determinações de aminoácidos totais livres e às diferentes respostas do crescimento em função das concentrações utilizadas.

A literatura atualmente disponível não registra estudos das necessidades de vitaminas ou biomoléculas específicas para a estirpe 587 em particular. Diante disso, não podemos afirmar que o ensaio 2, por ocasião da diminuição de μ_{max} continha concentrações compatíveis com a continuidade de crescimento nos mesmos níveis de velocidade. De qualquer maneira após esta diminuição abrupta de velocidade, o microorganismo permaneceu por mais de 52 horas de cultivo com um mesmo valor de μ , $0,016 \text{ h}^{-1}$. Esse resultado caracterizou

nitidamente a existência de duas fases exponenciais sucessivas. Isto significa que se 2,0 g/l de extrato não foram suficientes para suprir esse microorganismo em relação a algum nutriente específico estes adaptaram-se rapidamente a uma outra condição de cultivo ainda que para isso tenha diminuído sua velocidade de crescimento. A Figura 5.2 apresenta os valores de velocidade específica de crescimento em função do tempo para o ensaio 2, evidenciando as duas fases exponenciais sucessivas de crescimento celular.

A utilização de concentrações de extrato superiores a 2,0 g/l, ensaios 3, 4, 5 e 6, mostraram-se insuficientes para eliminar a abrupta diminuição de μ_{max} que variou, nesses ensaios, entre 0.014 e 0.021 h⁻¹ na segunda fase exponencial. Nas Tabelas 4.3, 4.4, 4.5 e 4.6 podemos observar que as concentrações de aminoácidos totais livres para os respectivos ensaios nunca foi inferior a 1,60 g/l por ocasião da mudança de fase. Os correspondentes valores de μ_{max} apresentados nas Tabelas 5.1 e 5.2 mostraram-se muito próximos entre si, para cada fase exponencial.

Quando as concentrações de extrato de levedura foram elevadas à 8,0 e 10,0 g/l, (ensaios 7 e 8), os valores de μ_{max} atingiram 0,050 h⁻¹ na primeira e 0,026 h⁻¹ na segunda fase exponencial de crescimento. Observa-se na Figura 5.1 as diferentes retas que caracterizam as duas fases exponenciais de crescimento obtidas nesses

FIGURA 5.2: Velocidade específica* de crescimento celular em função do tempo de cultivo para o ensaio 2.

* calculada segundo LE DUY & ZAJIC (1973).

Tabela 5.1: Velocidade específica máxima de crescimento celular da primeira fase exponencial para as diferentes condições de ensaio.

ENSAIO	t (h)	μ_{max} (h ⁻¹)	r
1	11,0 a 39,0	0,024	0,955
2	0,0 a 35,0	0,043	0,998
3	0,0 a 33,0	0,043	0,990
4	0,0 a 33,0	0,044	0,996
5	0,0 a 31,0	0,044	0,998
6	0,0 a 37,5	0,042	0,999
7	0,0 a 38,0	0,050	0,986
8	0,0 a 46,0	0,050	0,990
9	0,0 a 47,0	0,044	0,990
10	0,0 a 44,5	0,046	0,997
11	0,0 a 44,5	0,046	0,997
12	0,0 a 38,0	0,043	0,998
13	0,0 a 38,0	0,035	0,998
14	0,0 a 37,5	0,042	0,999
15	0,0 a 37,5	0,037	0,999
16	0,0 a 32,0	0,043	0,992
17	0,0 a 44,0	0,042	0,994

Tabela 5.2: Velocidade específica máxima de crescimento celular da segunda fase exponencial para as diferentes condições de ensaio.

ENSAIO	t (h)	$\mu_{\max}$ (h ⁻¹)	r
1	não há	(-)	
2	35,0 a 87,0	0,016	0,976
3	33,0 a 78,0	0,017	0,970
4	33,0 a 78,0	0,014	0,998
5	31,0 a 71,0	0,021	0,998
6	37,5 a 86,5	0,018	0,994
7	38,0 a 70,0	0,026	0,989
8	46,0 a 62,0	0,026	0,992
9	47,0 a 90,0	0,018	0,995
10	44,5 a 68,5	0,021	0,999
11	44,5 a 76,5	0,020	0,985
12	38,0 a 95,0	0,017	0,995
13	38,0 a 70,0	0,013	0,987
14	37,5 a 93,5	0,017	0,998
15	37,5 a 105,5	0,018	0,995
16	32,0 a 56,0	0,025	0,982
17	44,0 a 72,0	0,019	0,997

(-) = não determinado

ensaio. Observa-se também a atenuação na abrupta diminuição de velocidade que caracteriza segunda fase exponencial dos ensaios 7 e 8 quando comparados com o ensaio 2. Além disso ocorreu um prolongamento da primeira fase exponencial que para o ensaio 8 correspondeu em até 15 horas quando comparado com os ensaios onde as concentrações de extrato foram inferiores a 10.0 g/l. Esses resultados mostram claramente que o microorganismo respondeu positivamente ao incremento de extrato de levedura. Nesse sentido a caracterização da cinética de crescimento em duas fases exponenciais com μ_{max} bastante distintos pode ser relacionada a limitação de determinados componentes do extrato. Nesse ponto ressaltamos, como pode ser verificado nas Tabelas 4.3 à 4.8, nunca ocorreu um esgotamento de aminoácidos totais livres, ou seja, limitação de nitrogênio orgânico.

5.2 - Inibição de crescimento celular

A limitação de componentes do extrato não deve ser entendida como fator único na caracterização desses perfis de crescimento. A possibilidade de estar ocorrendo concomitantemente um processo de inibição de crescimento por metabólitos celulares não deve ser descartada. Quando comparamos os ensaios 7 e 8 observamos que o acréscimo de 25% de extrato não repercutiu em

mudança nos valores de μ_{max} para a primeira ou segunda fase. Isso demonstra que venceu-se as barreiras de limitação sem no entanto, resolver o problema de diminuição brusca de μ_{max} .

As dificuldades que envolvem a identificação e quantificação de um metabólito inibidor de crescimento bacteriano, especialmente em se tratando de um meio de cultura complexo como o utilizado, não permitiu desenvolver investigações nessa direção. Ainda assim, tomando como referência trabalhos descritos na literatura, conseguiu-se eliminar algumas hipóteses de inibição. Alguns ensaios preliminares, tentando reproduzir a reversão do processo inibitório, identificado por SHERWOOD (1972) quando da adição de cálcio ao meio de cultivo (trabalho citado em nossa revisão - item 2.2.1) demonstrou não ser esse o problema. Também foi feita uma avaliação teórica das quantidades de sais minerais utilizadas nos ensaios e as mesmas mostraram-se compatíveis com o crescimento de microorganismos desse gênero. Isso levou a descartar-se a possibilidade de inibição de crescimento por íons como os citados na revisão de literatura.

Uma hipótese a ser considerada é a possível inibição de crescimento como consequência da produção de polissacarídeos por esse microorganismo. A produção de carboidratos superficiais por bactérias do gênero *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* é comumente associada ao

processo de infecção na planta hospedeira. Entre esses carboidratos de superfície podem ser citados os polissacarídeos extracelulares, polissacarídeos capsulares, lipopolissacarídeos e glucanas periplasmáticas (MILLER et alii, 1990). A produção desses carboidratos por essas células, quando cultivadas *in vitro*, podem levar a um aumento de viscosidade dificultando o transporte de nutrientes, e a transferência de gases no meio de cultivo assim como, o transporte de nutrientes para dentro da célula. CURTOIS et alii (1986) e MODY (1989) investigaram a produção de polissacarídeos hidrossolúveis em diferentes condições de cultivo. Observaram mudanças na composição química do polissacarídeo em função do meio de cultivo e da fase de crescimento. Para a estirpe 587 foi observado aglomeração de células marcadamente depois da primeira fase exponencial de crescimento celular nas condições de ensaio realizadas. A produção de polissacarídeo já foi bem caracterizado por MILLER et alii (1990) para outra espécie de *Bradyrhizobium*. O que precisa ser comprovado é se a composição e os níveis de concentração dessas substâncias produzidos pela estirpe 587 são efetivamente inibidores de crescimento celular.

5.3-Fator de conversão substrato a célula

Os valores de fator de conversão substrato a

célula para S_1 e S_2 dos ensaios 2 à 8, apresentados nas Tabelas 5.3 e 5.4, mostraram uma diferença no comportamento desses parâmetros em função da fase de cultivo. Na primeira fase exponencial de crescimento $Y_{x/s1}$ foi sempre superior a 0,64 g/g enquanto $Y_{x/s2}$ foi igual ou inferior a 0,52 g/g. Na segunda fase exponencial a situação se inverteu, $Y_{x/s1}$ foi menor ou igual a 0,61 g/g e $Y_{x/s2}$ foi maior que 0,54 g/g.

O fator de conversão para glicerol em cultivo de *Escherichia coli* é 0,50 g/g (ATKINSON & MAVITUNA, 1983). Não encontrou-se registros de valores desse parâmetro para *Bradyrhizonium japonicum* ou de algum outro microorganismo do mesmo gênero. Autores como BALATTI & MAZZA (1978) descreveram o glicerol como sendo a fonte de carbono utilizada por esse microorganismo em meio de cultivo semelhante ao utilizado nos ensaios. Questiona-se essa afirmação em função dos resultados até aqui obtidos. As Figuras 5.3a e 5.3b apresentam as regressões lineares, de X em função de S_1 e em função de S_2 , utilizados na determinação de $Y_{x/s1}$ e $Y_{x/s2}$ para os ensaios 5 e 7. Nota-se nitidamente uma mudança da direção dessas retas num determinado tempo de cultivo.

Da mesma forma que PRADELLA et alii (1992) acredita-se que esses valores de fator de conversão para glicerol resultam da utilização de outras fontes de carbono presentes no extrato de levedura. Mais que isto, os resultados obtidos indicam uma preferência de determinada

Tabela 5.3: Fatores de conversão substrato a célula na primeira fase exponencial de crescimento para as diferentes condições de ensaio.

ENSAIO	$Y_{x/s1}$ (g/g)	r	$Y_{x/s2}$ (g/g)	r
1	0,52	0,955	(-)	
2	0,76	0,998	0,52	0,999
3	0,64	0,990	0,41	0,966
4	0,69	0,994	0,43	0,956
5	0,93	0,974	0,29	0,988
6	0,65	0,998	0,30	0,985
7	0,92	0,995	0,32	0,994
8	0,83	0,998	0,34	0,988
9	0,62	0,992	0,37	0,974
10	0,63	0,989	0,36	0,989
11	0,56	0,992	0,44	0,987
12	0,65	0,994	0,45	0,998
13	0,51	0,994	0,55	0,999
14	0,69	0,992	0,56	0,984
15	0,73	0,976	0,86	0,987
16	0,40	0,998	0,36	0,989
17	0,53	0,997	0,53	0,984

(-) = não determinado

Tabela 5.4: Fatores de conversão substrato a célula na segunda fase exponencial de crescimento para as diferentes condições de ensaio.

ENSAIO	Yx/S1 (g/g)	r	Yx/S2 (g/g)	r
1	0,52	0,984	(-)	
2	0,53	0,990	2,43	0,964
3	0,48	0,995	1,86	0,966
4	0,39	0,994	1,29	0,903
5	0,61	0,999	0,70	0,946
6	0,50	0,993	0,86	0,911
7	0,48	0,992	0,68	0,949
8	0,55	0,973	0,54	0,947
9	0,46	0,997	0,89	0,958
10	0,41	0,998	0,60	0,982
11	0,45	0,996	0,59	0,996
12	0,47	0,957	0,59	0,976
13	0,40	0,997	0,39	0,993
14	0,58	0,996	1,11	0,994
15	0,66	0,996	0,62	0,978
16	0,43	0,995	0,50	0,973
17	0,56	0,987	1,34	0,945

(-) = não determinado

FIGURA 5.3 : Fatores de conversão substrato a célula para glicerol [S1] e aminoácidos totais livres [S2], ensaios 5 (a) e 7 (b).

fonte de carbono para cada uma das diferentes fases exponenciais.

SHU & SHULER (1989) desenvolveram um modelo matemático para o crescimento de *Escherichia coli* em meio de cultura contendo glicose e glutamina. Nesse trabalho observaram um aumento do rendimento da glicose quando a glutamina estava em excesso o que, segundo eles, deveu-se a uma contribuição dos carbonos da glutamina com fonte de carbono e energia.

Nos ensaios apresentados as concentrações de nitrogênio amoniacal ao longo do tempo, Tabelas 4.1 à 4.8, mostraram que a partir de 2,0 g/l de extrato de levedura, (Ensaio 2) o consumo de aminoácidos totais livres pode ser correlacionado a liberação de amônio no meio de cultivo. Observou-se nesses casos um rápido aumento de concentração atingindo um máximo, 190,72 mg/l para o ensaio 8, ao fim da primeira fase exponencial de crescimento. A Figura 5.4 apresenta simplificadaamente quatro diferentes tipos de degradação de aminoácidos. Três deles têm em comum o processo de desaminação.

O processo de desaminação constatado em nossos ensaios, independentemente de qual tipo seja, evidencia a utilização de aminoácidos presentes no meio enquanto fornecedor de esqueletos carbônicos, especialmente na primeira fase exponencial. Os resultados obtidos não nos permite afirmar no entanto, se esses esqueletos carbônicos são preferencialmente utilizados

Figura 5.4: degradação de aminoácidos segundo ARNAUD & GUIRAUD (1985).

como fonte de carbono a ser incorporado a estrutura celular ou como fonte de energia.

5.4 - Substituição de extrato de levedura por aminoácidos específicos

A possível preferência do microorganismo por um aminoácido específico ou de um grupo de aminoácidos não passou despercebida. Quando PRADELLA et alii (1989) adicionaram glutamato monossódico ao meio de cultivo de *Bradyrhizobium japonicum* em fermentador acreditavam em uma limitação de nitrogênio na forma orgânica. Nessa ocasião a escolha do glutamato foi em função das altas concentrações desse aminoácido no extrato de levedura, 10% segundo PEPPLER (1983). Em um meio contendo água de levedura 30 g/l (concentração correspondente a 4,0 g/l de extrato de levedura em termos de velocidade de crescimento para a estirpe 587) adicionou-se 2,0 g/l de glutamato monossódico, ao fim da primeira fase exponencial. A adição desse aminoácido resultou num valor de μ_{max} para a segunda fase exponencial de $0,037h^{-1}$ contra um μ_{max} de $0,013 h^{-1}$ para o ensaio nas mesmas condições sem a adição de glutamato (PRADELLA et alii, 1989). Essa melhora no μ_{max} da segunda fase, no nosso entender, deve ser interpretada com cuidado enquanto comprovação da hipótese de limitação de nitrogênio orgânico. Entende-se que uma

análise do perfil de consumo de aminoácidos e /ou níveis de nitrogênio amoniacal deveria ter sido realizada para uma melhor avaliação da função do glutamato adicionado.

Buscando um melhor entendimento do papel do extrato de levedura no crescimento de *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 587 realizaram-se ensaios onde esse substrato foi parcialmente substituído por glutamato ou valina. Glutamato foi escolhido não só em função da melhora de crescimento obtida por PRADELLA et alii (1989) mas também por ser este aminoácido considerado, como descrito no item 2.3, importante molécula no metabolismo celular. Valina foi escolhido por ser precursor de succinato, ácido orgânico também utilizado por nós e que será discutido nos próximos itens.

As substituições parciais de extrato por glutamato monossódico foram em torno de 30, 50, 70 e 94% peso/peso de maneira a manter as concentrações iniciais de aminoácidos totais livres em torno de 8,0 g/l. As substituições por valina foram 30 e 50%. Em termos de crescimento observamos (Tabelas 5.1 e 5.2) que nenhuma das substituições resultou em velocidade específica nos níveis do ensaio 7 onde utilizou-se 8,0 g/l de extrato. Por outro, lado substituições por glutamato de até 50%, (ensaio 10 e 11) os μ_{max} foram superiores a todas as outras condições em que utilizou-se concentrações inferiores a 8,0 g/l de extrato. Comparando os ensaios 5 e 7 observou-se que o aumento de 2,5 g/l de extrato de

levedura no meio levou o $\mu_{\max}$ de 0,044 para 0,050 h^{-1} na primeira fase e de 0,019 para 0,026 h^{-1} na segunda fase exponencial. Ocorreu também um prolongamento da primeira fase por período de 5 horas. Quando se compara o ensaio 5 com o ensaio 10 observa-se que a adição de 2,5g/l de glutamato levou o $\mu_{\max}$ de 0,044 a 0,046 h^{-1} na primeira e de 0,019 para 0,021 h^{-1} na segunda fase exponencial. Nesse caso o prolongamento da primeira fase exponencial foi por 11,5 horas. Num primeiro instante essas diferenças podem parecer pouco importante porém, trata-se aqui de um microorganismo bastante lento e portanto em termos de produção industrial muito susceptível a contaminações. Nesse sentido qualquer melhora de velocidade específica assim como um prolongamento de tempo nessa velocidade significa maiores concentrações celulares em menor tempo de cultivo.

Em relação as substituições parciais por valina, ensaios 14 e 15 os resultados obtidos não acrescentaram informações importantes em relação ao papel do extrato de levedura no crescimento do microorganismo. Ficou apenas caracterizado uma preferência por glutamato em relação à valina por essa estirpe.

5.5 - Perfil de nitrogênio amoniacal e mecanismo de regulação da glutamina sintetase

O glutamato, já citado anteriormente como

precursor de biomoléculas, também é considerado importante regulador das vias de assimilação de nitrogênio em procariotos. O'GARA & SHANMUGAM (1976b) observaram que a adição de glutamato ao meio de cultivo bloqueou a assimilação de NH_4^+ por repressão da enzima glutamina sintetase. Nesse mesmo trabalho o tempo de geração do microorganismo em questão, *Rhizobium trifolii*, foi de 4,6 horas quando cultivado com glutamato contra 8,0 horas quando cultivado com amônio.

O perfil de nitrogênio amoniacal para os ensaios onde o extrato de levedura foi substituído parcialmente por glutamato, Figuras 4.10 à 4.13 (b) mostrou-se diferenciado dos demais. Nessas condições de cultivo o perfil de consumo de aminoácidos foi semelhante aos demais porém, a liberação de amônio se deu de forma quase linear ao longo do tempo. As concentrações máximas, 138 mg/l, foram atingidas no final do ensaio, em torno de 83 horas de cultivo. Relembramos que para os ensaios 3 à 8 o pico de concentração de amônio se deu ao fim da primeira fase exponencial. A Figura 5.5 compara os diferentes perfis de nitrogênio amoniacal retratando as diferenças acima discutidas. As concentrações mais elevadas de NH_4^+ resultaram em diferentes alcalinidades sem no entanto resultar em prejuízo de crescimento. Os perfis de pH ao longo dos cultivos mostram que não houve uma correlação direta desses com as mudanças de fase ou concentrações celulares obtidas.

FIGURA 5.5: Concentração de nitrogênio amoniacal com o tempo de cultivo para os ensaios (Δ) 5; (□) 8 e (■) 11.

Avaliou-se a atividade intracelular da enzima glutamina sintetase com a intenção de relacionar essas atividades aos perfis de crescimento obtidos. A Tabela 4.18 resume os resultados obtidos nos diferentes tempos de dosagem para os ensaios 1, 7 e 11. Nas três condições observamos um pico de atividade no tempo anterior (35 horas) à abrupta diminuição de velocidade específica de crescimento. No tempo 57 horas, correspondente à fase linear de crescimento do ensaio 1, ocorreu uma queda de atividade específica em torno de 60%. Para o ensaio 7 e 11 esse mesmo tempo correspondeu a metade da segunda fase exponencial e nesse caso apresentou uma queda de atividade em torno de 30%. A atividade específica no ensaio 1 para a primeira fase exponencial é 30% superior quando comparada aos ensaios 7 e 11. Essa diferença pode ser explicada pela ausência de aminoácidos no meio de cultivo do ensaio 1, condição que requer uma maior atividade da enzima glutamina sintetase para suprir a célula de nitrogênio.

FUCHS & KEISTER (1980) avaliaram a atividade da glutamina sintetase desta mesma espécie de microorganismo em suas diferentes frações, GSI e GSII. Os valores de atividade para GSI permaneceram constantes durante os diferentes ciclos ou fases de crescimento. A atividade da fração GSII variou em função das concentrações de nitrogênio ou aminoácidos. Os autores sugeriram que a perda de atividade durante a fase

exponencial deveu-se a um aumento intracelular de amônio. As concentrações intracelulares de amônio não foram avaliadas, no entanto, as maiores concentrações desse íon no meio, por volta de 200mg/l, correspondeu à metade da concentração adicionada por esses autores quando observaram a variação de atividade nas diferentes fases de crescimento. Nos ensaios 7 e 11 em particular, não se pode avaliar a diminuição da atividade enzimática como uma consequência das concentrações de nitrogênio amoniacal no meio, 99,47 mg/l e 118,55 mg/l. Essas concentrações são ainda inferiores às observadas no ponto em que se obtiveram os maiores valores da atividade específica, 151,64 mg/l para o ensaio 7 e 97,48 mg/l para o ensaio 11. A Tabela 5.5 apresenta as diferentes concentrações de nitrogênio amoniacal, atividade enzimática e velocidade específica máxima de crescimento para a primeira e segunda fase exponencial. Os valores de μ_{max} observados nesta tabela mostram que para as condições ensaiadas a mudança de fase de crescimento não estão diretamente relacionadas a atividade específica da glutamina sintetase. Isso em função dos mesmos valores de atividade enzimática nos ensaios 7 e 11 - primeira fase exponencial - para diferentes μ_{max} . Em outras palavras, com esses resultados não se pode responsabilizar a regulação da via glutamina sintetase pela mudança de fase de crescimento celular.

Tabela 5.5: Atividade específica da glutamina sintetase, μ_{max} e nitrogênio amoniacal para diferentes tempos de cultivo na primeira e segunda fase fase exponencial de crescimento celular.

Ensaio	FEC	ativ.especifica (U/mg proteína)	μ_{max} (h ⁻¹)	NH ₄ ⁺ (mg/l)
1	1	710	0,024	25,84
7	1	507	0,050	151,64
	2	367	0,026	99,47
11	1	506	0,046	97,48
	2	361	0,020	118,55

FEC = fase exponencial de crescimento celular

5.6 - Consumo de glicerol

O glicerol, outro dos substratos utilizados em nossos ensaios, mostrou-se essencial para o crescimento do microorganismo. Examinando as Tabelas 4.7, 4.8, 4.10 e 4.11 podemos observar que no momento em que ocorreu a limitação de glicerol cessou o crescimento celular. O aumento de concentrações de glicerol contudo, não melhorou o crescimento, ao contrário foi prejudicial. O ensaio 9, onde utilizamos 8,0 g/l de extrato de levedura e 10,0 g/l de glicerol, resultou num mesmo comportamento em relação aos fatores de conversão substrato à células quando

comparado aos ensaios com 5,0 g/l de glicerol. Os valores de μ_{max} para a primeira e segunda fase porém, foram inferiores aos do ensaio 7 de mesma concentração de extrato. A segunda fase exponencial foi seguida de uma fase linear de velocidade igual a 0,010 g/l.h, permanecendo nessa condição por aproximadamente 50 horas de cultivo. Observou-se nesse ensaio tanto um aumento de massa celular quanto um aumento do número de células viáveis, quando comparado às outras condições. Essa evidente diminuição de μ_{max} em função do aumento de concentração de glicerol poderia ser explicada por uma inibição por substrato ou por um acúmulo de polissacarídeos (já citado no item 5.2) que estaria sendo produzido em função de um desvio de metabolismo resultante do excesso dessa fonte de carbono. Evidentemente são hipóteses a serem comprovadas. Se verdadeiras acredita-se que uma maneira de reverter o problema seria o cultivo do microorganismo por processo fermentativo do tipo *Fed Batch* onde o glicerol seria adicionado ao longo do tempo. Dessa maneira não se tornaria limitante e nem em concentrações excessivas a ponto de induzir a produção do inibidor.

5.7 - Utilização de ácidos orgânicos como fonte de carbono

A capacidade de bacteróides em utilizar

ácidos orgânicos tem sido associada a capacidade efetiva de fixação biológica de nitrogênio atmosférico, processo conhecidamente dispendioso em termos de custos energéticos para a célula, (LAFONTAINE et alii, 1989; BIRKENHEAD et alii, 1988).

O envolvimento do glutamato no metabolismo respiratório de *Bradyrhizobium japonicum* foi bem caracterizado por SALMIEN & STREETER (1987). A adição de 1 μ mol de glutamato ou malato resultou em 25% de aumento na velocidade de redução de acetileno. Nessas condições a evolução do CO₂ marcado demonstrou ser originado do glutamato e de ácido orgânico como o malato. Essas análises confirmaram a utilização desses substratos como carbono respiratório. ALLEN & ELKAN (1990) obtiveram resultados semelhantes para o aspartato e a asparagina.

Rizóbio cultivado enquanto célula livre difere morfológica e fisiologicamente do microorganismo quando em simbiose, ocasião em que este assume a forma de bacteróide. Consciente dessas diferenças seria imprudente extrapolar os resultados obtidos em estudos desenvolvidos com bacteróides para explicar os resultados obtidos com o cultivo da bactéria enquanto célula livre. Por outro lado as evidências de que o extrato de levedura contribui no crescimento também enquanto fornecedor de fonte de carbono levaram a testar-se a utilização de ácidos orgânicos. Os ácidos escolhidos foram $\Delta\alpha$ -cetoglutárico e succínico. O ácido α -cetoglutárico tem como precursor o glutamato

enquanto o succínico tem como precursor a valina. As concentrações utilizadas foram calculadas para suprir o meio da mesma quantidade de carbono que supriria 2,5g/l dos seus aminoácidos precursores.

Os parâmetros cinéticos desses ensaios, (16 e 17) apresentados nas Tabelas 5.1 e 5.2 mostram que a utilização de succinato foi mais eficiente em termos de atenuação da inclinação da reta por ocasião da mudança de fase. O μ_{max} foi de $0,043\text{ h}^{-1}$ para a primeira e $0,025\text{ h}^{-1}$ para a segunda fase. O ácido α -cetoglutárico não proporcionou atenuação nos mesmos níveis variando de $0,042\text{ h}^{-1}$ para $0,019\text{ h}^{-1}$ na segunda fase. Nas duas substituições os μ_{max} não foram os mesmos dos ensaios com seus aminoácidos correspondentes (ensaios 10 e 14). Quando se compara os ensaios 16 e 17 com o ensaio 5 onde também utilizou-se 5,5g/l de extrato sem a adição de aminoácidos ou ácidos carboxílicos, observa-se que a utilização destes levou a melhora em termos de μ_{max} para a segunda fase exponencial. Ao contrário de TULLY (1985), os valores de μ_{max} obtido com a utilização de glutamato foram maiores do que com succinato.

POOLE et alii (1985) cultivaram *Rhizobium phaseoli* em meio com glicose e glutamato e observaram que 70% dos aminoácidos transportados foram incorporados ao ciclo tricarboxílico enquanto que apenas 1.4 % da leucina transportada foi detectada no mesmo ciclo. Percebe-se aqui uma nítida preferência por um determinado aminoácido.

A preferência por aminoácidos específicos pode ser a resposta em relação às necessidades de concentrações maiores de extrato de levedura para atingir valores de μ_{max} mais elevados ao mesmo tempo em que os aminoácidos totais livres (ensaio 3, 4, 5, 7 e 8) mostraram-se presentes por ocasião da mudança de fase. A utilização desses esqueletos carbônicos pode representar uma economia de energia para a célula visto que são introduzidas diretamente no ciclo de Krebs onde podem resultar na formação de ATP via cadeia respiratória ou em precursores de outras biomoléculas importantes no metabolismo celular.

5.8 - Produtividade celular global

Em termos de produção industrial a produtividade é o parâmetro mais importante uma vez que ele pode refletir o tempo envolvido com o cultivo. Altas produtividades celulares podem conduzir a diminuição de tamanho e/ou número de reatores que em última instância significa diminuição de custos.

Os valores de produtividade celular global apresentados na Tabela 5.6 mostram-se diferentes em função das condições de ensaio em que foram obtidas. Observou-se que o aumento de extrato de levedura (0,0 à 8,0 g/l) refletiu-se num aumento de produtividade celular

Tabela 5.6: Produtividade celular global obtida com as diferentes condições de ensaio.

ENSAIO	Prod (g/l.h)	ΔP
1	0,007	0,000
2	0,019	0,001
3	0,033	0,002
4	0,033	0,002
5	0,030	0,002
6	0,033	0,002
7	0,043	0,002
8	0,043	0,002
9	0,039	0,002
10	0,042	0,002
11	0,042	0,002
12	0,033	0,002
13	0,014	0,001
14	0,038	0,002
15	0,034	0,002
16	0,027	0,001
17	0,043	0,002

ΔP = erro relativo que afeta a
produtividade segundo BORZANI, 1985

global. Porém de 4,0 a 6,0 g/l de extrato esses valores permaneceram muito próximos e em torno de 0,033 g/l.h. O ensaio 9, ao contrário do esperado, resultou em produtividade nos mesmos níveis do ensaio 7 onde utilizou-se a mesma concentração de extrato porém, metade da concentração de glicerol. O ensaio 9 no entanto, resultou em maior concentração celular (6.005 g/l) quando comparado com as outras condições testadas. Nos ensaios onde efetuaram-se substituições parciais do extrato por glutamato monossódico, até 50% de substituição não notou-se diferenças de comportamento quando comparados ao ensaio 7. Do ponto de vista da produção industrial esse fato é de grande interesse. A produção industrial de inoculante a base de *Bradyrhizobium japonicum*, como já citado anteriormente, utiliza-se de água de levedura em substituição ao extrato. O preparo dessa água de levedura, quando de maneira adequada, pode envolver um sistema de filtração por filtro prensa (PRADELLA, 1989) ou um processo de centrifugação. Essas operações significam obviamente aumento de custos operacionais. Nesse sentido a substituição parcial dessa água de levedura por glutamato pode significar diminuição desses custos. Se considerarmos a utilização de extrato e não de água de levedura, a substituição por glutamato também significa diminuição de custos visto que o glutamato monossódico utilizado poderá ser de grau alimentício e este é normalmente muito mais barato que o extrato de levedura.

Substituições do extrato por porcentagens maiores de glutamato ou por outro aminoácido como a valina levaram a produtividades menores. Mesmo assim, os ensaios com valina resultaram em produtividades maiores que as obtidas com concentrações de extrato inferiores a 8.0 g/l.

A substituição de extrato por ácido succínico não só resultou em baixa produtividade como também na diminuição do número de células viáveis ao final do ensaio. A Tabela 4.16 mostra para este ensaio um número de células totais crescentes contra um número de células viáveis decrescente o que em outras palavras significa morte celular. A substituição do extrato por ácido α -cetoglutarico ao contrário, resultou em produtividade celular nos mesmos níveis que o ensaio 7. Comparando-se a produtividade do ensaio 5, onde utilizou-se 5.5 g/l de extrato de levedura, à produtividade do ensaio com esse ácido orgânico fica bastante claro a preferência ou necessidade de outra fonte de carbono no meio de cultivo além do glicerol.

É importante destacar que todas as condições aqui avaliadas, exceto pelos ensaios 1 e 16, resultaram em 10^{10} células viáveis por mililitro de caldo fermentado. A legislação vigente no país recomenda uma concentração inicial de 10^9 células viáveis por grama de inoculante portanto, as concentrações obtidas permitem a formulação de um inoculante, sem a necessidade de se concentrar esse caldo para atingir o número de células adequados em cada

dose de inoculante produzido.

5.9 - Eficiência simbiótica

* Especificidade / infectividade

O grau de eficiência simbiótica é observado entre espécies de bactérias com seus respectivos hospedeiros portanto, para avaliar o grau de eficiência deve ser considerado a especificidade da planta hospedeira (DATE, 1976). Esse aspecto não mereceu preocupação visto que trabalhou-se com uma linhagem, SEMIA 587, comprovadamente relacionada a soja (*Glicine max*). Esta é uma das estirpes recomendadas no Brasil pela RELARE (Rede de laboratórios de Referência para recomendação de estirpes).

A infectividade de bactérias dos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* não necessariamente resulta no estabelecimento de uma simbiose eficiente no tocante a fixação do N₂ atmosférico. Vencida a etapa de penetração, através do cordão infectivo, faz-se necessário uma multiplicação do microorganismo dentro do nódulo e a indução da formação da nitrogenase e leghemoglobina. Superadas essas etapas se iniciará a redução do N₂ atmosférico, (PERES & SHUHET, 1986).

De acordo com a Tabela 4.19 os inóculos produzidos em diferentes condições de cultivo não se

manifestaram prejudiciais a formação de nódulos. Segundo NUTMAN (1981) o número de nódulos por planta evidencia melhor os aspectos de especificidade e competitividade do que eficiência. Nesse caso particularmente, a competitividade é um parâmetro não avaliado visto que trabalhou-se em casa de vegetação e em condições tais (silica-vermiculita estéril) que o microorganismo não precisou superar nenhum tipo de competição em relação a outros microorganismos de solo.

Quanto ao peso nodular, Tabela 4.19, os valores obtidos para a maior concentração de extrato de levedura, ensaio 8, mostrou-se significativamente menor em relação ao ensaio 1 onde não se utilizou esse substrato. Note-se porém, que todos os valores obtidos desse parâmetro foram superiores a 300 mg. Este valor é considerado por DATE (1976) satisfatório em termos de potencial de nodulação. Ficou demonstrado portanto que as condições de cultivo aqui avaliadas não influenciaram negativamente o estabelecimento do processo simbiótico.

* Parte aérea

A avaliação de N-total da planta, outro caracter que pode medir o grau de eficiência simbiótica (NEVES et alii, 1985) apresentado na Tabela 4.20, mostrou diferenças significativas para algumas diferentes condições testadas. No entanto quando compara-se os ensaios 1 e 7, observa-se que não ocorreu diferenças significativas entre as duas condições. Acredita-se

portanto, que os diferentes resultados obtidos não são consequência das diferentes concentrações de extrato de levedura utilizadas no cultivo dos inóculos. A Tabela 4.19 apresenta os valores de atividade específica da nitrogenase. O menor valor obtido, 23 μ moles de C_2H_4 /h.grama de matéria seca de nódulo, corresponde ao ensaio 16. Este valor no entanto, difere significativamente do testemunho mostrando que mesmo para essa condição ocorreu fixação biológica de nitrogênio. O obtido com o ensaio cultivado em maior concentração de extrato de levedura (ensaio 8) não difere significativamente do ensaio 1 onde o inóculo foi cultivado sem extrato.

As concentrações de nitrogênio amoniacal após 70 horas de cultivo, momento em que o material foi coletado para ser utilizado como inóculo, eram 4,24 mg/l para o ensaio 1 e 108,02 mg/l para o ensaio 8. Para o ensaio 4 que apresentou maior valor de atividade da nitrogenase, a concentração de nitrogênio amoniacal era de 4,59 mg/l enquanto que para o ensaio 16 de menor atividade era em torno de 8.47. Observou-se portanto, ao contrário do constatado por SKINNER et alii (1977), STRIDJON (1966) e RAO (1982), que elevadas concentrações de extrato de levedura ou aminoácidos como glutamato no meio de cultura, assim como diferentes concentrações de nitrogênio amoniacal não são prejudiciais a fixação biológica de nitrogênio atmosférico.

6 - CONCLUSÕES

- O extrato de levedura mostrou-se essencial no cultivo de *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 587 quando se almeja concentrações celulares elevadas e aumento de produtividade.
- A limitação de aminoácidos específicos presentes no extrato de levedura contribuem para a abrupta diminuição da velocidade específica de crescimento celular resultando numa cinética de crescimento diferente do habitualmente observado para outros microorganismos.
- O extrato de levedura contribui com o crescimento celular enquanto fonte de nitrogênio orgânica e enquanto fonte de carbono.
- O glicerol apresentou-se essencial para o crescimento celular enquanto fonte de carbono mas também pode ter sido em função da forma e concentrações utilizadas, responsável pela inibição de crescimento .

-Dentro das condições avaliadas observou-se que as concentrações do extrato de levedura podem ser diminuídas sem prejuízo da produtividade celular global, desde que o meio seja suplementado com aminácido do tipo glutamato. Para a melhor condição de ensaio, 8,0 g/l de extrato, essa substituição pode ser em até 50% .

- Os parâmetros cinéticos obtidos quando da utilização do ácido α -cetoglutarico em substituição a uma fração do extrato é indicio de que tanto este como seu aminoácido precursor, glutamato, desempenham na célula cultivada *in vitro* as mesmas funções, reportadas na literatura, para os bacteróides.

- O cultivo do microorganismos em concentrações elevadas de extrato de levedura ou nitrogênio amoniacal não se mostrou prejudicial para o processo de fixação biológica de nitrogênio, nas condições ensaiadas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, G. C. & ELKAN, G. Growth, respiration and polypeptide patterns of *Bradyrhizobium* sp. (Arachis) Strain 3G4b20 from succinate or oxygen-limited continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* Washington, 56(4):1025-1032, 1990.
- AOCS - AMERICAN OIL CHEMISTRY' SOCIETY. Glicerol, a 6-51. Illinois, Section E, (Adaptado IPT), 1982.
- AMRHEIN, N. The current status of cAMP in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, Stanford, 28:123-132, 1978.
- ARIAS, A. & MARTINEZ-DRETS, G. Glicerol metabolism in *Rhizobium*. *Can. J. Microbiol.*, Ottawa, 22:150-153, 1976
- ARNAUD, A. & GUIRAUD, J. P. Bioquímica microbiana. In: SCRIBAN, R., ed. *Biotecnologia*. São Paulo, Editora Manole, 1985. cap. 2, p. 47-102.

- ATKINSON, B & MAVITUNA, F. Stoichiometric aspects of microbiol metabolism. IN: BIOCHEMICAL ENGINEERING AND BIOTECHNOLOGY HANDBOOK. Hong Kong, Nature Press, 1983, p. 183.
- BALATTI, A. P. Inoculants Production. In: *Proceedings of the workshop on rhizobia/legume inoculants*, ed. Jardim Freire, J.R. Porto Alegre, 1985 . p. 157-177.
- BALATTI, A. P. & MAZZA, L. A. Producción de inoculantes para leguminosas. *Rev. Lat-Amer. Microbiol.*, Mexico, 20:20-93,1978.
- BEARDSLEY, R.E. Amino acid cross resistance in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.*, Baltimore, 84:1237-1240, 1962.
- BERNLOHR, R. W. & HADDOX, M. K. Cyclic guanosine 3'5'-monophosphate in *Escherichia coli* and *Bacillus licheniformis*. *J. Biol. Chem.*, Bethesda, 249(13):4329-4331, 1974.
- BIRKENHEAD, K.; MANIAN, S. S.; O'GARA, F. Dicarboxylic acid transport in *Bradyrhizobium japonicum*: Use of *Rhizobium meliloti* dct gene(s) to enhance nitrogen fixation. *J. Bacteriol.*, Baltimore, 170(1):184-189, 1988.

BOIARDI, J. L.; & ERTOLA, R. J. *Rhizobium* biomass production in batch and continuous culture with a malt-sprouts medium. *MIRCEN J.*, Buenos Aires, 1:163-171, 1985.

BONOMI, A. Programa computacional para a determinação de parâmetros cinéticos de crescimento de *Rhizobium* sp. In: Desenvolvimento de tecnologia para a produção industrial de inoculantes *Rhizobium* sp. São Paulo, IPT, Agrupamento de Biotecnologia, 1987. p.98 - Apêndice 1 (*Relatório técnico* Nº 26.676).

BONOMI, A. Technological development for the industrial production of *Rhizobium japonicum*. *ACIESP*, São Paulo, 51(2):209-305, 1986.

BORZANI, W. Avaliação do erro que afeta o valor de velocidade calculado a partir da curva de variação de concentração com o tempo. *Arq. Biol. Tecnol.*, Curitiba, 28(4):553-555, 1985.

BOTSFORD, J. L. Cyclic nucleotides in procaryotes. *Microbiol. Rev.*, Washington, 45(4):620-642, 1981.

BOTSFORD, J. L. & LEWIS, T. A. Osmoregulation in *Rhizobium meliloti*: production of glutamic acid in response to osmotic stress. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, 56:(2):488-494, 1990.

- BOTSFORD, J. L. Osmoregulation in *Rhizobium meliloti*: inhibition of growth by salts. *Arch. Microbiol.*, Berlin, 137: 124-127, 1984.
- BRAVO, A.; MORA, J. Ammonium assimilation in *Rhizobium phaseoli* by the glutamine synthetase glutamate synthase pathway. *J. Bacteriol.*, Baltimore, 170(2):980-984, 1988.
- BROWN, C. M. & DILWORTH, M. J. Ammonia assimilation by *Rhizobium* cultures and bacteroids. *J. Gen. Microbiol.*, London, 86:39-48, 1975.
- BURTON, J. C. *Rhizobium* culture and use. IN: PEPLER, H.J. ed. *Microbiol technology*. Van Nostrand Reinhold, New York, 1967, p. 1-33.
- BURTON, J.C. *Rhizobium* species. IN: PEPLER, H.J. *Microbiol technology*, vol 1, 2nd ed. Academic Press, 1979, p 29-58.
- CALCOTT, P. H. Cyclic AMP and cyclic GMP control of synthesis of constitutive enzymes in *E. coli*. *J.Gen. Microbiol.*, London, 128:705-712, 1982.

- COURTOIS, B.; COURTOIS, J.; HEYRAUD, A.; RINAUDO, M.
Effect of biosynthesis conditions on the chemical composition of the water-soluble polisaccharides of fast growing rhizobia. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, Tokyo, 32:519-526, 1986.
- DALTON, H. The cultivation of diazotrophic microorganisms. In: BERGERSEN, E. J., ed. *Methods for evaluating biological nitrogen fixation*. Chichester, 1980, p.13-65.
- DATE, R. A. Especificidad en la simbiosis *Rhizobium/leguminosas*. In: REUNION LATINO AMERICANA SOBRE RHIZOBIUM, 8, Cali, 1976. *Anais. Cali, CIAT*, 1976. p. 42-49.
- DE VRIS, G. E. Mechanism and regulation of glucose transport in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Bacteriol.*, Baltimore, 149:872-879, 1982.
- DILWORTH, M. J. & GLENN, A. R. Movements of ammonia in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.*, London, 128:29-37, 1982.
- EISENSTADT, J. M.; GROSSMAN, L.; KLEIN, H. P. Inhibition of protein synthesis by D-aspartate and a possible site of its action. *Biochim. Biophys. Acta*, Netherlands, 36:292-294, 1959.

ELSHEIKH, E. A. E. & WOOD, M. Response of chickpea and soybean rhizobia to salt: influence of carbon source, temperature and pH. *Soil. Biochem.*, London, 21(7):883-887, 1989a.

ELSHEIKH, E. & WOOD, M. Response of chickpea and soybean rhizobia to salt: osmotic and specific ion effects to salts. *Soil Biol. Biochem.*, London, 21(7):889-895, 1989b.

FARNDEN, K. J. F. & ROBERTSON, J. G. Methods for evaluating biological nitrogen fixation. Bergersen, E. J. ed, cap. 7, 305-314, 1980.

FUCHS, R. L. & KEISTER, D. L. Comparative properties of glutamine synthetases I and II in *Rhizobium* and *Agrobacterium* spp. *J. Bacteriol.*, Baltimore, 144(2):641-648, 1980.

GLENN, A. R.; MCKAY, I. R.; ARWAS, R.; DILWORTH, M. J. Sugar metabolism and the symbiotic properties of carbohydrate mutants of *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.*, London, 130:239-245, 1984.

GOLDBERG, N. D.; HADDOX, M. K. cyclic GMP metabolism and involvement in biological regulation. *Ann. Rev. Biochem.*, California, 46:823-896, 1977.

GREENWAY, H. & MUNNS, R. Mechanisms of salt tolerance in non-halophytes. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, Stanford, 31:149-190, 1980.

GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.*, Bethesda, 177(NE):751-765, 1949.

GULATI, S. L. New Nonsynthetic medium for *Rhizobium* culture production from wastes. *Biotech. Bioeng.*, New York, 21(9):1507-1515, 1979.

HUA, S. S. T.; LICHENS, G. M.; GUIRAO, A.; TSAI, V. Y. Biochemical properties of glutamate synthase of salt tolerance *Bradyrhizobium* sp strain WR 1001. *FEMS Microbiol. Lett.*, Amsterdam, 37:209-213, 1986.

HUA, S. S. T.; TSAI, V. Y.; LICHENS, G. M.; NOMA, A. T. Accumulation of amino acids in *Rhizobium* sp strain WR 1001 in response to NaCl salinity. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, 44:1246-1247, 1982.

JONES, B. L.; AGARWAL, A. K.; KEISTE, D. L. Inhibition of growth of *Rhizobium japonicum* by cyclic GMP. *J. Bacteriol.*, Baltimore, 164(2):757-761, 1985.

KARR, D. B. & EMERICH, D. W. Phosphorilation in *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids and cultures. *J. Bacteriol.*, Baltimore, 171(6):3420-3426, 1989.

KEELE, B. B.; HAMILTON, P.B., ELKAN, G. H. Gluconate catabolism in *Rhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.*, 101:698-704, 1970.

KEISTER, D., JONES, B. L.; KONDOROSI, A., SVAB, Z. Characterization of glutamine synthetase I and II mutants of *Rhizobium*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, Tokyo, 33:267-273, 1987.

LAFONTAINE, P.; LAFRENIERE, C.; ANTOUN, H. Some properties of carbohydrate and C₄ dicarboxylic acid utilization negative mutants of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* strain P121. *P. Soil*, 120:195-201, 1989.

LE DUY, A.; ZAJIC, J.E. A geometrical aproach for differentiation of an experimental function. *Biotechnol. Bioeng.*, 15:805, 1973.

LENINGHER, A. L. Degradação oxidativa de aminoácidos. In: LENINGHER, A. L. *Princípios de Bioquímica*. São Paulo, Sarvier, 1989. cap. 19, p.380.

- LEVEAU, J.; BOUIX, M. Cinéticas microbianas. In: SCRIBAN, R., ed. *Biotecnologia*. São Paulo, Editora Manole, 1985. cap. 3. p. 103-175.
- LIM, S. T.; & SHANMUGAM, K. T. Regulation of hydrogen utilization in *Rhizobium japonicum* by cyclic AMP. *Biochim Bioph. Acta*, Netherlands, 584:479-492, 1979.
- LIM, S. T.; & SCOTT, D.B. Effect of cyclic guanosine-3',5'-monophosphate on nitrogen fixation in *Rhizobium japonicum*. *J. BACTERIOL.*, Baltimore., 139:256-263, 1979.
- LIN, E. C. C. Glicerol dissimilation and its regulation in bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.*, California, 30:535-578, 1976.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDAKK, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, Bethesda, 193:265-275, 1951.
- LUDWIG, R. A. Physiological roles of glutamine synthetases I and II in ammonium assimilation in *Rhizobium* sp 32H1. *J. Bacteriol.*, Baltimore, 141(3):1209-1216, 1980.

- LUDWIG, R. A. Control of ammonium assimilation in *Rhizobium* 32H1. *J. Bacteriol.*, Baltimore, 135:114-123, 1978.
- MAZZA, L. A. & BALATTI, A. Obtención de cultivos de *Rhizobium japonicum* in fermentador sin agitación mecánica. *Rev. Arg. Microbiol.*, Buenos Aires, 8(3):99-103, 1976.
- MILLER, K.; GORE, R.; JOHNSON, R. BENESI, A. J.; REINHOLD, V. N. Cell-associated oligosaccharides of *Bradyrhizobium* spp. *J. Bacteriol.* Baltimore, 172(1):136-142, 1990.
- NEVES, M. C. P.; DIONET, A. D. ; DUQUE, F. F.; DOBERREINER, J. *Rhizobium* strain effects on nitrogen transport and distribution in soybeans. *J. Exp. Bot.*, Oxford, 36:1179-1192. 1985.
- NUTMAN, P. S. Hereditary host factors affecting nodulation and nitrogen fixation. In: GIBSON, A. H. & NEWTON, W. E. Current perspectives in nitrogen fixation. Canberra, Australian Academy of Science, 1981. p. 194-204.
- O'GARA, F.; SHANMUGAM, K. T. Control of symbiotic nitrogen fixation in rhizobia regulation of NH_4^+ assimilation. *Biochim. Biophys. Acta.*, Netherlands, 451:342-352, 1976(a).

- O'GARA, F.; SHANMUGAM, K. T. Regulation of nitrogen fixation by rhizobia export of fixed N₂ as NH₄⁺. *Biochim. Bioph. Acta.*, 437:313-321, 1976(b).
- OSBURN, M. S.; SIGNER, E. R. Ammonium assimilation in *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.*, Baltimore, 143:1234-1240, 1980.
- PARKE, D.; ORNSTON, N. L. Nutritional diversity of *Rhizobiaceae* revealed by auxonography. *J. Gen. Microbiol.*, London, 130:1743-1750, 1984.
- PEPPLER, H. J. Yeast extracts in: ROSE, A. H., ed. *Economic microbiology*. London, Academic Press, 1982. V.7, p. 293-312.
- PERES, J. R. R. & SUHET, A. R. Relações de especificidade na fixação de N₂. In: REUNIÃO LATINO-AMERICANA SOBRE *RHIZOBIUM*, 12, Campinas, 1984. *Anais. Campinas, IAC*, 1986. p.445-460.
- POOLE, P. S.; DILWORTH, M. J.; GLENN, A. R. Acquisition of aspartate activity in *Rhizobium leguminosarum* WV235. *J. Gen. Microbiol.*, London, 130:881-886, 1985a.

POOLE, P. A.; FRANKLIN, M.; GLENN, A. R. DILWORTH, M. J.

The transport of L-glutamate by *Rhizobium leguminosarum* involves a common amino acid carrier. *J. Gen. Microbiol.*, London, 131:765-773, 1985b.

PRADELLA, J. G. C. Produção experimental de inoculantes à base de *Bradyrhizobium japonicum*. São Paulo - IPT - Agrupamento de Biotecnologia, 1989. 44p. (Relatório técnico N° 27.709/89)

PRADELLA, J. G. C.; OLIVEIRA, M. S.; ZUCCOLO, M; SEVERO, A. C. R.; BONOMI, A. Influence of culture media composition on the growth kinetics of *Bradyrhizobium japonicum* Semia 587. *W. J. Microbiol. Biotech.*, (No prelo).

PRADELLA, J. G. C.; OLIVEIRA, M. S. Influência da adição de nitrogênio orgânico no crescimento descontínuo de *Bradyrhizobium japonicum*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 15., São Paulo, 1989. *Revista de Microbiologia*. São Paulo, Soc. Bras. de Microbiologia, 1989. v. 20, p. 141.

RAMASWAMY, P.; BAL, A. K. Media-induced changes in the asymbiotic nitrogen-fixing bacteroids of *Bradyrhizobium* sp 32 H1. *Curr. Microbiol.*, Heidelberg, 14:181-185, 1986.

RAO, V. R. Effect of various nitrogenous compounds on depression of nitrogenase activity in cultured *Rhizobium* spp. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 28:359-368, 1982.

REDING, K. H. & LEPO, J. E. Physiological characterization of dicarboxylate-induced pleomorphic forms of *Bradyrhizobium japonicum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, 55(3):660-671, 1989.

RICE, W. A. & PAUL, E. A. The acetylene reduction assay for measuring nitrogen fixation in waterlogged soil. *Can. J. Microbiol.*, Ottawa, 17:1049-1056, 1971.

ROUGHLEY, R. J. & PULSFORD, B. J. Production and control and control of legume inoculants. In: VINCENT, J. M., ed. Nitrogen fixation in legumes. Sidney, Academic Press, 1982. p. 193-210.

ROUGHLEY, R. J. The preparations and use of legume seed inoculants. *Plant and Soil*, The Hague, 32:675-701, 1970.

SADOWSKY, M. J.; KEYSEA, H. H.; BOHLOOL, B. B. Biochemical characterization of fast- and slow-growing rhizobia that nodulate soybeans. *Inter. J. Syst. Bacteriol.*, Washington, 32:716-722, 1983.

- SALMIEN, S. O. & STREETER, J. G. Involvement of glutamate in the respiratory metabolism of *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids. *J. Bacteriol.*, Baltimore, 169(2):495-499, 1987.
- SARRUGE, J. R. & HAAG, H. P. Analises químicas em plantas. Piracicaba, ESALQ/USP, 1974, 27p.
- SHAPIRO, B. M.; STADTMAN, R. Glutamine synthetase (*Escherichia coli*). *Meth. Enz.*, New York, 17A:910-923, 1970.
- SCHUBERT, K. R. The energetics of biological nitrogen fixation workshop, Michigan, 1982. Summaries-I. *Am. Soc. Plant Physiol.*, Michigan, 1982.
- SHERWOOD, W. T. Inhibition of *Rhizobium trifolii* by yeast extracts of glycine is prevented by calcium. *J. Gen. Microbiol.*, London, 17:351-358, 1972.
- SHU, J. & SHULER, M. L. A Mathematical model for the growth of a single cell of *E. coli* on a glucose/glutamine/ammonium medium. *Biotech. Bioeng.*, New York, 33:1117-1126, 1989.
- SIQUEIRA, J. O. & FRANCO, A. A. Biotecnologia do solo - fundamentos e perspectivas. Lavras, MEC-ABZAS-ESAL, 1988. 220p.

- SKINNER, F. A.; ROUGHLEY, R. J.; CHANDLER, M. R. Effect of yeast extract concentration on viability and cell distortion in *Rhizobium* spp. *J. Appl. Bacteriol.*, Reading, 43:287-297, 1977.
- SOMASEGARAN, P.; HODBEN, H. J. *Methods in legume Rhizobium technology*. Hawai, University of Hawai, 1985. 367p.
- STOWERS, M. D. Carbon metabolism in *rhizobium* species. *Ann. Rev. Microbiol.*, California, 30:80-108, 1985.
- STOWERS, M. & EAGLESHAM, A. R. J. Physiological and symbiotic characteristics of fast-growing *Rhizobium japonicum*. *P. Soil*, the Hague, 77:3-14, 1984.
- STOWERS, M. D. & ELKAN, G. The transport and metabolism of glucose in cowpea rhizobia. *Can. J. Microbiol.*, Ottawa, 29:398-406, 1983.
- STRIJDON, B. W. & ALLEN, O. N. Medium supplementation with L- and D-amino acids relative to growth and efficiency of *Rhizobium meliloti*. *Can. J. Microbiol.*, Ottawa, 12:275-283, 1966.
- TUBB, R. S. Regulation of nitrogen fixation in *Rhizobium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, 32:483-488, 1976.

TULLY, R. E. New culture media to suppress exopolysaccharide production by *Rhizobium japonicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Berlin, 21:252-254, 1985.

TYLER, B. Regulation of the assimilation of nitrogen compounds. *Ann. Rev. Biochem.* 47:1127-1162, 1978.

ULLMANN, A. & DANCHIN, A. Role of cyclic AMP in regulation mechanisms in bacteria. *TIBS*, 4:95-96, 1980.

UPCHURCH, R. G. & ELKAN, G. H. The role of ammonia, L-glutamate, and cyclic adenosine 3,5'-monophosphate in the regulation of ammonia assimilation in *rhizobium japonicum*. *Biochim. Bioph. Acta.*, Netherlands, 538:244-248, 1978.

YANCY, P. H.; CLARK, M. E.; HAND, S. C.; BOWLUS, R. D.; SOMERO, G. N. Living with water stress: evolution of osmolytes systems. *Science, Lancaster*, 217:1214-1222, 1982.

A N E X O A
MEIOS DE CULTURA

A.I - Meio de cultura utilizado na manutenção das culturas

K ₂ HPO ₄	0,5 g/l
MgSO ₄ H ₂ O	0,2 g/l
NaCl	0,1 g/l
KNO ₃	0,8 g/l
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,3 g/l
MnSO ₄ solução 10%	2 gotas/l
FeCl ₃ solução 10%	2 gotas/l
Extrato de levedura	4,0 g/l
Glicerol	10,0 g/l
Agar (meio sólido).....	15.0 g/l

A.II - Sais utilizados nos meios de cultivo das diferentes ensaios

K ₂ HPO ₄	0.5 g/l
MgSO ₄ H ₂ O	0.2 g/l
NaCl	0.1 g/l
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.3 g/l
MnSO ₄ solução 10%	2 gotas/l
FeCl ₃ solução 10%	2 gotas/l

A.III - Solução nutritiva para plantas

$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	150 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	20 g
KH_2PO_4	20 g
KCl	30 g
Solução A-Z	100 ml
Solução D	100 ml
H_2O destilada	4.700 ml
NaOH (1M)	70 ml
pH final 6.4	

Diluir em H_2O destilada 1:10 para uso.

Solução A-Z

H_3BO_3	2.86 g
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2.03 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.22 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.08 g
$\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.09 g

Completar a 1000 ml com H_2O destilada

Solução D

FeCl_3 Solução (4g/l)	16.8 g/l
$\text{EDTA Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2.0 g

A N E X O B**CURVAS DE CALIBRAÇÃO UTILIZADAS NOS ENSAIOS**

**B.I - Curva de calibração para determinação de
concentração por densidade óptica**

transmitância (%)	conc. celular (g/l)
26,5	0,499
33,0	0,396
39,0	0,316
47,5	0,253
55,0	0,203
61,5	0,162
67,0	0,129
72,5	0,104
77,0	0,083

Por regressão linear obteve-se a seguinte equação:

$$C = 1,972 - 1,133 \log T$$

$$r = 0,9982$$

onde C é a concentração celular em grama por litro e T a porcentagem de transmitância da amostra contra um branco constituído de água destilada.

B.II - Curva padrão para de aminoácidos totais livres

Essa curva padrão foi obtida com extrato de levedura (DIFCO) realizada nas mesmas condições de análise descrita no item 3.5.5.

Conc. Extrato de levedura (g/l)	transmitância (%)
10,27	20,0
5,14	36,0
3,15	52,5
2,57	61,0
1,56	73,0
1,29	79,0
0,78	87,0
0,65	89,0
0,33	95,0

Por regressão linear obteve-se a seguinte equação:

$$A = 22,7177 - 11,3192 \log T$$

$r = 0,9994$ (desprezando-se o ponto 10,27 g/l para manter a linearidade da curva)

onde A é a concentração de aminoácidos totais livres em grama por litro e T a porcentagem de transmitância da amostra contra um branco realizado nas mesmas condições da análise tendo a água destilada no lugar do extrato.

Considerações sobre essa metodologia

A primeira vista pode parecer incoerente utilizar uma curva de calibração construída com extrato de levedura para expressar concentrações de aminoácidos totais livres de ensaios onde utilizou-se, por exemplo, 50%

de um aminoácido livre como o ácido glutâmico. Exemplificando, 8.0 g de extrato de levedura em termos de aminoácidos totais não deveria ser comparado com 8.0 g de ácido glutâmico pois o extrato de levedura não é constituído apenas por aminoácidos. Para esses ensaios, no entanto, o ácido glutâmico foi utilizado na forma de sal monossódico. Isto significa que em 8.0 g de glutamato de sódio 86.49% corresponde ao aminoácido (em termos de massa 6.9g) o restante corresponde ao sódio. Em extrato de levedura do tipo DIFCO a fração de aminoácidos, segundo PEPLER (1982), é em torno de 80% logo, 8.0 g de extrato de levedura corresponde a apenas 6.4 g de aminoácidos totais livres. Uma diferença portanto de 0.5g em termos de aminoácidos, um erro que assumimos como metodológico

B.III - Exemplo de curva padrão para determinação de amônio

solução padrão (ppm de amônia)	condutividade (mv)
10,92	-173; -174; -175; -175; -175; -175
27,29	-198; -199; -199; -199; -199; -199
54,58	-216; -217; -217; -217; -216; -217
109,18	-233; -234; -234; -234; -234; -234
272,90	-258; -258; -258; -258; -257; -258
545,80	-274; -275; -275; -275; -275; -274

Por regressão linear obteve-se a seguinte equação:

$$N = -1,9413 - 0,0170 \text{ MV}$$

$$r = 0,9999$$

onde N é o log da concentração de amônia em miligramas por litro e MV a condutividade em milivolt.