

UFRRJ

**INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA QUÍMICA**

DISSERTAÇÃO

**Otimização dos Parâmetros de Produção de
Biomassa de *Azospirillum amazonense* (BR-11145) para
Incorporação em Inoculantes Agrícolas**

Vitor Hugo Fernandes

2013



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

Otimização dos Parâmetros de Produção de Biomassa de *Azospirillum amazonense* (BR-11145) para Incorporação em Inoculantes Agrícolas

Vitor Hugo Fernandes

Sob a Orientação do Professor
Dr. Luiz Augusto da Cruz Meleiro

e Co-orientação do
Dr. Luis Henrique de Barros Soares

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Área de Concentração em Engenharia Química.

Seropédica, RJ
Março de 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

VITOR HUGO FERNANDES

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências** no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, área de Concentração em Engenharia Química.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: ____/____/____

Luiz Augusto da Cruz Meleiro. Prof. D.Sc. DEQ/IT/UFRRJ
(Orientador)

Priscilla Filomena Fonseca Amaral. Prof. D.Sc. DPB/EQ/UFRRJ
(Membro Titular)

Rosa Helena Luchese. Prof. PhD. DTA/IT/UFRRJ
(Membro Titular)

Anderson Wilson da Silva Henriques. Prof. D.Sc. IFRJ
(Membro Suplente)

Marisa Fernandes Mendes. Prof. D.Sc. DEQ/IT/UFRRJ
(Membro Suplente)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade que me foi dada de prosseguir com os meus estudos e pelas incontáveis graças que foram providenciadas no decorrer destes 2 anos;

Aos meus orientadores Prof. Dr. Luiz Augusto da Cruz Meleiro e Prof. Dr. Luis Henrique de Barros Soares e demais professores do DEQ da UFRRJ pela amizade, dedicação e conhecimento transferido;

Aos meus familiares: Jair, Fia, Péricles e Érika pelo constante e incondicional apoio que me foi dado neste período em que ficamos longe fisicamente, mas sempre juntinhos no coração;

Ao Doutorando Fabiano Prates, pela amizade e por todo o apoio que me foi dado quando cheguei a Seropédica;

À Larissa Endlich, minha namorada, pela ajuda prestada na formatação das tabelas de resultados, pelo companheirismo, compreensão e dedicação durante este período de distância;

A toda a Paróquia Santa Terezinha pelo sustento espiritual;

Aos companheiros de laboratório e funcionários da Embrapa Agrobiologia: Daniela, Marcella, Barbara, Tiana, Felipe, Gabriela, Izadora, Marlei, Lúcio, Geraldo, Juliane e pessoal da portaria pela imensa paciência que tiveram comigo e pela colaboração na execução dos meus experimentos.

RESUMO

FERNANDES, Vitor Hugo. **Produção de biomassa de *Azospirillum amazonense* (BR-11145) para incorporação em Inoculantes Agrícolas**. 2013. 93p Dissertação (Mestrado em Ciências, Engenharia Química). Instituto de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

O *Azospirillum amazonense* é uma rizobactéria gram-negativa associada a diversas gramíneas. Esse microrganismo proporciona o crescimento vegetal devido à sua capacidade de sintetizar vários fitormônios (AIA), sideróforos, polissacarídeos úteis às plantas e atualmente compõe o inoculante misto para a cana de açúcar da EMBRAPA. O presente trabalho teve como objetivo selecionar e otimizar meios de cultura, otimizar parâmetros de processamento para o cultivo em escala piloto do *A. amazonense* BR-11145, além de substituir as fontes de carbono a fim de se alcançar um meio reprodutível de baixo custo. Efetuou-se o *screening* dos componentes do meio Dextrose Yeast Glucose Sucrose modificado – DYGS realizado em incubador rotativo a 30°C e 150rpm por meio de 4 planejamentos fatoriais fracionados (2^{7-3} , dois 2^{6-3} e 2^{5-2}) em três níveis diferentes de fonte de carbono, nitrogênio e minerais (regular, +50% e -50% em massa). Foi obtido um meio simplificado (em g L⁻¹: glicose, 5,0; extrato de levedura, 3,0; K₂HPO₄, 0,25; MgSO₄, 0,75 e micronutrientes 4,0 ml/L) a R\$ 1,70 por litro, 1/3 do valor do meio DYGS modificado e possuindo uma capacidade de produção de biomassa celular aproximadamente 1,5 maior. Em um biorreator, foi executado um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2³ a partir do qual foi definida a melhor condição de cultivo: temperatura de 35°C, agitação de 250rpm e aeração de 8,0 Lpm. A cinética do processo foi estudada utilizando três fontes de carbono obtendo-se os parâmetros descritos a seguir: glicose a 10 g/L ($X = 5,737$ g/L, $P_X = 0,315$ g/L.h, $\mu_x = 1,253$, $CI = 31,79$ mM, $P_{CI} = 1,257$ mM.h⁻¹); glicerol a 10 g/L ($X = 7,136$ g/L, $P_X = 0,471$ g/L.h, $\mu_x = 1,482$, $CI = 38,194$ mM, $P_{CI} = 1,805$ mM.h⁻¹); sacarose a 10 g/L ($X = 7,966$ g/L, $P_X = 0,717$ g/L.h, $\mu_x = 1,472$, $CI = 85,833$ mM, $P_{CI} = 6,944$ mM.h⁻¹), todos a um custo de produção de R\$0,32 o grama de biomassa. Assim, pelo melhor desempenho na produção de biomassa e compostos indólicos recomendou-se o cultivo do *A. amazonense* BR - 11145 em sacarose.

Palavras-chave: Rizobactéria; Compostos indólicos; Auxina.

ABSTRACT

FERNANDES, Vitor Hugo. **Optimization of biomass production parameters of *Azospirillum amazonense* (BR-11145) for incorporation into Agricultural inoculants.** 2013. 93p. Dissertation (Master in Sciences, Chemical Engineer). Instituto de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

The *Azospirillum amazonense*, is a gram-negative rhizobacteria associated with various grasses, provides plant growth due to their ability to synthesize various phytohormones (IAA), siderophores and polysaccharides, and currently it composes the EMBRAPA's mixed inoculant for sugarcane. This study aimed to select and optimize culture media and processing parameters for the pilot scale cultivation of *A. amazonense* BR-11145 besides replacing carbon sources in order to obtain a reproducible medium and low-costs process. It was performed a screening of DYGS medium components. The experiment was conducted in a rotatory incubator at 30°C and 150 rpm through 4 fractional factorial design (2^{7-3} , two 2^{6-3} and 2^{5-2}) in three different levels of carbon, nitrogen and minerals sources (regular, +50% and -50% w/w). It was obtained a simplified medium costing R\$1,70 per liter, 1/3 of the original value, and a increase of 66,7% in the biomass production capacity (medium composition: glucose 5.0 g/L; yeast extract, 3.0 g/L; K_2HPO_4 0.25 g/L, $MgSO_4$ 0.75 g/L and micronutrients 4.0 mL/L). To determine the best culture condition, a DCCR 2^3 was carried out in a bioreactor from which the conditions defined were: temperature 35°C, agitation 250 rpm and aeration of 8.0 Lpm. The process kinetics was studied using three carbon sources obtaining the parameters described below: glucose 10 g/L ($X = 5,737$ g/L, $P_X = 0,315$ g/L.h, $\mu_x = 1,253$, $IC = 31,79$ mM, $P_{IC} = 1,257$ mM.h⁻¹); glycerol 10 g/L ($X = 7,136$ g/L, $P_X = 0,471$ g/L.h, $\mu_x = 1,482$, $IC = 38,194$ mM, $P_{IC} = 1,805$ mM.h⁻¹); sucrose 10 g/L ($X = 7,966$ g/L, $P_X = 0,717$ g/L.h, $\mu_x = 1,472$, $IC = 85,833$ mM, $P_{IC} = 6,944$ mM.h⁻¹). In all cases, the production cost of R\$ 0.32 per gram of biomass were found. According to results for biomass and indolic compounds production capacity, it is recommended the use of sucrose for cultivation of *A. amazonense* BR-11145.

Keywords: Rizobacteria. Indolic Compounds. Auxin.

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Crescimento de bactérias do gênero <i>Azospirillum</i> em diferentes fontes de carbono (modificado de MAGALHÃES <i>et al.</i> , 1983).....	17
Tabela 2.2 – Comparativo das características morfológicas entre espécies do gênero <i>Azospirillum spp</i> (Modificado de MAGALHÃES <i>et al.</i> , 1983.).....	18
Tabela 2.3 – Comparativo das características fisiológicas entre espécies do gênero <i>Azospirillum spp</i> (Modificado de MAGALHÃES <i>et al.</i> , 1983.).....	19
Tabela 2.4 – Produção AIA produzido por diversas estirpes de <i>Azospirillum</i> (Modificado de Radwan, 2002)....	21
Tabela 2.5 – Exemplos de componentes de meios complexos industriais (Pereira Jr <i>et al.</i> , 2008).....	24
Tabela 2.6 – Classificação geral de biorreatores (KLEINSTEUER, 1986; SCHMIDELL & FACCIOTTI, 2001).	28
Tabela 4.1: Variáveis codificadas referentes aos planejamentos fatoriais fracionados 01 a 04.....	43
Tabela 4.2: Matriz do planejamento FF01 (2^{7-3}) e a resposta para biomassa (g/L).	43
Tabela 4.3 – Estimativa dos efeitos para a variável Biomassa referente ao planejamento FF01(2^{7-3}).....	44
Tabela 4.4 – Matriz do planejamento FF02 (2^{6-3}) e as respostas Biomassa (g/L) e Compostos Indólicos (mM).	45
Tabela 4.5 – Estimativa dos efeitos para as respostas biomassa e compostos indólicos referente ao planejamento FF02 (2^{6-3}).	46
Tabela 4.6 – Matriz do planejamento FF03 (2^{6-3}) e as respostas biomassa (g/L) e compostos indólicos (mM)... ..	47
Tabela 4.7 – Estimativa dos efeitos para as variáveis biomassa e compostos indólicos referente ao planejamento FF03 (2^{6-3}).	48
Tabela 4.8 – Matriz do planejamento FF04 (2^{5-2}) e as respostas biomassa (g/L) e compostos indólicos (mM)... ..	48
Tabela 4.9 – Estimativa dos efeitos para as variáveis biomassa e compostos indólicos referente ao planejamento FF04 (2^{5-3}).	49
Tabela 4.10 – Cotação de matérias-primas realizada pela Embrapa Agrobiologia – CNPAB no pregão de 2011 - 2.....	50
Tabela 4.11 – Fatores de rendimento e custo de produção para os ensaios dos planejamentos fatoriais fracionados.	52
Tabela 4.12 – Composição do Meio de Cultura Aperfeiçoado.....	53
Tabela 4.13 – Comparativo entre os custos dos Meio DYGS e ELG.	53
Tabela 4.14 – Tabela das variáveis codificadas referentes ao DCCR.....	53
Tabela 4.15 – Matriz de ensaios do DCCR e as respostas biomassa (g/L) e compostos indólicos (mM).	54
Tabela 4.16 – Produtividades, fatores de rendimento, velocidades máximas de crescimento e custos para os ensaios do Delineamento Composto Central Rotacional – DCCR.	70
Tabela 4.17 – Coeficientes de regressão para a variável biomassa.	72
Tabela 4.18 – ANOVA para a variável biomassa.....	72
Tabela 4.19 – Coeficientes de regressão para a variável compostos indólicos.....	75
Tabela 4.20 – ANOVA para a variável compostos indólicos.....	75
Tabela 4.21 – Rendimentos para os ensaios de substituição da fonte de carbono.	84
Tabela 4.22 – Custos para os ensaios de substituição da fonte de carbono.	85

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Ciclo do nitrogênio nos sistemas agrícolas.	13
Figura 2.2 – Morfologia das colônias de <i>Azospirillum amazonense</i> cultivada em meio batata (esquerda) e em meio LGI (direita). Fonte: Laboratório de Coleção de Culturas – Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia - CNPAB.	17
Figura 2.3 – Morfologia das células em diferentes condições de cultivo. Microscopia eletrônica de transmissão do <i>Azospirillum amazonense</i> em Meio LGI sem (A) e com KNO ₃ (B); ou em Ágar nutriente (C). Microscopia eletrônica de varredura de cultivo em Ágar nutriente (D) (15.900x) Fonte: MAGALHÃES <i>et al.</i> , 1983.	18
Figura 2.4 – Rotas e enzimas envolvidas na biossíntese de AIA em bactérias (Adaptado de PATTEN & GLICK, 1996).	20
Figura 2.5 – Esquema geral de um bioprocesso (SCHMIDELL <i>et al.</i> , 2001).	23
Figura 2.6 – Curva de crescimento do microrganismo em cultivo descontínuo, representada em ordenadas lineares (A) e semilogarítmica (B). As sete fases estão descritas no texto (HISS, 2001).	26
Figura 2.7 – Visão geral de um biorreator agitado mecanicamente (THIEMANN, 2001).	29
Figura 2.8 – Batelada com recuperação de inoculo (PEREIRA JR <i>et al.</i> , 2008).	30
Figura 4.1: Evolução da biomassa de <i>A. amazonense</i> , em termos de densidade ótica (DO _{600nm}), cultivados nos meios LGI (●), DYGS (■) e YMB (▲).	41
Figura 4.2 – Comparativo das produções de biomassa e compostos indólicos nos ensaios do planejamento FF02.	45
Figura 4.3 – Comparativo das produções de biomassa e compostos indólicos nos ensaios do planejamento FF03.	47
Figura 4.4 – Comparativo das produções de biomassa e compostos indólicos nos ensaios do planejamento FF04.	49
Figura 4.5 – Evolução das concentrações de Compostos Indólicos (●), Biomassa (■), pO ₂ (△) e Glicose (◇) para o ensaio DCCR 01.	55
Figura 4.6 – Evolução das concentrações de Compostos Indólicos (●), Biomassa (■), pO ₂ (△) e Glicose (◇) para o ensaio DCCR 05.	56
Figura 4.7 – Evolução das concentrações de Compostos Indólicos (●), Biomassa (■), pO ₂ (△) e Glicose (◇) para o ensaio DCCR 02.	57
Figura 4.8 – Evolução das concentrações de Compostos Indólicos (●), Biomassa (■), pO ₂ (△) e Glicose (◇) para o ensaio DCCR 06.	57
Figura 4.9 – Evolução das concentrações de Compostos Indólicos (●), Biomassa (■), pO ₂ (△) e Glicose (◇) para o ensaio DCCR 03.	58
Figura 4.10 – Evolução das concentrações de Compostos indólicos (●), biomassa (■), pO ₂ (△) e glicose (◇) para o ensaio DCCR 07.	59
Figura 4.11 – Evolução das concentrações de Compostos Indólicos (●), Biomassa (■), pO ₂ (△) e Glicose (◇) para o ensaio DCCR 04.	60
Figura 4.12 – Evolução das concentrações de Compostos indólicos (●), biomassa (■), pO ₂ (△) e glicose (◇) para o ensaio DCCR 08.	60
Figura 4.13 – Evolução das concentrações de Compostos Indólicos (●), Biomassa (■), pO ₂ (△) e Glicose (◇) para o ensaio DCCR 09.	61
Figura 4.14 – Evolução das concentrações de Compostos Indólicos (●), Biomassa (■), pO ₂ (△) e Glicose (◇) para o ensaio DCCR 10.	62
Figura 4.15 – Evolução das concentrações de Compostos Indólicos (●), Biomassa (■), pO ₂ (△) e Glicose (◇) para o ensaio DCCR 11.	63
Figura 4.16 – Evolução das concentrações de Compostos Indólicos (●), Biomassa (■), pO ₂ (△) e Glicose (◇) para o ensaio DCCR 12.	63
Figura 4.17 – Evolução das concentrações de Compostos Indólicos (●), Biomassa (■), pO ₂ (△) e Glicose (◇) para o ensaio DCCR 13.	64
Figura 4.18 – Evolução das concentrações de Compostos Indólicos (●), Biomassa (■), pO ₂ (△) e Glicose (◇) para o ensaio DCCR 14.	65
Figura 4.19 – Evolução das concentrações de Compostos Indólicos (●), Biomassa (■), pO ₂ (△) e Glicose (◇) para o ensaio DCCR 15.	66
Figura 4.20 – Evolução das concentrações de Compostos Indólicos (●), Biomassa (■), pO ₂ (△) e Glicose (◇) para o ensaio DCCR 16.	66
Figura 4.21 – Evolução das concentrações de Compostos Indólicos (●), Biomassa (■), pO ₂ (△) e Glicose (◇) para o ensaio DCCR 17.	67
Figura 4.22 – Formação de grânulos de acumulação (possivelmente PHB) em células de <i>Azospirillum amazonense</i> (Ensaio DCCR n°06).	68

Figura 4.23 – Volumes de base (●), ácido (■) e anti-espumante (▲) adicionados ao sistema do ensaio DCCR n°06.	69
Figura 4.24 – Diagrama de Pareto com os valores dos efeitos para a biomassa.	71
Figura 4.25 – Valores preditos versus valores experimentais para a biomassa.	72
Figura 4.26 – Superfícies de resposta e curva de contorno para resposta biomassa em função da temperatura versus agitação (a) e (b), em função da temperatura versus aeração (c) e (d) e em função da aeração versus agitação (e) e (f).	73
Figura 4.27 – Diagrama de Pareto com os valores dos efeitos para os Compostos Indólicos.	74
Figura 4.28 – Valores Preditos versus Valores Experimentais para os Compostos Indólicos.	76
Figura 4.29 – Superfícies de resposta e curva de contorno para resposta compostos indólicos.	76
Figura 4.30 – Evolução das concentrações de compostos indólicos (●), biomassa (■), pO ₂ (△) e glicose (◇) para o ensaio 1 em condições de processo otimizadas.	78
Figura 4.31 – Evolução das concentrações de compostos indólicos (●), biomassa (■), pO ₂ (△) e glicose (◇) para o ensaio 2 em condições de processo otimizadas.	79
Figura 4.32 – Metabolismo central do carbono em <i>Azospirillum</i> . As enzimas estão enumeradas da seguinte maneira: 1. glicoquinase; 2. gliconato 2-desidrogenase; 3. fosfogliconato desidratase; 4. fosfo-2-ceto-3-deoxigluconato aldolase; 5. fosfogluconato desidrogenase; 6. glicose-6- fosfato desidrogenase; 7. gliceraldeído-fosfato desidrogenase (NAD+); 8. gliceraldeído-fosfato desidrogenase (NADP+); 9. fosfoglicerato quinase; 10. fosfoglicerato mutase; 11. enolase; 12. piruvato quinase; 13. frutosebisfosfato aldolase; 14. frutose bifosfatase; 15. 6-fosfofrutoquinase; 16. glicose-fosfato isomerase; . 17. glicoquinase; 18. glicose desidrogenase; 19. glicerolquinase; 20. lactato desidrogenase; 21. malato desidrogenase; 22. álcool desidrogenase; 23. acetaldeído desidrogenase. As linhas pontilhadas correspondem às reações que não aparecem em <i>A. brasilense</i> ou não são importantes, tornado-se inutilizáveis pela bactéria. (Baseado em Westby <i>et al.</i> , 1983).	80
Figura 4.33 – Evolução das concentrações de compostos indólicos (●), biomassa (■), pO ₂ (△) e glicerol (◇) para o ensaio 3 em condições de processo otimizadas.	81
Figura 4.34 – Formação de grânulos de PHB em células de <i>Azospirillum amazonense</i> (Ensaio3 - Glicerol).	82
Figura 4.35 – Evolução das concentrações de compostos indólicos (●), biomassa (■), pO ₂ (△) e sacarose (◇) para o ensaio 4 em condições de processo otimizadas.	83
Figura 4.36 – Absorção de sacarose (●), glicose (△), manitol (■), e 2-cetoglutarato (▲) por <i>A. amazonense</i> Y1 cultivadas em AAM acrescido de sacarose, glicose, manitol e 2 - cetoglutarato, respectivamente. Três amostras foram colhidas para cada ponto. Adaptado de Martínez-Drets <i>et al.</i> (1985).	84

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1	A Importância Biótica do Nitrogênio	12
2.2	O Nitrogênio nos Sistemas Agrícolas	12
2.2.1	Fixação Biológica de Nitrogênio em Gramíneas.....	14
2.3	Microrganismos Promotores de Crescimento de Gramíneas.....	15
2.3.1	Gênero <i>Azospirillum</i> associado às gramíneas.....	16
2.4	Produção de Compostos Indólicos.....	19
2.5	Mercado para Inoculantes	21
2.6	Bioprocessos	22
2.6.1	Meios de cultivo para produção industrial	23
2.6.2	Cinética de bioprocessos	24
2.6.3	Biorreatores e Bioprocessos	27
2.6.4	Condução de bioprocessos	29
2.7	Ferramentas de Otimização e Planejamento Experimental.....	30
3	MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1	Microrganismo	32
3.2	Meios de Cultura.....	32
3.2.1	Soluções-estoque	32
3.2.2	Meio LGI.....	33
3.2.3	Meio batata.....	33
3.2.4	Meio MYB	34
3.2.5	Meio Dextrose Yeast Glucose Sucrose – DYGS (modificado).....	34
3.3	Preparo de Estoque de Bactérias.....	35
3.4	Ensaio em Erlenmeyer	35
3.4.1	Preparação do pré-inóculo.....	35
3.4.2	Fermentação	35
3.4.3	Parâmetros analisados em <i>shaker</i>	35
3.5	Ensaio em Biorreator	35
3.5.1	Biorreator	35
3.5.2	Preparação do pré-inóculo.....	36
3.5.3	Inoculação do biorreator.....	36
3.5.4	Amostragem e estocagem.....	36
3.5.5	Parâmetros analisados em biorreator.....	36
3.6	Planejamento Experimental.....	36
3.6.1	Testes preliminares.....	36
3.6.2	Simplificação do meio de cultura	37
3.6.3	Otimização das condições de processamento em biorreator.....	38
3.6.4	Substituição da fonte de carbono.....	38

3.7	Procedimentos Analíticos	38
3.7.1	Determinação de açúcares redutores pelo método do ácido 3,5 – dinitrossalicílico – DNS	38
3.7.2	Determinação de compostos indólicos totais pelo método colorimétrico de Salkowski	39
3.7.3	Determinação da Absorbância.....	39
3.7.4	Concentração celular mássica (X).....	39
3.7.5	Determinação das concentrações de sacarose e glicerol.....	39
3.8	Cálculo dos Parâmetros Cinéticos	40
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	41
4.1	Testes Iniciais – Seleção do Meio de Cultura.....	41
4.2	Aperfeiçoamento do Meio de Cultura	42
4.2.1	Primeiro teste: Fatorial fracionado 2^{7-3}	42
4.2.2	Segundo teste: Fatorial fracionado 2^{6-3}	44
4.2.3	Terceiro teste: Fatorial fracionado 2^{6-3}	46
4.2.4	Quarto teste: Fatorial fracionado 2^{5-2}	48
4.2.5	Avaliação de rendimentos, custos e definição do novo meio de cultura	50
4.3	Otimização das Condições de Processamento em Biorreator	53
4.3.1	Delineamento Composto Central Rotacional - DCCR	53
4.3.2	Observações gerais	67
4.3.3	Análise estatística para a resposta biomassa.....	71
4.3.4	Análise estatística para a resposta compostos indólicos	74
4.4	Ensaio em Biorreator em Condições Otimizadas e com Substituição da Fonte de Carbono	77
4.4.1	Ensaio 1: Glicose 5,0 g/L	77
4.4.2	Ensaio 2: Glicose 10,0 g/L	78
4.4.3	Ensaio 3: Glicerol 10,0 g/L	79
4.4.4	Ensaio 4: Sacarose 10,0 g/L	82
4.4.5	Análise de custos	84
5	CONCLUSÕES E SUGESTÕES	86
6	BIBLIOGRAFIA	88

1 INTRODUÇÃO

O nitrogênio é um dos nutrientes minerais mais exigidos pelas plantas. Sua fonte natural para os sistemas agrícolas é o ar atmosférico, onde este composto é encontrado na forma molecular (N_2). Contudo, o N_2 é uma molécula gasosa muito pouco reativa, não sendo diretamente aproveitada pelas plantas devido à grande estabilidade química.

O método de fixação industrial do N_2 , chamada de processo de Haber-Bosch, é dispendiosa do ponto de vista energético, o que provoca a elevação do preço dos adubos nitrogenados aplicados na agricultura e consequentemente o aumento dos preços dos produtos agrícolas fornecidos à população, além de impactarem negativamente com a degradação do solo e inviabilização de cursos d'água e lençóis freáticos.

Uma das mais importantes possibilidades para transformar o nitrogênio atmosférico disponível para as culturas agrícolas é a fixação biológica de nitrogênio (FBN), onde bactérias, denominadas diazotróficas, são capazes de assimilar o N_2 atmosférico e convertê-lo a uma forma assimilável pelas plantas, como o NH_3 . Por se tratar de um processo natural de enriquecimento do solo o estímulo desta prática proporciona a redução da aplicação de insumos nitrogenados sintéticos.

Atualmente a FBN é muito estudada quanto à sua contribuição para o crescimento vegetal. No entanto, já existem fortes indícios de que estas bactérias contribuem com diversos outros mecanismos promotores de crescimento de plantas. Essas bactérias são chamadas, normalmente, de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP), sendo descritas diversas espécies e estirpes de gêneros como *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum* e *Pseudomonas*. Estes, além de fixar N_2 , podem estimular as plantas através da produção de fitohormônios,

Os membros do gênero *Azospirillum* têm sido isolados das raízes de diversas gramíneas tanto cultivadas quanto silvestres e cereais e de solos das regiões tropical, subtropical e zona temperada por todo o mundo, dentre elas o trigo, cevada, aveia, arroz, centeio e cana-de-açúcar, onde estes microrganismos têm trazido benefícios como o aumento do sistema radicular, além da FBN.

Existe um mercado promissor para produtos inoculantes contendo bactérias diazotróficas que pode ser utilizado para gramíneas. Atualmente *Azospirillum amazonense* compõe o inoculante misto para a cana-de-açúcar da EMBRAPA. No entanto, não são encontrados na literatura dados nutricionais, cinéticos e de processamento para a produção deste microrganismo em larga escala. Sendo assim, se torna indispensável o estudo sistematizado para que se estabeleça uma tecnologia de produção deste tipo de inoculante em escala industrial.

Neste trabalho foram realizados testes com o objetivo de avaliar a evolução da biomassa em diferentes substratos, buscar o aperfeiçoamento de meios de cultura envolvendo a avaliação de rendimentos, custo e a definição de um meio aperfeiçoado, além de buscar a otimização das condições operacionais para o cultivo de *A. amazonense* em biorreator, sempre visando atingir condições que favoreçam menores gastos e maiores índices de produção.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Importância Biótica do Nitrogênio

O nitrogênio constitui aproximadamente 79% da atmosfera terrestre, fonte natural do elemento para os sistemas agrícolas na forma molecular N_2 . Contudo, o N_2 é uma molécula gasosa muito pouco reativa, não sendo diretamente aproveitada pelas plantas devido à grande estabilidade, em virtude de seu baixo potencial de ionização e da alta energia de dissociação propiciada pelas ligações triplas entre seus átomos.

Por outro lado, o nitrogênio é um dos nutrientes minerais mais exigidos pelas plantas, que o assimilam principalmente na forma de íon nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+) (FERNANDES & SOUZA, 2006). Cerca de 90% do nitrogênio da planta encontra-se na forma orgânica, sendo que as proteínas são os componentes nutricionais mais importantes. É assim que desempenha funções importantes como componente estrutural de macromoléculas e constituinte de enzimas. Os “aminoácidos livres” dão origem a outros aminoácidos e às proteínas e, por consequência, às coenzimas; são precursores de hormônios vegetais – triptofano do Ácido Indol-3-Acético (AIA) e metionina do etileno; núcleos porfirínicos – clorofila e citocromos (FAQUIN, 2005).

Para que o N_2 possa ser convertido a uma molécula assimilável é necessário o fornecimento de condições de temperatura e pressão muito elevados. Esse processo pode ocorrer naturalmente através da formação de óxidos de nitrogênio produzidos por descargas elétricas na atmosfera (fixação atmosférica) ou industrialmente. A fixação industrial do N_2 , chamada de processo de Haber-Bosch é realizada em temperaturas em torno de 200 °C e pressões em torno de 200 atm, sendo dispendiosa do ponto de vista energético, o que provoca a elevação do preço dos adubos nitrogenados (TAIZ & ZEIGER, 2004).

Outro importante processo que pode romper molécula de N_2 tornando-a assimilável pelas plantas é a Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN), no qual as bactérias diazotróficas associativas ou de vida livre, dotadas da enzima nitrogenase realizam esta conversão de uma forma mais econômica.

A fixação de nitrogênio por processos naturais converte cerca de 190×10^{12} g.ano⁻¹. Deste total, os relâmpagos são responsáveis por cerca de 8%, as reações fotoquímicas, entre óxido nítrico gasoso (NO) e o ozônio (O_3), produzindo o ácido nítrico (HNO_3), por cerca de 2% e a fixação biológica de nitrogênio (FBN) por bactérias ou algas azuis, responsáveis por, aproximadamente 90%. Daí a importância do estudo da FBN em plantas a fim de maximizar a sua contribuição à produtividade agrícola (FERREIRA, 2008).

2.2 O Nitrogênio nos Sistemas Agrícolas

O ciclo do nitrogênio nos solos (Figura 2.1) controla a disponibilidade de nitrogênio para as plantas. Uma vez que a maioria dos processos de transformação é realizada por microrganismos, principalmente os fungos e as bactérias, este ciclo é influenciado por fatores que afetam a atividade microbiana, tais como clima e solo.

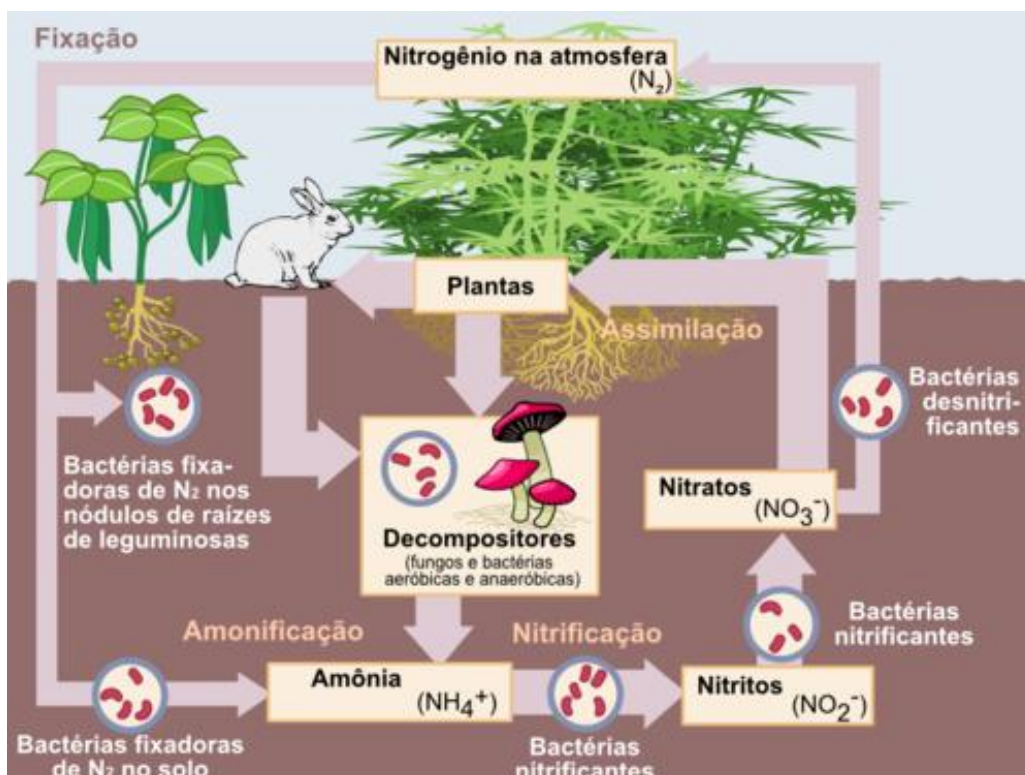


Figura 2.1 – Ciclo do nitrogênio nos sistemas agrícolas.

As transformações do nitrogênio no solo podem ser divididas em 3 processos principais: (a) mineralização, que compreende a transformação do nitrogênio orgânico em nitrato através da amonificação e nitrificação; (b) imobilização, que é caracterizada pela utilização do nitrogênio mineral, durante o metabolismo microbiano e ocorre simultaneamente a mineralização; (c) desnitrificação que é um processo de respiração anaeróbia que resulta em perdas gasosas de nitrogênio (VICTORIA *et al.*, 1992).

A amonificação representa a transformação do nitrogênio orgânico em NH_4^+ , que é o primeiro produto nitrogenado mineral que aparece no solo. Durante a nitrificação, o amônio, resultante da amonificação ou incorporado ao solo via fertilização, é oxidado a nitrito (NO_2^-) e depois a NO_3^- . A nitrificação, diferentemente da amonificação, é um processo estritamente aeróbio, ou seja, só ocorre na presença de oxigênio. A desnitrificação é um processo de respiração anaeróbia, realizada por microrganismos capazes de utilizar nitrato ou o nitrito como aceptores finais de elétrons em lugar do oxigênio, formando óxidos gasosos (NO , N_2O) que podem ser novamente reduzidos para N_2 . (VICTORIA *et al.*, 1992).

Por ser o macronutriente que as plantas utilizam em maior quantidade, o nitrogênio é de fundamental importância na quantidade da produção agrícola. Sendo o mais exigido pelas culturas, é geralmente o primeiro a apresentar deficiência, consequentemente, os fertilizantes com nitrogênio são os mais necessários em todo o mundo e, principalmente nos trópicos, onde os teores de matéria orgânica nativa dos solos são normalmente baixos (JUNIOR, 1988).

Na biosfera e na litosfera o nitrogênio se perde do solo facilmente por lixiviação, volatilização e desnitrificação, e estas perdas são potencialmente maiores em solos tropicais (JUNIOR, 1988), se fazendo necessário o uso adequado da adubação tanto do ponto de vista agrônomo e ecológico, como econômico. Contudo, sua excessiva concentração em solos e águas pode acarretar problemas de eutrofização e intoxicação de organismos (VAN LONN & DUFFY, 2001).

Em contraposição ao custo elevado da utilização dos fertilizantes nitrogenados e ao impacto ambiental causado por sua aplicação no solo, a Fixação Biológica de Nitrogênio

(FBN) apresenta-se como uma “tecnologia limpa”, ecológica e barata capaz de contribuir significativamente para o aumento da disponibilidade deste nutriente para as plantas além proporcionar o aumento das produções. Alguns autores têm apresentado como forma alternativa para a economia de fertilizante nitrogenado a qual pode suplementar ou, até mesmo, substituir a utilização destes fertilizantes (REIS JÚNIOR *et al.*, 1998; BERGAMASCHI, 2006; NOVAKOWISKI, *et al.*, 2011).

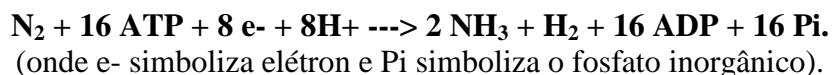
2.2.1 Fixação Biológica de Nitrogênio em Gramíneas

Uma das mais importantes possibilidades para transformar o nitrogênio atmosférico disponível para as culturas agrícolas é a fixação biológica (FBN). Neste processo, organismos procariotos são capazes de assimilar o N₂ atmosférico e convertê-lo a uma forma assimilável pelas plantas, como o NH₃. Por se tratar de um processo natural de enriquecimento do solo o estímulo desta prática proporciona a redução da aplicação de insumos nitrogenados sintéticos, que além de incrementarem custos à produção vegetal impactam negativamente com a degradação do solo e inviabilização de cursos d'água e lençóis freáticos.

Um grande número de plantas cultivadas mantém em suas raízes uma população ativa de microrganismos diazotróficos, onde muitas dessas associações sofreram especializações ao longo do processo evolutivo, resultando em relações muito estreitas entre a planta e a bactéria, inclusive promovendo a formação de estruturas especializadas que garantem proteção contra fatores adversos do solo (SPRENT & FARIA, 1989).

Segundo Evans & Burris (1992), as bactérias diazotróficas podem ser classificadas em três grupos: bactérias de vida livre, que fixam o nitrogênio para o seu próprio uso; bactérias associativas, que contribuem para o crescimento da planta sem a formação de estruturas diferenciadas, não estabelecendo uma simbiose; bactérias simbióticas, que estabelecem uma interação muito estreita entre o macro e o microsimbionte e, em alguns casos, são formadas estruturas diferenciadas denominadas nódulos. Estes microrganismos geralmente se encontram no interior de raízes que estão abaixo do solo ou dentro de tecidos densos de plantas, como, por exemplo, vasos do xilema, eles estão provavelmente crescendo em um ambiente com baixas concentrações de oxigênio, que é necessário para a máxima atividade da enzima nitrogenase, enzima que converte N₂ em amônia (Olivares *et al.*, 1997).

Todas as bactérias diazotróficas, possuem um complexo enzimático chamado nitrogenase, que dentre outros substratos alternativos, catalisa a redução do nitrogênio atmosférico até amônio (NEVES, 1993) segundo a reação:



Do ponto de vista energético é dispendioso para o organismo que a realiza uma vez que necessita de 16 moléculas de ATP para realizar esta conversão.

A nitrogenase é uma enzima extremamente versátil, pois além do N₂, catalisa a redução de vários outros substratos, tais como o acetileno. Em função disto, a atividade de redução do acetileno (C₂H₂) a etileno (C₂H₄), tem particular importância no estudo dos sistemas fixadores de N₂ (MOREIRA E SIQUEIRA, 2002) e têm sido amplamente utilizada como metodologia de quantificação da fixação de nitrogênio pelas bactérias diazotróficas.

Os estudos sobre quantificação da FBN associada à cana-de-açúcar começaram no início dos anos setenta, aplicando-se as técnicas de redução de acetileno em raízes de cana-de-açúcar (DÖBEREINER *et al.*, 1972; XAVIER, 2004), a partir de então muitos outros trabalhos demonstraram que a contribuição de FBN associada às plantas de cana-de-açúcar

cultivadas no campo e sem inoculação varia de zero a 60% (URQUIAGA *et al.*, 1992; POLIDORO *et al.*, 2001).

O levantamento da ocorrência de bactérias diazotróficas associadas a quatro diferentes genótipos da cana-de-açúcar (*Kracatau*, CB-45-3, SP70-1143 e *Chunee*), mostra a presença das bactérias *Azospirillum lipoferum*, *A. brasiliense*, *A. amazonense*, *Herbaspirillum spp* e *Acetobacter diazotrophicus* nos quatro genótipos e em todas as partes amostradas (raízes, colmo e folhas), com exceção de *A. amazonense*, na qual as bactérias não foram isoladas das folhas de nenhuma das três coletas (REIS JR. *et al.*, 2000). Várias espécies podem infectar os tecidos internos da planta, assim, a exploração e melhoria da FBN em cana-de-açúcar estão condicionadas ao fato de que não existe uma “candidata clara” observada como única espécie responsável pela fixação de N₂.

Entretanto, apesar dos inúmeros avanços, ainda não se tem um controle da FBN nessa cultura, evidenciando a necessidade de continuar selecionando cultivares com alto potencial para FBN (COELHO *et al.*, 2003; URQUIAGA *et al.*, 2003; XAVIER, 2004) para garantir que a utilização e seleção de inoculantes (OLIVEIRA *et al.*, 2002; CANUTO *et al.*, 2003), e diferentes tipos de manejo incrementem este processo (LEAL, 2011).

2.3 Microrganismos Promotores de Crescimento de Gramíneas

Os organismos fixadores de nitrogênio podem ser de vida livre ou estabelecerem relações simbióticas em grau variado com organismos eucariontes de diversas categorias taxonômicas, geralmente vegetais superiores (CORDEIRO, 2004; SILVA, 2008).

Entre as bactérias diazotróficas isoladas de colmo e raízes de cana-de-açúcar destacam-se as espécies *Herbaspirillum seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *Glucanacetobacter diazotrophicus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enerobacter spp*, e mais recentemente um isolado relacionado à *Pantoea sp.* (DONG ET AL., 1994; BALDANI *et al.*, 1996; BODDEY *et al.*, 2003; LOIRET *et al.*, 2004). Outros isolados da cana-de-açúcar foram caracterizados, através de métodos moleculares como pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Kluyera*, *Staphylococcus*, *Curtobacterium* e *Brevibacillus* (MAGNANI, 2005; LIMA, 2011).

Estas bactérias diazotróficas e endofíticas apresentam grande potencial para utilização na agricultura dado a habilidade de colonizar o interior das plantas e de se localizar em nichos protegidos do oxigênio, e assim, o potencial da enzima nitrogenase, para fixar nitrogênio pode ser mantido no nível máximo (BALDANI & DÖBEREINER, 1995). Muitas espécies de bactérias fixadoras de nitrogênio são conhecidas e têm sido isoladas de plantas cultivadas, como por exemplo, arroz, milho, cana-de-açúcar e sorgo (REIS *et al.* 1994; OLIVARES *et al.* 1996; REIS JR. *et al.* 2000).

Atualmente a FBN é muito estudada quanto a sua contribuição para o crescimento vegetal. No entanto, já existem fortes indícios de que estas bactérias contribuem com diversos outros mecanismos promotores de crescimento de plantas. Essas bactérias são chamadas, normalmente, de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP), sendo descritas diversas espécies e estirpes de gêneros como *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum* e *Pseudomonas*. Estes, além de fixar N₂, podem estimular as plantas através da produção de fitohormônios, solubilização de fósforo e zinco, indução de resistência a doenças ou competição com patógenos, resistência a estresses, entre outros (DOBBELAERE *et al.* 2003; ARENCIBIA *et al.* 2006; SARAVANA *et al.* 2007).

2.3.1 Gênero *Azospirillum* associado às gramíneas

Estudos de isolamento e identificação de bactérias fixadoras de N₂ em gramíneas forrageiras se iniciaram na década de 60, com destaque para algumas espécies do gênero *Azospirillum*. Desde a primeira descrição detalhada do gênero *Azospirillum* com duas espécies, *Azospirillum lipoferum* e *Azospirillum brasilense* (TARRAND *et al.*, 1978), membros de *Azospirillum* tem sido isolados das raízes de diversas gramíneas tanto cultivadas quanto silvestres e cereais e de solos das regiões tropical, subtropical e zona temperada por todo o mundo (DÖBEREINER *et al.*, 1976; ALLY *et al.*, 1983; LADHA *et al.*, 1987; KIRCHHOF *et al.*, 1997a; GUNARTO *et al.*, 1999). O meio semi-sólido livre de nitrogênio foi a chave do sucesso do isolamento das bactérias fixadoras de nitrogênio microaerofílicas. Utilizando esta técnica, foi possível isolar e descrever três outras espécies: *Azospirillum amazonense* (Magalhães *et al.*, 1983), *Azospirillum halopraeferens* (REINHOLD *et al.*, 1987) e *Azospirillum irakense* (KHAMMAS *et al.*, 1989).

O gênero *Azospirillum* compreende bactérias endofíticas facultativas, podendo colonizar tanto a rizosfera como o interior das raízes. Nesta associação não ocorre a formação de uma estrutura especializada para a fixação do nitrogênio (nódulos) e as bactérias podem invadir ou não o tecido da planta através de ferimentos na epiderme, pontos de emissão de raízes secundárias e estômatos, sendo distribuída para o restante da planta via vasos condutores (REIS *et al.*, 2006). Assim, os produtos da fotossíntese são liberados pela planta, e absorvidos pelas bactérias que estão na rizosfera ou no interior da planta enquanto as bactérias fixam o nitrogênio e transferem o NH₄⁺ para a planta além de disponibilizarem, também, compostos do grupo das auxinas, substâncias relacionadas à regulação do crescimento vegetal, auxinas.

Tem sido observado certo padrão na relação de colonização das gramíneas por espécies específicas de *Azospirillum*. Döbereiner (1982a) descreve que *A. lipoferum* ocorre preferencialmente no córtex de milho, sorgo e de diversas outras gramíneas com a via fotossintética C₄, mas foi também observada em uma espécie ciperácea, enquanto *A. brasilense* ocorre preferencialmente associado a trigo, cevada, aveia, arroz, centeio e gramíneas com via C₃ (DÖBEREINER & DE-POLLI, 1980; ROCHA *et al.*, 1981). Segundo Reinhold *et al.*, (1987), *A. halopraeferans* é mais específico, tendo sido isolado apenas de uma espécie de gramínea, o ‘kallargrass’ (*Leptochloa fusca*), planta nativa do Paquistão, altamente tolerante a solos salinos. Já a espécie *A. irakense*, tem sido apenas isolada de raízes de arroz (KHALMMAS *et al.*, 1989).

Pouco se sabe, porém, sobre sobrevivência de *Azospirillum* no solo na ausência da planta hospedeira, mas tem sido demonstrado que a bactéria apresenta vários mecanismos fisiológicos de proteção (formação de cistos, produção de melanina, de poli-β- hidroxibutirato e de polissacarídeos), que podem facilitar a sobrevivência em condições desfavoráveis (DEL GALLO & FENDRIK, 1994).

2.3.1.1 *Azospirillum amazonense*

A primeira estirpe isolada de *A. amazonense* (15M1) (MAGALHÃES, 1981) foi obtida mediante cultivos de enriquecimento de raízes de *Brachiaria brizantha*, coletada na Amazônia, em meio NFb de Döbereiner (1980), modificado por meio da adição de 0,5 g de manitol e 0,5 g de sacarose. Nesse trabalho, foi verificada a capacidade desta estirpe em crescer em sacarose como única fonte de carbono, ao contrário das outras espécies então conhecidas de *Azospirillum* (*A. lipoferum* e *A. brasilense*). O crescimento destas três espécies de *Azospirillum* em diferentes fontes de carbono está descrita na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Crescimento de bactérias do gênero *Azospirillum* em diferentes fontes de carbono (modificado de MAGALHÃES *et al.*, 1983).

	<i>A. amazonense</i>	<i>A. lipoferum</i>	<i>A. brasilense</i>
Malato, Lactato, Piruvato, Fumarato	+	+	+
Keto glutarato	+/-	+	-
Trans-aconitato	+/-	+	+/-
Citrato	-	+	+/-
Glicose	+	+ A	-
Frutose	-	+ A	+
Sacarose	+	-	-
Ramnose	+ A	n.d.	n.d.
Galactose	+ A	+ A	+/- A
Arabinose	+	+ A	+/- A
A=Produção de ácido			

Outros experimentos, como a comprovação do melhor crescimento em valores de pH entre 5,0 e 6,0 e a definição da temperatura ótima para fixação de N₂ de 35°C, associados ao aprimoramento do meio de enriquecimento usado para avaliar a distribuição ecológica da espécie (MAGALHÃES & DÖBEREINER, 1984), permitiram um melhor detalhamento de organismo pelos pesquisadores do Programa Nacional de Pesquisa em Biologia do Solo - NPBS/EMBRAPA, o que levou à publicação conjunta do trabalho de proposição da espécie (MAGALHÃES *et al.*, 1983).

Uma comparação dos aspectos fisiológicos e morfológicos entre *A. amazonense* e as principais bactérias deste gênero foi proposta por MAGALHÃES *et al.* (1983). Os autores descrevem diversas características importantes como diferenciação das colônias quanto à cor e ao formato (Figura 2.2), diferenciação quanto ao formato da célula e produção de grânulos de polihidroxibutirato - PHB (Figura 2.3), tolerância da atividade da nitrogenase ao O₂, capacidade de desnitrificação e uso da sacarose como fonte única de carbono, dentre outros itens que podem ser observados na Tabela 2.2 e na Tabela 2.3.

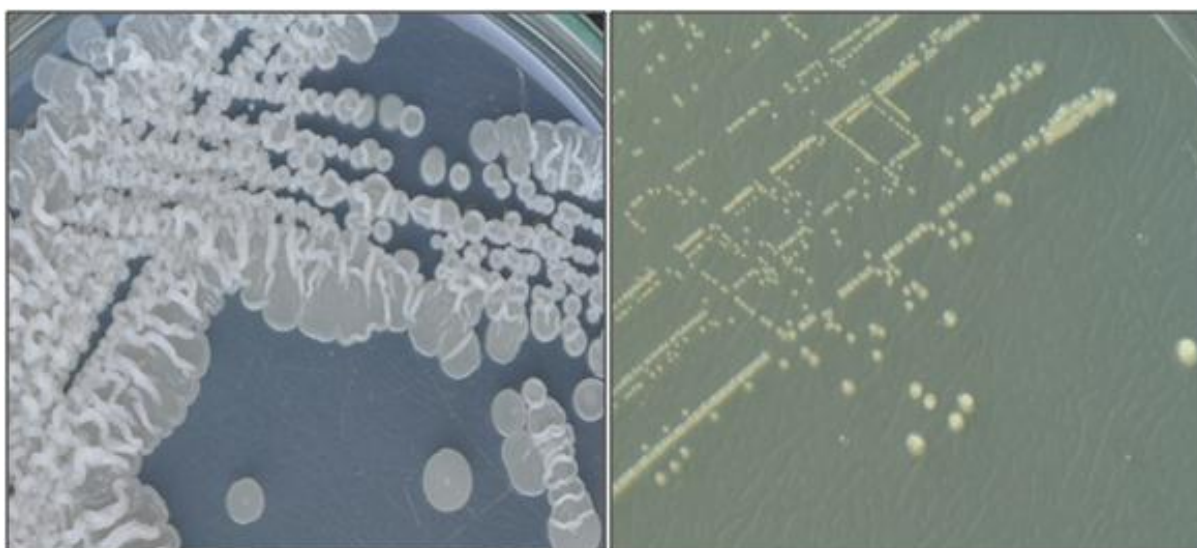


Figura 2.2 – Morfologia das colônias de *Azospirillum amazonense* cultivada em meio batata (esquerda) e em meio LGI (direita). Fonte: Laboratório de Coleção de Culturas – Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia - CNPAB.

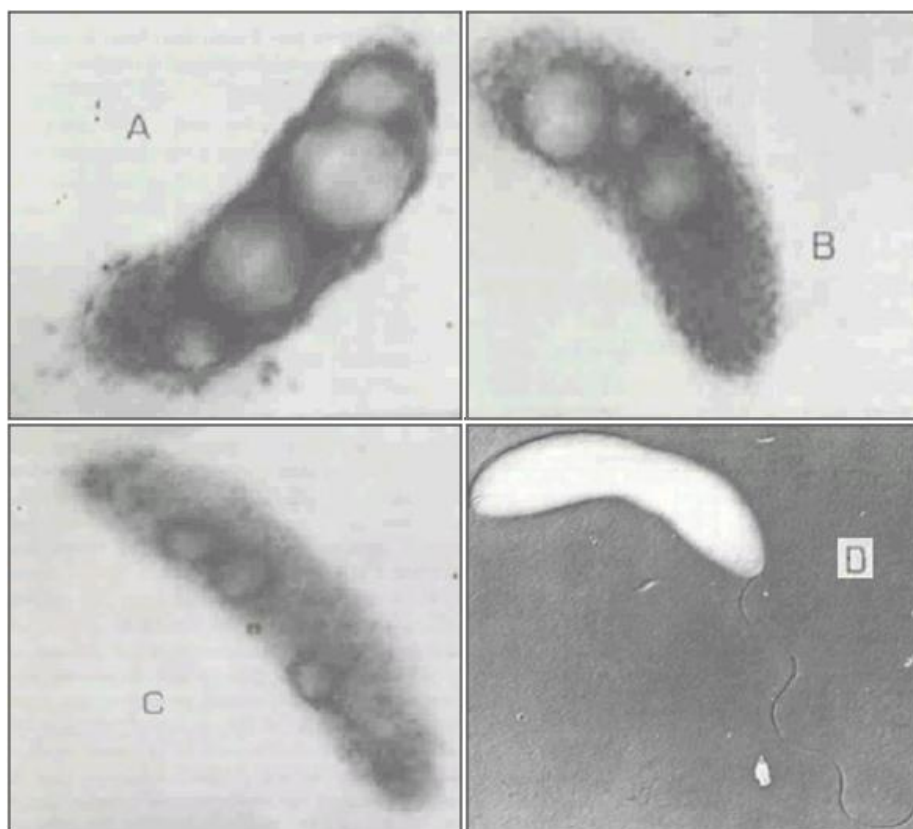


Figura 2.3 – Morfologia das células em diferentes condições de cultivo. Microscopia eletrônica de transmissão do *Azospirillum amazonense* em Meio LGI sem (A) e com KNO_3 (B); ou em Ágar nutriente (C). Microscopia eletrônica de varredura de cultivo em Ágar nutriente (D) (15.900x) Fonte: MAGALHÃES *et al.*, 1983.

Tabela 2.2 – Comparativo das características morfológicas entre espécies do gênero *Azospirillum spp* (Modificado de MAGALHÃES *et al.*, 1983.)

	<i>A. amazonense</i>	<i>A. lipoferum</i>	<i>A. brasilense</i>
Célula em Formato Vibrioide	+	+	+
Motilidade	+	+	+
Arranjo Flagelar			
Monotrichous	+	+	+
Lophotrichous	-	-	-
Peritrichous	-	-	-
Formação de Cistos	-	-	-
Fixação de Nitrogênio			
somente em baixo pO_2	+	+	+
Película ondulada em meio semi-sólido	+	+	+
Associada à raiz	+	+	+
Comprimento da célula [μm]	0,9 a 1,0	1,0 a 1,5	1,0 a 1,2
Hipertrofia da raiz	-	-	-
Fotoautotrofica	-	-	-
Pigmentação em Meio Batata	Branco	Rosa	Rosa
Mol% G+C DNA	67 a 68	69 a 70	69 a 70

Tabela 2.3 – Comparativo das características fisiológicas entre espécies do gênero *Azospirillum spp* (Modificado de MAGALHÃES *et al.*, 1983.)

	<i>A. amazonense</i>	<i>A. lipoferum</i>	<i>A. brasilense</i>
Crescimento em pH > 6,8	pobre	bom	bom
Crescimento em pH = 6,0	bom	bom	pobre
Tolerância ao O₂ para atividade da Nitrogenase	muito baixa	baixa	baixa
Dissimilação do:			
NO ₃ para o NO ₂	+	+	+
NO ₂ para o N ₂ O	-	+	+
Células polimorfas em meio alcalino	-	+	-
Exigência de Biotina	-	+	-
Uso de Sacarose	+	-	-
Tempo de Geração sob pO₂ ótimo	10h	5 a 6h	6h

2.4 Produção de Compostos Indólicos

Os compostos indólicos são metabólitos pertencentes à classe das auxinas, um grupo fitormônios reguladores do desenvolvimento de plantas.

A produção de auxinas e outros fitormônios por RPCPs tem sido considerada o fator responsável pelo crescimento das plantas e produtividade de diversas culturas. Os efeitos resultantes mais marcantes da inoculação de *Azospirillum* são as diversas alterações morfológicas no sistema radicular incluindo aumentos no comprimento das raízes, número de raízes laterais, volume radicular, peso seco das raízes, número, densidade e emergência de pelos radiculares, área radicular e divisão celular no meristema de raízes. Estas alterações radiculares pode influenciar a absorção de nutrientes e de água pelas plantas resultando em maior crescimento e produtividade (BASHAN & LEVANONY, 1990).

A auxina natural mais importante é o Ácido Indol-3-Acético (AIA), entretanto existem outros compostos denominados auxinas sintéticas que produzem efeitos similares aos do AIA e que são regularmente utilizados nas praticas agrícolas.

O papel deste fitormônio para a bactéria é pouco conhecido; contudo, tem sido sugerido recentemente que a produção de auxinas pode ser um mecanismo utilizado pela bactéria para interagir com a planta (PATTEN & GLICK, 1996; SPAEPEN *et al.*, 2007). Através da produção de fitormônios, as bactérias podem estimular o crescimento vegetal e, consequentemente, a produção de metabólitos pelas plantas que, por sua vez, podem servir como nutrientes para as os RPCPs.

Pelos menos três vias biossintéticas foram descritas na produção de AIA (Figura 2.4) em *Azospirillum*: duas dependentes de triptofano, como a via indole-3-acetamida (IAM) e indole-3-piruvato (IpyA), e uma outra independente de triptofano (DOBBELAERE *et al.*, 1999; LAMBRECHT *et al.*, 2000).

Recentemente foi revelado que a enzima indole-3-piruvato decarboxilase, codificada pelo gene ipdC, é comum às duas vias IpyA, e a via que independe de triptofano, cujo precursor ainda é desconhecido, sendo possível que ambas tenham início em um intermediário comum, o IpyA (LAMBRECHT *et al.*, 2000; RADWAN *et al.*, 2004).

Diversos autores têm publicado o montante de AIA produzido por algumas estirpes do *Azospirillum*. Hartmann *et al.* (1983) verificaram que a produção de AIA em culturas puras de

A. brasilense ocorre durante a fase de crescimento exponencial, produzindo uma quantidade entre 227,4 e 284,4 μM de AIA em cultivos de estirpes silvestres quando crescidas em meio mineral suplementado com triptofano. Nestas mesmas condições estirpes de *A. lipoferum* apresentaram uma baixa produção de AIA com valores variando entre 9,1 e 14,2 μM .

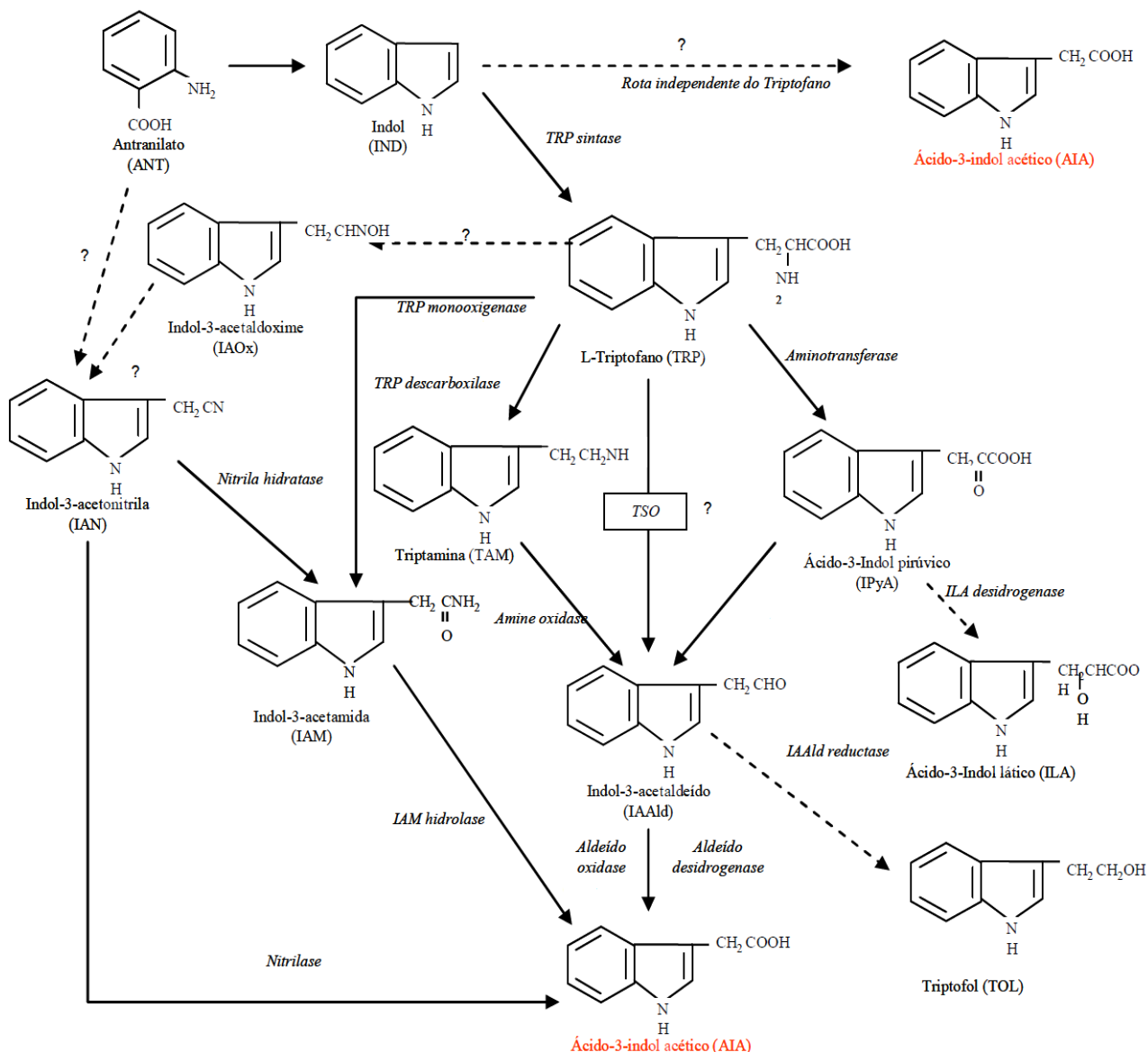


Figura 2.4 – Rotas e enzimas envolvidas na biossíntese de AIA em bactérias (Adaptado de PATTEN & GLICK, 1996)

Mascarua-Esparza *et al.* (1988) concluíram que *A. brasilense* isolados de cactos produziram quantidades entre 207,6 e 426,6 μM de AIA, enquanto estirpes de *A. lipoferum* produziram entre 39,7 a 99,5 μM .

Radwan *et al.* (2002) avaliaram a capacidade de Produção AIA produzido por diversas estirpes de *Azospirillum* (Tabela 2.4) realizando o cultivo em meio NFB (ácido málico), incubado por 48h a 35°C.

Tabela 2.4 – Produção AIA produzido por diversas estirpes de *Azospirillum* (Modificado de Radwan, 2002).

<i>Azospirillum spp.</i>	AIA (µM)	
	(Triptofano)	AIA (µM)
<i>Sp 109 (brasileense)</i>	246,8	31
<i>Sp 7 (brasileense)</i>	266,7	5,8
<i>Cd (brasileense)</i>	378,7	15,6
<i>Sp 245 (brasileense)</i>	221,4	9,8
<i>245 nif (brasileense)</i>	26,5	7
<i>Br 17 (lipoferum)</i>	229,2	25,8
<i>Y1 (amazonense)</i>	50,3	29,3
<i>Y2 (amazonense)</i>	32	26,5
<i>Y6 (amazonense)</i>	19,1	8,5

Isolados de *A. amazonense* obtidos a partir de amostras de raízes das três espécies de *Brachiaria* foram cultivados por Reis Junior *et al.* (2004), em meio LGI acrescido de 100 mg mL⁻¹ de L-triptofano no escuro por 72 h a 30 °C. A quantidade de AIA produzida variou de 35 a 110 mM.

A inoculação com as estirpes *Sp 245 (A. brasileense)* e *Sp 59b (A. lipoferum)* promoveu aumento no crescimento da parte aérea, raiz e ramificações radiculares de plantas de arroz (linhagens promissoras de terras altas) em condições de laboratório. As maiores respostas, tanto no comprimento da parte aérea, quanto da raiz, foram obtidas quando se utilizou *Azospirillum brasileense Sp245* como inoculante (DIDONET *et al.*, 2003).

2.5 Mercado para Inoculantes

O termo “inoculante” refere-se aos microrganismos vivos, capazes de promover o crescimento vegetal de forma direta ou indireta, através de diferentes mecanismos, sendo denominados mundialmente como biofertilizantes (REIS, 2007).

O produto denominado inoculante é o conjunto composto por um veículo de inoculação contendo um ou mais microrganismos. Este veículo deve ser capaz de manter um maior número de células viáveis por um determinado tempo de armazenamento (lei n.º 86955 de 18 de fevereiro de 1982). Além disto, este produto deve desempenhar as funções previstas como, por exemplo, fixar nitrogênio atmosférico ou atuar como bactérias promotoras de crescimento.

Os inoculantes mais comuns no mercado são o inoculante líquido, que utiliza como veículo de inoculação os meios líquidos que contenham um grande número de células e que as proporcionem longevidade e regulação da pressão osmótica, e o inoculante turfoso, que utiliza como veículo de inoculação a turfa em pó ou granulada, que apresenta um alto teor de matéria orgânica, podendo preservar um elevado número de células por um longo período.

A Argentina lançou um produto denominado Graminante™, produzido pela empresa Laboratórios Alquimia S.A., a base de pó de carbonato de cálcio, contendo uma mistura de estirpes de *Azospirillum spp.*, para ser utilizado principalmente na cultura do milho. Os fabricantes asseguram que este produto pode aumentar a produção de grãos em cerca de 20%. (FERREIRA, 2008).

Nos Estados Unidos foi desenvolvido um produto com o nome de Azo-Green™. Na Itália, Alemanha e Bélgica foi desenvolvido um produto contendo uma mistura de *A. brasileense* (estirpe Cd) e *A. lipoferum* (estirpe Br17), o nome comercial do produto é Zea-Nit™.

Na França foi lançado outro produto a base de *Azospirillum* contendo a estirpe CRT1, que foi utilizado em um experimento com milho no nordeste de Togo, na África, e promoveu o aumento de 100% na produção de grãos (FAGES & MULARD, 1988). No México foi desenvolvido um fertilizante para milho denominado “Fertilizante para Milho”, que tem sido usado com sucesso visto a sua aplicação em 5.000 ha no ano de 1993 (OKON & LABANDERA-GONZALEZ, 1994; FERREIRA, 2008). Entretanto, nenhum desses inoculantes introduzidos no mercado mundial apresentou comprovada eficiência quando testados no Brasil (CAMPOS *et al.*, 1999; FERREIRA, 2008). Essa ineficiência está associada à dificuldade apresentada pelos microrganismos presentes neste inoculante de se adaptarem às características tropicais climáticas e do solo apresentadas pelo Brasil.

Se considerarmos a área plantada com as quatro culturas citadas acima (arroz, trigo, milho e cana-de-açúcar), pode-se projetar que a diminuição de fertilizantes com a aplicação de nitrogênio, no Brasil, seria em torno de bilhões de reais ao ano, além de proporcionar benefícios indiretos como a geração de empregos na indústria de inoculantes e na agricultura, ainda ter-se-ia os benefícios diretos ao meio ambiente (FERREIRA, 2008).

Estudos de inoculação em trigo com a estirpe JA04 de *A. brasilense* acrescido da adubação com 15 kg N.ha⁻¹ demonstraram um aumento no nitrogênio-total e produção de grãos, resultados estes similares ao tratamento que recebeu 60 kg N.ha⁻¹ (DIDONET *et al.*, 1996).

Já na cultura do milho, experimentos com o inoculante “Graminante” a base de *Azospirillum* spp., os tratamentos com inoculação e aplicação de adubação nitrogenada obtiveram produção de 6404 kg ha⁻¹, no tratamento sem inoculação, a produção foi de 5500kg.ha⁻¹ (CAVALLET *et al.*, 2000). Estes autores concluíram que dependendo da disponibilidade de nitrogênio a inoculação das sementes aumentou a produção em 30%.

Resultados semelhantes foram encontrados por DALLA SANTA *et al.* (2004) em experimentos de inoculação em milho em condições de campo, por dois anos consecutivos, com *Azospirillum* sp estirpes RAM-7 e RAM-5. Esses autores observaram que com o uso dessas estirpes possível de reduzir em 40% a quantidade de fertilização nitrogenada recomendada em cada experimento.

Embora o Brasil seja referência mundial em fixação biológica de nitrogênio (FBN) em plantas não leguminosas como, por exemplo, o arroz, trigo, milho e cana-de-açúcar e de ser o responsável pela identificação de diversas bactérias diazotróficas dos gêneros *Herbaspirillum*, *Azospirillum*, *Glucanacetobacter*, *Burkholderia*, ainda não existe no mercado nacional um biofertilizante comercial destinado a estas culturas em contraste aos países como Argentina, México e EUA que já comercializam produtos com essas bactérias. Este fato que pode ser explicado pela baixa reprodutibilidade na resposta da planta à inoculação, entretanto, vale lembrar que diversos autores observaram uma economia de até 50 kg de N. ha⁻¹, em algumas plantas não leguminosas (BALDANI *et al.*, 2000; FERREIRA *et al.*, 2003; FERREIRA, 2004; GUIMARÃES *et al.*, 2007).

2.6 Bioprocessos

O extraordinário potencial metabólico envolvido na síntese e degradação das mais variadas estruturas químicas por bactérias, fungos, algas e protozoários está distribuído em microrganismos com características fisiológicas muitas vezes peculiares (PEREIRA JR *et al.*, 2008), e é este potencial que a indústria de bioprocessos visa conhecer e maximizar a fim de obter um produto de considerável valor agregado para fins comerciais.

A Figura 2.5 demonstra o esquema geral de um bioprocessos, onde se buscou ressaltar os pontos essenciais. Como pode ser observado, o sucesso deste processo depende muito da

correta definição de quatro pontos básicos: o microrganismo a ser utilizado, o meio de cultura, a forma de condução do processo fermentativo e as etapas de recuperação do produto (*downstream*).

Na verdade, esses quatro pilares interagem enormemente, sendo necessário defini-los de forma conjunta, levando em consideração os aspectos biológicos e econômicos, o que torna bastante complexa essa definição (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

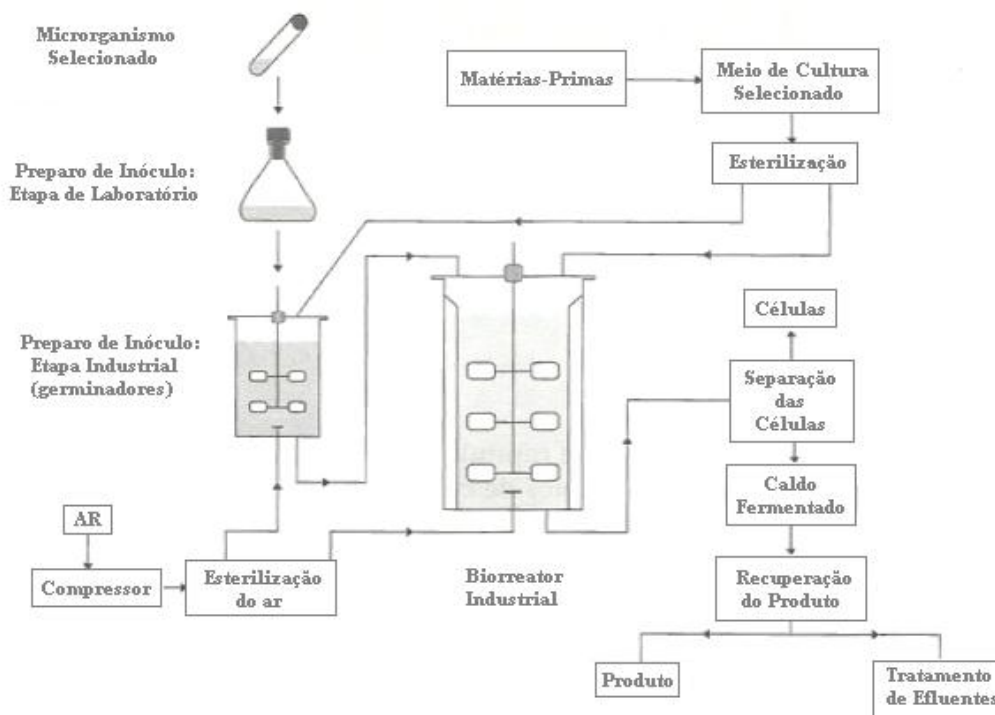


Figura 2.5 – Esquema geral de um bioprocesso (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

2.6.1 Meios de cultivo para produção industrial

Segundo Schuller (1998), os meios seleccionados para o isolamento e cultivo de microrganismos podem ser classificados, quanto à sua finalidade, da seguinte maneira:

- ✓ Meios de cultura gerais, que permitem o desenvolvimento da maior parte dos principais grupos de microrganismos.
- ✓ Meios de cultura seletivos, que permitem a proliferação de grupos específicos de microrganismos, enquanto inibem o crescimento de outros. A seletividade deve-se à utilização de compostos inibidores, escolha do pH apropriado ou à omissão de nutrientes específicos.
- ✓ Meios de cultura diferenciais, que permitem a distinção de um grupo de microrganismos com características específicas como, por exemplo, atividade lipolítica ou proteolítica (JARVIS E WILLIAMS, 1987; SCHULLER, 1998).

Após definida a finalidade do meio de cultivo, a sua formulação deve levar em conta as características nutricionais do microrganismo a ser cultivado. Sabe-se que não existe uma formulação única para o desenvolvimento de microrganismos em condições artificiais, sendo assim, a composição do meio deverá ser sempre que possível, o mais parecida com as características do “habitat” natural dos microrganismos em estudo (MOO-YONG, 1985).

Quanto à sua composição os meios são classificados em complexos ou quimicamente definidos. Os meios complexos são formulados com base em subprodutos industriais e extratos naturais, tais como: melaço, milhocina, extrato de levedura e outros. Sua composição é complexa e variável e contém várias fontes de cada elemento (PEREIRA JR *et al.*, 2008). Estes meios frequentemente requererem suplementação alguns elementos, tais como: N, Mg e P. Os meios complexos são extensamente utilizados em Microbiologia básica (taxionomia, fisiologia e genética), Microbiologia de águas e de alimentos e em Fermentações industriais. Exemplos de componentes de meios complexos encontram-se na Tabela 2.5.

Tabela 2.5 – Exemplos de componentes de meios complexos industriais (Pereira Jr *et al.*, 2008).

Componente	Origem
Melaço	Indústria açucareira
Milhocina	Subproduto do processamento de milho
Licor sulfítico	Efluente da indústria de polpa e papel
Soro/permeado de soro de leite	Subproduto do processamento de queijo
Vinhoto	Subproduto da produção de etanol
Farinha de soja e pescado	Industrialização da soja e pescado
Extrato de levedura	Indústria de levedura de panificação
Glicerol	Subproduto da indústria de biodiesel

Os meios quimicamente definidos são formulados com compostos puros, tais como: glicose, sulfato de amônio, fosfato mono ou di ácido de potássio etc. Sua composição química é conhecida e reproduzível, contendo fontes de cada elemento e dos nutrientes essenciais requeridos. Estes meios são usados preferencialmente em pesquisa e desenvolvimento de bioprocessos (PEREIRA JR *et al.*, 2008).

Alguns outros aspectos são apontados por Schmidell (2001) como fundamentais para que se estabeleça a viabilidade do bioprocessos no âmbito tanto produtivo quanto econômico:

- ✓ Ser o mais barato possível;
- ✓ Ter composição relativamente fixa;
- ✓ Permitir algum tempo de armazenagem;
- ✓ Não imputar dificuldades nos processos de Downstream;
- ✓ Auxiliar no controle do processo, evitando variações drásticas de pH, ou formação excessiva de espuma.

2.6.2 Cinética de bioprocessos

O estudo cinético de um processo fermentativo consiste inicialmente da análise dos valores de concentração de um ou mais componentes do sistema de cultivo, em função do tempo de fermentação. Entende-se por componentes do sistema de cultivo o microrganismo ou biomassa (X), os produtos do metabolismo ou metabólitos (P) e os nutrientes ou substratos (S) que compõem o meio de cultura, tais valores experimentais de concentração quando representados em função do tempo, permitirão os traçados das curvas de ajuste e são indicados por $X=X(t)$, $P=P(t)$ e $S=S(t)$ (HISS, 2001; PAGNONCELLI, 2008).

A quantificação destes parâmetros é de muita importância para o dimensionamento de uma instalação produtiva, uma vez que eles representam parte de um conjunto de dados cinéticos essenciais à transposição de um experimento de laboratório para a escala industrial. A cinética possibilita também uma comparação entre as diferentes condições de cultivo, por

intermédio de variáveis como: as velocidades de transformação e os fatores de conversão. Quando o tempo de duração da fermentação for de importância primordial por razões econômicas, as produtividades devem ser empregadas como referências numéricas, em vez de algum fator de conversão (HISS, 2001; PAGNONCELLI, 2008).

As taxas de crescimento do microrganismo (r_x), de consumo do substrato (r_s) e de formação do produto (r_p) são definidas nas equações (1) (2) e (3), respectivamente.

$$r_x = \frac{dX}{dt} \quad (1)$$

$$r_s = -\frac{dS}{dt} \quad (2)$$

$$r_p = \frac{dP}{dt} \quad (3)$$

A taxa de crescimento celular, quando avaliada no momento de crescimento máximo, passa a ser denominada de produtividade em biomassa. No caso de se considerar o produto em crescimento máximo denomina-se produtividade do produto (HISS, 2001; PAGNONCELLI, 2008).

Considerando um sistema de cultivo descontínuo pode-se observar que à medida que a concentração celular aumenta a transformação do substrato em produto também sofre aumento. Analisando as taxas instantâneas de cada parâmetro com relação à concentração microbiana em determinado momento, obtêm-se as velocidades específicas de crescimento (μ_x), de consumo de substrato (μ_s) e de formação de produto (μ_p), conforme descrito nas equações (4) (5) e (6), respectivamente.

$$\mu_x = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (4)$$

$$\mu_s = \frac{1}{X} \left(-\frac{dS}{dt} \right) \quad (5)$$

$$\mu_p = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt} \quad (6)$$

Considerando um determinado tempo t de fermentação, os correspondentes valores de X , S e P podem ser relacionados entre si através dos fatores de conversão, definidos nas equações (7) (8) e (9), como fator de conversão de substrato em biomassa ($Y_{x/s}$), biomassa em produto ($Y_{p/x}$) e substrato em produto ($Y_{p/s}$), respectivamente.

$$Y_{x/s} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad (7)$$

$$Y_{p/x} = \frac{P - P_0}{X - X_0} \quad (8)$$

$$Y_{p/s} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} \quad (9)$$

Onde: X_0 = Biomassa inicial (g); S_0 = Substrato inicial (g) e P_0 = (g).

O microrganismo ou agente ativo promove a transformação dos componentes do meio em produtos graças às atividades de diversas enzimas que, por sua vez, são sintetizadas pelo

próprio microrganismo, sendo essas sínteses controladas pelo meio externo (fenômenos de indução e repressão) (HISS, 2001; PAGNONCELLI, 2008).

Durante o crescimento celular são observadas diferentes fases neste processo. Elas foram enumeradas e descritas conforme Figura 2.6.

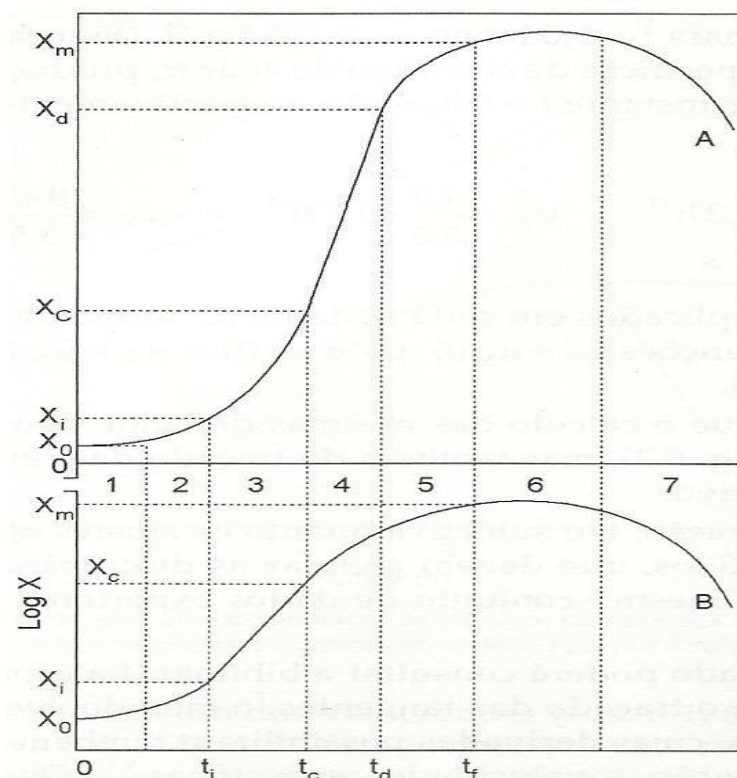


Figura 2.6 – Curva de crescimento do microrganismo em cultivo descontínuo, representada em ordenadas lineares (A) e semilogarítmica (B). As sete fases estão descritas no texto (HISS, 2001).

1. Fase “lag” ou de latência: é um período de adaptação durante o qual a célula sintetiza as enzimas necessárias ao metabolismo dos componentes presentes no meio. Não ocorre reprodução celular e assim $X=X_0$ = constante. A duração desta fase é determinada pela concentração do inoculo e pelo estado fisiológico das células.
2. Fase de transição: é o início da reprodução propriamente dita. Ocorre o aumento gradual da velocidade de reprodução (Eq. 1) e da velocidade específica de crescimento (Eq. 4).
3. Fase logarítmica ou exponencial: nessa fase a velocidade específica de crescimento é constante e máxima ($\mu_x = \mu_{max}$). A velocidade é diretamente proporcional à concentração celular.
4. Fase linear de crescimento: é a fase que apresenta velocidade de reprodução constante.
5. Fase de desaceleração: devido ao esgotamento de um ou mais componentes do meio de cultura e, também, devido ao acúmulo de metabólitos inibidores, as velocidades de crescimento específicas diminuem até se anularem.
6. Fase estacionária: nessa fase a concentração celular atinge o valor máximo e constante X_{max} , há um equilíbrio entre as velocidades de crescimento e de morte celular.
7. Fase de declínio ou lise: A velocidade de morte celular excede a velocidade de crescimento. Durante esta fase ocorre “lise” celular, autólise ou rompimento dos microrganismos, provocado pela ação de enzimas intracelulares (HISS, 2001).

2.6.3 Biorreatores e Bioprocessos

A mistura reacional, constituída de meio (de cultivo ou para conversão enzimática) e agente biológico, é processada em biorreatores, onde deverão ser mantidas as condições ótimas para o agente biológico expressar o máximo de sua atividade catalítica, seja através do metabolismo da célula ou de simples reação enzimática. Quando se tratar de um processo puramente enzimático, o meio reacional é adicionado de unidades de atividade enzimática e a catálise é realizada também em biorreatores para máximo de conversão e produtividade (PEREIRA JR *et al.*, 2008).

Ainda segundo Pererira Jr (2008), qualquer que seja a configuração escolhida para processos conduzidos com rigor estéril, a construção do biorreator deve atender aos seguintes requerimentos:

- ✓ passível de ser esterilizado quando culturas puras são empregadas;
- ✓ deve ser de simples geometria e construção;
- ✓ deve conter um número mínimo de flanges e soldas;
- ✓ não deve conter zonas mortas;
- ✓ material deve possuir rugosidade superficial mínima;
- ✓ deve ter capacidade de suportar altas pressões, particularmente em bioprocessos nos quais esterilização é requerida;
- ✓ deve apresentar ótimas condições de mistura (baixo e uniforme cisalhamento) e permitir uniforme suspensão de sólidos;
- ✓ deve possuir condições de fluxo claramente definidas, com alimentação de substrato compatível com as taxas de metabolização;
- ✓ deve possibilitar adequado transporte de massa, particularmente em relação à transferência de oxigênio, em processos aerados;
- ✓ adequada instrumentação para o monitoramento e controle (on line ou off line) das variáveis de processo;
- ✓ deve prever o controle de espuma;
- ✓ flexibilidade, podendo ser empregado em outros bioprocessos;
- ✓ estabilidade a longo termo;

Encontram-se indicadas na literatura várias formas possíveis de classificar os biorreatores, como por exemplo: quanto ao tipo de biocatalisador (células ou enzimas); quanto à configuração do biocatalisador (células/enzimas livres ou imobilizadas); quanto à forma de agitar o líquido no biorreator.

Dentre as várias classificações abordadas nos livros-textos que abordam o tema biorreatores, uma das mais abrangentes é a de Kleinststeuer (Tabela 2.6), que apresenta uma classificação mista, com base no tipo de biocatalizador empregado e na configuração do mesmo (SCHMIDELL & FACCOTTI, 2001).

Tabela 2.6 – Classificação geral de biorreatores (KLEINSTEUER, 1986; SCHMIDELL & FACCIOITI, 2001).

CLASSIFICAÇÃO GERAL DOS BIORREACTORES

(I) Reactores em fase aquosa (fermentação submersa)

(I.1) Células/enzimas livres

- Reactores agitados mecanicamente (STR: "stirred tank reactor")
- Reactores agitados pneumaticamente
 - Coluna de bolhas ("bubble column")
 - Reactores "air-lift"
- Reactores de fluxo pistonado ("plug-flow")

(I.2) Células/enzimas imobilizadas em suportes

- Reactores com leito fixo
- Reactores com leito fluidizado
- Outras concepções

(I.3) Células/enzimas confinadas entre membranas

- Reactores com membranas planas
- Reactores de fibra oca ("hollow-fiber")

(II) Reactores em fase não-aquosa (fermentação semi-sólida)

- Reactores estáticos (reatores com bandejas)
 - Reactores com agitação (tambor rotativo)
 - Reactores com leito fixo
 - Reactores com leito fluidizado gás-sólido
-

Também conhecidos como tanques de mistura, pode-se afirmar que os *Stirred Tank Reactor* - STR (Figura 2.7) são os mais amplamente empregados, constituindo cerca de 90% do total de biorreatores empregados industrialmente (SCHMIDELL & FACCIOITI, 2001). Embora não necessariamente ideais, os tanques agitados apresentam versatilidade e fornecem bons resultados para uma grande gama de bioprocessos. Isto é particularmente importante para as companhias farmacêuticas, pois diferentes substâncias podem ser produzidas no mesmo biorreator durante o seu tempo de vida. Adicionalmente, os investimentos em capital para a construção destes equipamentos são normalmente recuperados na comercialização do primeiro produto.

Apesar de sua flexibilidade, pois podem ser empregados para uma grande gama de bioconversões, os biorreatores do tipo STB apresentam certas desvantagens, como por exemplo: demandam grande aporte de energia para a agitação mecânica, tendem a afetar a morfologia celular, são de difícil escalonamento e têm de ser cuidadosamente projetados para produzir adequada mistura e aeração (PEREIRA JR *et al.*, 2008).

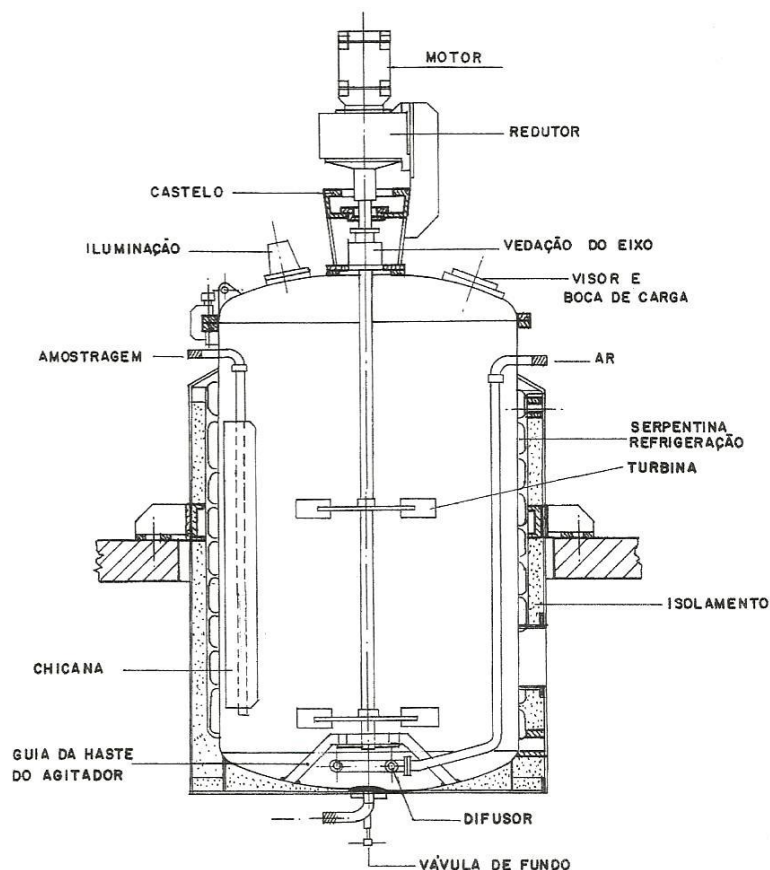


Figura 2.7 – Visão geral de um biorreator agitado mecanicamente (THIEMANN, 2001).

2.6.4 Condução de bioprocessos

A baixa produtividade de um processo descontínuo motivou a partir da década de 50 um maior desenvolvimento na área de reatores. Grandes avanços nessa área favoreceram o sucesso de muitos processos fermentativos. A condução de processos fermentativos em biorreatores pode ser realizada de várias formas: processos descontínuos, semicontínuos, descontínuos alimentados (*fed-batch*) e contínuos (SCHMIDELL & FACCIOTTI, 2001).

2.6.4.1 Bioprocesso descontínuo

São também conhecidos por bioprocesso em batelada ou descontínuo (Figura 2.8). É a forma mais utilizada em bioprocessos, onde ao meio de cultivo é adicionada uma suspensão celular e o processo é transcorrido, sem adições de meio novo, nem retiradas de meio reacional durante o seu curso. Segundo Pereira Jr *et al.* (2008), a batelada simples é caracterizada pela alteração nas condições ambientais a todo instante do bioprocessos (as concentrações de nutrientes são reduzidas e de células, produtos e sub-produtos aumentadas). Esse processo pode levar a baixos rendimentos e/ou produtividade quando o substrato, adicionado de uma só vez no início do bioprocessos, exerce efeitos de inibição ou repressão, ou ainda desvia o metabolismo celular a produtos que não interessam. (CARVALHO & SATO, 2001a; PAGNOCELLI, 2008).

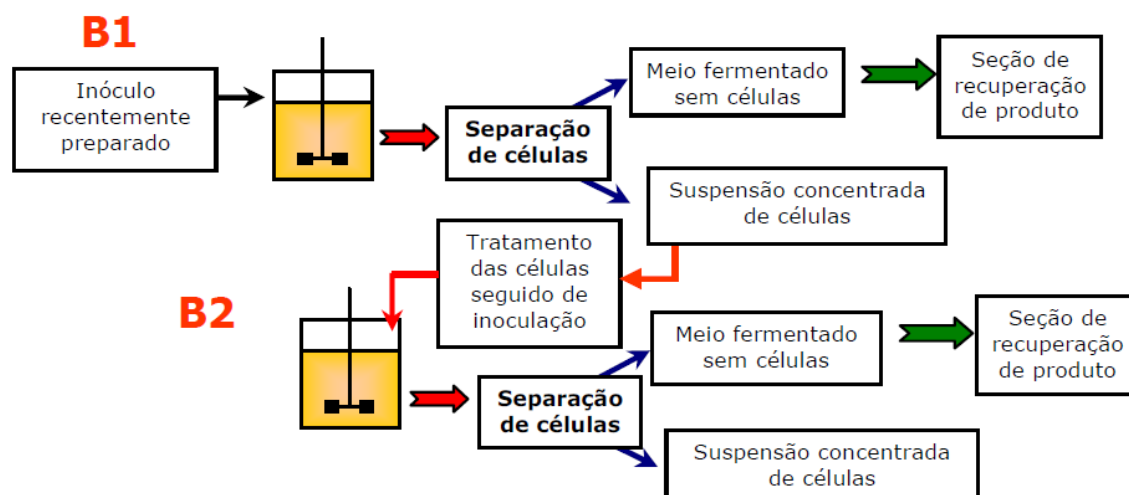


Figura 2.8 – Batelada com recuperação de inóculo (PEREIRA JR *et al.*, 2008).

2.7 Ferramentas de Otimização e Planejamento Experimental

Com o avanço dos conhecimentos em Biotecnologia, a utilização de microorganismos como agentes transformadores da matéria tem sido amplamente empregada nos mais diversos setores industriais. Por se tratar de processos envolvendo organismos vivos e, consequentemente, reações bioquímicas complexas, o emprego de ferramentas estatísticas, como o Método de Superfície de Resposta (MSR), têm sido uma ótima alternativa para a viabilização e otimização de bioprocessos.

Pode-se definir o MSR como um conjunto de técnicas frequentemente utilizadas em estudos de processos para a investigação qualitativa e quantitativa, explorando os efeitos de variáveis de entrada (parâmetro) e variáveis de saída (respostas). Através de um planejamento de experimento pode-se extrair grande número de informações úteis, permitindo a investigação do processo em uma faixa ampla de variação (NETO *et al.*, 1996). Esse tipo de experimentação tem sido fortemente aplicado ao desenvolvimento de meios de cultura, uma vez que normalmente vários componentes de um substrato podem ter efeito direto sobre as respostas de um sistema biológico. Por conseguinte, o uso dessas ferramentas permite maior eficiência e economia do processo, pois reduz o número de experimentos (RODRIGUEZ e IEMMA, 2005).

Os experimentos de exploração (*screening*) são realizados geralmente nas primeiras etapas de um projeto quando muitos dos fatores inicialmente são considerados relevantes, mas que na realidade têm pouco ou nenhum efeito significativo sobre a resposta. Os fatores que são identificados como relevantes, são avaliados posteriormente, com maior detalhe, em outros desenhos fatoriais. Este tipo de planejamento fatorial fracionado é um dos mais empregados para o planejamento de processos e produtos (MONTGOMERY, 1991, RODRIGUES e IEMMA, 2009).

Dentre os delineamentos padrões, o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) é considerado o delineamento ótimo, o qual requer poucos ensaios para sua realização e normalmente são antecidos pelos planejamentos fatoriais fracionados, executados para a redução de variáveis. A partir de um DCCR é possível obter os valores de erro experimental, os modelos matemáticos que descrevem o comportamento das variáveis perante uma resposta de interesse industrial, além de expressar as superfícies de resposta para os mesmos.

Este delineamento possui características interessantes para a busca do ponto que forneça a melhor resposta, que consiste em um numero menor de tratamentos em relação aos fatoriais completos e pode ser realizado sequencialmente, de forma a caminhar no sentido da otimização do sistema (RODRIGUES & IEMMA, 2005).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos deste trabalho foram realizados no Laboratório de Bioprocessos do Centro Nacional de Pesquisas em Agrobiologia – CNPAB da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, localizada em Seropédica – RJ, sob a supervisão do pesquisador responsável Dr. Luis Henrique de Barros Soares.

3.1 Microrganismo

Foi utilizada neste trabalho a linhagem de *Azospirillum amazonense* BR-11145 isolada por Magalhães *et al.* (1983) e mantida sob criopreservação no Laboratório de Coleção de Culturas do Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia - CNPAB.

3.2 Meios de Cultura

O cultivo do *A. amazonense* foi realizado em diferentes tipos de meios de cultura que foram utilizados de acordo com a finalidade do experimento. Foram utilizados meios sólidos nos experimentos envolvendo a caracterização morfológica do microrganismo, a quantificação numérica de colônias e a verificação de pureza do inóculo. Também foram utilizados meios líquidos nos experimentos destinados à produção de inóculo, simplificação de meios complexos, na construção das curvas cinéticas de crescimento microbiano, assim como na otimização das condições de processamento em biorreator.

3.2.1 Soluções-estoque

Os diferentes meios de cultura utilizados nos cultivos do *A. amazonense* exigiram o preparo de diversas soluções de uso rotineiro, que foram denominadas soluções-estoque e estão relacionadas a seguir (todas as porcentagens são em massa/volume):

- Solução de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 10%;
- Solução de NaCl a 10%;
- Solução de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 1%;
- Solução de Fe EDTA a 1,64%;
- Solução de micronutrientes
- Solução alcoólica de azul de bromotimol a 5%; (solução 0,5% em 0,2N KOH)
- Solução de vitaminas para meio de cultura
- Solução de $\text{Na}_2\text{Mo}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 0,1%;
- Solução de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a 1%;
- Solução de K_2HPO_4 a 10%;
- Solução de KH_2PO_4 a 10%;

A solução de Fe EDTA foi preparada misturando-se 16,0 g de Na_2EDTA (saldissódico do ácido etileno diaminotetra-acético) com 11,95 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 950 mL de água, aquecendo-se até dissolução e, após resfriamento, completando-se o volume até 1,0 litro.

A solução de micronutrientes é composta por (DÖBEREINER, 1999):

- 0,04 g/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$;
- 1,20 g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;

- 1,40 g/L H_3BO_3 ;
- 1,00 g/L $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 1,175 g/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

A solução de vitaminas continha (DÖBEREINER, 1995):

- 10 mg/L biotina
- 20 mg/L piridoxol-HCl

Esta solução foi dissolvida em banho-maria e completada o volume para 100mL com água destilada, em seguida foi filtrada e mantida a solução em geladeira.

Para os procedimentos de diluição do inóculo, foi utilizada uma solução salina composta por NaCl 0,85% (p/v).

3.2.2 Meio LGI

Este é um meio semi-seletivo desenvolvido para o isolamento de *Azospirillum amazonense*. Sua composição, por litro, consiste de:

- 5 g de Açúcar Cristal
- 2 mL de Solução de K_2HPO_4 a 10%;
- 6 mL de Solução de KH_2PO_4 a 10%;
- 2 mL de Solução de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 10%;
- 2 mL de Solução de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 1%;
- 2 mL de Solução de $\text{Na}_2\text{Mo}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 0,1%;
- 1 mL de Solução de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a 1%;
- 5 mL de Solução de Azul de Bromotimol
- 1 mL de Solução de Vitamina para Meio de Cultura (DÖBEREINER *et al.*, 1999).

O pH foi ajustado em 6,2 utilizando-se uma solução de ácido sulfúrico 10% (v/v). Para sua utilização como meio sólido adicionou-se 15g/L de ágar bacteriológico e 20mg/L de extrato de levedura em sua composição. No uso como meio líquido foi retirado o indicador, azul de bromotimol, com a finalidade de se evitar a variação da coloração do meio causada pela produção de ácido pela bactéria durante a fermentação.

3.2.3 Meio batata

Este meio semi-seletivo é utilizado para realizar a purificação de bactérias diazotróficas e para o crescimento de *Azospirillum spp* e *Herbaspirillum spp*. Sua composição, por litro de meio, consiste de:

- 200 g de batata;
- 2,5 g de ácido málico;
- 2,5 g de açúcar cristal;
- 2 mL de solução de micronutrientes para meio de cultura;
- 1 mL de solução de vitaminas para meio de cultura. (DÖBEREINER *et al.*, 1999).

Para o preparo do meio batata foram seguidos os seguintes passos: Colocou-se aproximadamente 50 mL de água destilada em um erlenmeyer de 100 mL e adicionou-se 2,5 g de ácido málico e 2 gotas de azul de bromotimol (sol. 0,5% em 0,2 N de KOH). Acertou-se o pH da solução em 6,8 (cor verde) utilizando solução de KOH a 10%. Adicionou-se a esta solução 2,5 g de açúcar cristal, 2 mL de solução de micronutrientes para meio de cultura e 1 mL de solução de vitamina para meio de cultura, agitou-se levemente. Pesou-se 200 g de batata inglesa, descascou-se, lavou-se, cortou-se em pedaços grandes cozinhou-se durante 30 minutos. Depois de cozida, filtrou-se a batata com algodão e juntou-se ao filtrado a solução vitaminada de ácido málico recém preparada. Completou-se o volume para 1000 mL com água destilada. Para sua utilização como meio sólido adicionou-se 15g/L de ágar bacteriológico.

3.2.4 Meio Yeast Mannitol Broth - YMB

Meio é utilizado para o crescimento de *Rhizobium*, porém se for para crescimento lento usar manitol como fonte de carbono. E para crescimento rápido usar Açúcar Cristal como fonte de carbono. (Döbereiner *et al.*, 1999). No caso de crescimento do *A. amazonense* fez-se uso do açúcar cristal como fonte de carbono, uma vez que este microrganismo é capaz de consumir sacarose diferentemente da maioria das outras espécies de *Azospirillum sp.*

- 10 g de açúcar cristal;
- 1 mL de solução de K_2HPO_4 a 10%;
- 4 mL de solução de KH_2PO_4 a 10%;
- 2 mL de solução de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ a 10%;
- 1 mL de solução de NaCl a 10%;
- 0,4 g extrato de levedura;
- 5 mL de solução de azul de bromotimol.

O pH foi ajustado para 6,8 com solução de KOH a 10% e/ou H_2SO_4 a 10%. Completou-se o volume para 1000 mL com água destilada. Para uso como meio sólido adicionou 15 g/L de ágar bacteriológico.

3.2.5 Meio Dextrose Yeast Glucose Sucrose – DYGS (modificado)

Este meio é considerado um meio rico para favorecer o crescimento de bactérias em menor tempo de incubação, e tem sua composição por litro descrita a seguir:

- 2,0 g de glicose;
- 2,0 g de ácido málico;
- 1,5 g de peptona bacteriológica;
- 2,0 g de extrato de levedura;
- 0,5 g de K_2HPO_4 a 10%;
- 0,5 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ a 10%;
- 1,5 g de ácido glutâmico.

O pH foi ajustado para 6,8 com solução de KOH a 10% e/ou H_2SO_4 a 10%. Completou-se o volume para 1000 mL com água destilada. Para uso como meio sólido adicionou 15 g/L de ágar bacteriológico.

3.3 Preparo de Estoque de Bactérias

A partir de uma placa de petri com meio LGI sólido contendo colônias puras do *A. amazonense* BR-11145, cedida pelo Laboratório de Coleção de Culturas do CNPAB, esta estirpe foi repicada em meio tubos de ensaio contendo 5 mL de meio DYGS e incubado em *shaker* a 30 °C e 150 rpm por 24 h. Ao término deste período o conteúdo do tubo foi vertido em um erlenmeyer de 250 mL contendo 95 mL do mesmo meio e incubado nas mesmas condições anteriores. O crescimento bacteriano foi monitorado através da densidade ótica (DO), que foi medida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 600 nm. Ao atingir a $DO_{600} = 1,0$, foi acrescentada glicerina ao conteúdo do erlenmeyer numa proporção de 15% (v/v). Esta suspensão de bactérias foi distribuída em microtubos *Eppendorf* de 2,0 mL e congelados em *freezer*.

3.4 Ensaios em Erlenmeyer

Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.4.1 Preparação do pré-inóculo

Em tubos de ensaio contendo 5,0 mL do meio de cultura de interesse foram acrescentados 0,5 mL da solução estoque de bactérias. Este sistema foi incubado em *shaker* a 30 °C e 150 rpm por 24 h.

3.4.2 Fermentação

O conteúdo dos tubos de pré-inóculo foi transferido assepticamente para frascos erlenmeyers de 250 mL contendo 95 mL do mesmo meio de cultivo. Os frascos foram incubados em *shaker* a 30 °C e 150 rpm por 24 h.

3.4.3 Parâmetros analisados em *shaker*

Em cada amostra dos ensaios em *shaker* foram determinados:

- Crescimento celular (DO_{600nm});
- Concentração celular (massa seca, g/L)
- Concentração de compostos indólicos (mM)

3.5 Ensaios em Biorreator

3.5.1 Biorreator

Foi utilizado um Biorreator da marca *Sartorius Stedium Biostat B-Blus Twin*, com capacidade de 2,0 L para os ensaios em batelada, com controle da frequência de agitação (RPM), de vazão de ar (LPM), temperatura (°C) e oxigênio dissolvido (% pO_2) e monitoração automática de pH por adição de solução de H_2SO_4 2,5% (v/v) ou KOH 5,0% (v/v).

A esterilização do meio de cultura, do biorreator, e dos filtros de ar e frasco com anti-espumante e soluções controladoras de pH foi efetuada em autoclave a 121°C por 20 minutos.

3.5.2 Preparação do pré-inóculo

O inóculo dos ensaios em biorreator foi preparado adicionando-se 1,0 mL da solução estoque de microrganismos em erlenmeyers de 250 mL com 100 mL de meio utilizado no biorreator. Em seguida foram incubados em *shaker* nas mesmas condições de aeração, agitação e temperatura em que o biorreator fosse operado para cada experimento.

3.5.3 Inoculação do biorreator

A inoculação do biorreator foi feita assim que o inóculo atingisse a $DO_{600nm} \sim 2,0$. O volume de inóculo foi de 5,0 % do volume total no biorreator.

3.5.4 Amostragem e estocagem

Para possibilitar a coleta de amostras de forma asséptica, foram utilizados microtubos estéreis e auxílio do bico de Bunsen. Estas amostras foram estocadas em *freezer* até serem analisadas.

3.5.5 Parâmetros analisados em biorreator

Em cada amostra dos ensaios foram determinados:

- Crescimento celular (DO_{600nm});
- Concentração celular (Massa Seca, g/L);
- Concentração de compostos indólicos (mM);
- Consumo das fontes de carbono: glicose, sacarose e glicerol.

3.6 Planejamento Experimental

A parte experimental deste trabalho foi subdividida em quatro etapas básicas: 1) Testes preliminares; 2) Simplificação do meio de cultura; 3) Otimização das condições de processo em biorreator; e 4) Substituição da fonte de carbono. Para concretização destas etapas foram propostos cultivos isolados, assim como experimentos complexos de otimização envolvendo cruzamentos de variáveis sugeridos pelo aplicativo *Statistica* 10.0.

3.6.1 Testes preliminares

Foram realizados cultivos de *A. amazonense* em erlenmeyer, segundo os procedimentos descritos nos itens 3.4.1 e 3.4.2, utilizando os meios LGI, DYGS e YMB, com a finalidade de avaliar a produção de biomassa em cada um destes substratos.

3.6.2 Simplificação do meio de cultura

Partindo do princípio de que o DYGS é um meio rico, complexo e proporciona aos microrganismos um crescimento acelerado, ele foi definido como meio base para o estudo do cultivo do *Azospirillum amazonense*.

Utilizando o aplicativo *Statistica for Windows* versão 10.0 estabeleceu-se uma sequência as matrizes combinatórias experimentais, FF01, FF02, FF03 e FF04, onde a simplificação do meio DYGS se deu pela variação das concentrações de cada componente do mesmo assim como a redução do número destes componentes. A análise estatística dos resultados foi realizada através deste aplicativo (*Experimental Design*), sendo que as variáveis respostas destes planejamentos foram: Produção de biomassa (g/L) e Produção de compostos indólicos (mM).

3.6.2.1 Delineamento fatorial fracionado 01 – FF01

A matriz experimental foi elaborada para a simplificação do meio DYGS integral, onde foram especificadas como variáveis de entrada: glicose, ácido málico, peptona bacteriológica, extrato de levedura, fosfato dibásico de potássio, sulfato de magnésio e ácido glutâmico. Foi empregado um planejamento fatorial fracionado 2^{7-3} realizando-se um total de 19 experimentos (Tabela 4.1), sendo 16 combinações distintas e 3 no ponto central. Este fatorial apresentou dois níveis relativos ao ponto central (composição original do meio), o nível inferior (-1), onde as variáveis apresentaram uma redução de 50% em seu valor, e o nível superior (+1), onde as variáveis tiveram um acréscimo de 50%. Estes valores estão descritos na Tabela 4.2 das variáveis codificadas.

3.6.2.2 Delineamento fatorial fracionado FF02 e FF03

No delineamento FF02 foram avaliadas combinações utilizando o meio DYGS sem ácido glutâmico, enquanto no FF03 o item excluído foi o ácido málico. Este delineamento consistiu de um planejamento fatorial fracionado 2^{6-3} , realizando-se um total de 11 experimentos (Tabela 4.4 e Tabela 4.6, respectivamente), sendo 8 combinações distintas e 3 no ponto central. Os valores das variáveis estão descritos na Tabela 4.1 (das variáveis codificadas).

3.6.2.3 Delineamento fatorial fracionado 04

No FF04 foram avaliadas combinações utilizando o meio DYGS excluindo tanto o ácido málico quanto o ácido glutâmico. Foi realizado um planejamento fatorial fracionado 2^{5-2} realizando-se um total de 11 experimentos (Tabela 4.8), sendo 8 combinações distintas e 3 no ponto central. Os valores das variáveis estão descritos na Tabela 4.1 (das variáveis codificadas).

3.6.3 Otimização das condições de processamento em biorreator

Utilizando o meio de cultura resultante do processo de simplificação obtido pelos delineamentos fatoriais fracionados, foram realizados experimentos em biorreator com o objetivo de otimizar as condições de aeração, agitação e maximizar a produção de biomassa.

3.6.3.1 *Design* Composto Central Rotacional – DCCR 01

Esta matriz experimental foi elaborada empregando um DCCR 2³, realizando-se um total de 17 experimentos (Tabela 4.15), sendo 8 combinações distintas, 6 nos pontos axiais e 3 no ponto central. Os níveis utilizados neste planejamento estão apresentados na Tabela 4.14 (das variáveis codificadas).

3.6.4 Substituição da fonte de carbono

Operando nas condições otimizadas de bioprocessamento definidas ao término dos experimentos do item 3.6.3.1, foram realizadas fermentações substituindo-se a glicose, fonte de carbono do meio simplificado, por sacarose PA e, posteriormente, por glicerol puro (glicerina PA).

3.7 Procedimentos Analíticos

Todas as análises realizadas a partir das amostras coletadas dos bioprocessos propostos foram realizadas em triplicata.

3.7.1 Determinação de açúcares redutores pelo método do ácido 3,5 – dinitrossalicílico – DNS

A metodologia utilizada para determinar as concentrações da glicose nas fermentações é descrita a seguir.

O reagente DNS é composto por:

- 0,25 g de ácido 3,5 dinitrossalicílico;
- 75 g de tartarato de sódio e potássio; (CHAPLIN, 1986).

No preparo deste reagente dissolveu-se os reagentes em 50 mL de solução aquosa de NaOH 2M e diluiu-se a 250 mL com água destilada. O procedimento analítico consistiu em adicionar 1mL do reagente DNS a 100 µL de amostra, aquecer em Banho-Maria a 100 °C por 10 minutos, deixar resfriar, adicionar mais 1mL de dH₂O e fazer leitura em espectrofotômetro a 570 nm. Para a construção das curvas padrão foram utilizadas como amostras soluções de glicose (Sigma) nas concentrações de 0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10 g/L. Estes dados foram apresentados em gráficos de dispersão (X,Y) utilizando o *Microsoft Office Excel* 2010.

3.7.2 Determinação de compostos indólicos totais pelo método colorimétrico de Salkowski

O reagente de Salkowski foi preparado fazendo-se uma modificação na composição proposta por Gordon & Weber (1951), onde o HClO_4 foi substituído pelo H_2SO_4 . Assim, um alíquota de 1 mL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,5 M (1,35 g/10 mL) foi adicionado a 50 mL de H_2SO_4 (35%).

Concentrações crescentes de 0 a 100 mM de AIA (Sigma) foram utilizadas na construção da curva de calibração empregando o método descrito por Sarwar & Kremer (1995). Alíquotas de 150 μL de cada diluição foram transferidas para micro placas de poliestireno de 96 poços com capacidade de 300 μL por poço. Em seguida, foram adicionados 100 μL do reagente de Salkowski. Após 30 minutos de reação no escuro a temperatura ambiente, a intensidade da coloração foi avaliada em comprimento de onda (λ) de 540nm utilizando o espectrofotômetro *Labsystems iEMS Reader MF*. Os dados de absorbância foram processados pelo programa *Ascent Software for iEMS Reader MF* e, posteriormente, apresentados em um gráfico de dispersão (X,Y) utilizando o *Microsoft Office Excel* (2010). (RODRIGUES *et al.*, 2007).

3.7.3 Determinação da Absorbância

A absorbância foi determinada diretamente no meio fermentado dos cultivos em incubador rotativo e em biorreator. A leitura foi feita em espectrofotômetro de UV visível da *PG Instruments* modelo *T-60* no comprimento de onda de 600 nm. Como “branco”, utilizou-se água destilada. A leitura foi realizada na faixa de 0,02 a 0,90 de absorbância. Quando superior, diluiu-se a amostra o número de vezes necessárias.

3.7.4 Concentração celular mássica (X)

Para efetuar a determinação da concentração celular homogeneizava-se a amostra e filtrava-se um volume de 10 mL da suspensão através da membrana Millipore (diâmetro de poro de 0,22 μm), previamente pesada.

O resíduo em conjunto com o filtro era colocado em estufa a 65 °C por 10 minutos (tempo suficiente para obter peso constante). Decorrido esse período, transferia-se o conjunto para um dessecador e, quando frio (após aproximadamente 5 minutos), procedia-se a pesagem e efetuavam-se os cálculos.

3.7.5 Determinação das concentrações de sacarose e glicerol

3.7.5.1 Instrumentação

Na dosagem destes compostos fez-se uso um cromatógrafo *Shimadzu* (*Shimadzu Corporation*, Japão) composto pelos seguintes módulos: bomba (modelo LC-10AD), auto-injetor (modelo SIL-10A), forno para coluna (modelo CTO-10AC) e detector UV-VIS (modelo SPD-10AV) conectado em série com detector de índice de refração (modelo RID-6A). A aquisição e o tratamento dos dados foram controlados pelo *software LC Solution* (*Shimadzu*, Japão).

3.7.5.2 Metodologia

As amostras do meio fermentativo foram centrifugadas durante 5 minutos a 10000 rpm e então filtradas em membrana Millipore de porosidade 0,22µm antes de serem injetadas no sistema cromatográfico.

As curvas analíticas foram preparadas usando o método de adição padrão e o método de padronização externa nos seguintes níveis de concentração: 1, 3, 5, 7 e 10g/L do substrato analisado.

A condição cromatográfica empregada nestas análises foi: coluna Bio-Rad Aminex HPX-87H com pré-coluna, fase móvel consistindo de H₂SO₄ 0,005mol/L, fluxo de 0,8mL/min e temperatura de 65°C. Tanto as concentrações de sacarose quanto as de glicerol foram determinadas através do detector de índice de refração (IR).

3.8 Cálculo dos Parâmetros Cinéticos

A velocidade específica máxima de crescimento (μ_x) e os fatores de conversão de substrato a células, de célula em produto e de substrato em produto, $Y_{X/S}$, $Y_{P/X}$, $Y_{P/S}$, respectivamente, e produtividades de biomassa (P_X) e de produtos (P_P) foram calculados conforme fórmulas do item 2.6.2.

Para determinar a fase de crescimento exponencial, foram traçadas curvas de $\ln(X)$ em função do tempo. Após traçadas as curvas, notou-se que os pontos podiam ser correlacionados por uma reta e com isso foi possível obter o μ_x (taxa específica de crescimento), através de uma regressão linear (o coeficiente angular da correlação linear), segundo a equação (10) (SILVA, 2006).

$$\ln \frac{X}{X_0} = \mu_x t \quad (10)$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Apresentam-se neste capítulo os resultados obtidos ao longo do desenvolvimento desta dissertação e as discussões a eles relacionadas. Na seção 4.1 descrevem-se os testes preliminares realizados com o objetivo de avaliar a evolução da biomassa em diferentes substratos. Na seção 4.2 são apresentados os ensaios para o aperfeiçoamento do meio de cultura, envolvendo a avaliação de rendimentos, custo e culminado com a definição do novo meio de cultura aperfeiçoado. A otimização das condições operacionais para o cultivo do *A. amazonense* em um biorreator é discutida na seção 4.3 e os resultados dos ensaios com diferentes fontes de carbono são apresentados e discutidos na seção 4.4.

4.1 Testes Iniciais – Seleção do Meio de Cultura

Os testes preliminares foram realizados em um agitador orbital a 30 °C e 150 rpm durante 24 h com o objetivo de avaliar a evolução da biomassa em diferentes meios. Como pode ser observado na Figura 4.1, os cultivos atingiram valores de densidade ótica iguais a 2,274, 1,202 e 0,496 após 24h, e 2,380, 1,137 e 0,970 em 48h, para os meios DYGS, YMB e LGI, respectivamente.

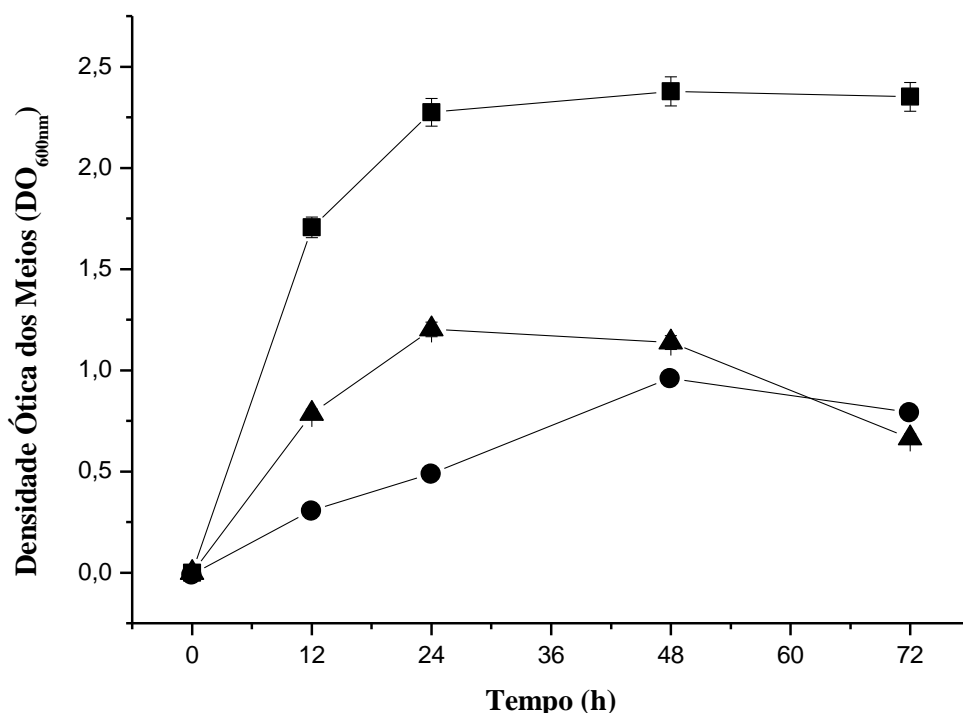


Figura 4.1: Evolução da biomassa de *A. amazonense*, em termos de densidade ótica (DO_{600nm}), cultivados nos meios LGI (●), DYGS (■) e YMB (▲).

Percebe-se que no meio LGI o crescimento ocorreu de modo mais lento, sendo que a máxima concentração só foi atingida após aproximadamente 48h de cultivo. Após 24h de cultivo a cultura em meio DYGS entrou na fase estacionária, enquanto que para o meio YMB percebeu-se um ligeiro declínio. Em virtude de sua composição ser mais rica e da relação

entre fonte de carbono e nitrogênio, o cultivo em meio DYGS favoreceu a produção e a acumulação intracelular de substâncias de reserva e proteção, reconhecidamente metabólitos como ácidos orgânicos e biopolímeros que atuam como reservas energéticas e proporcionam maior longevidade às células, fator importante para a manutenção da viabilidade de um inoculante agrícola.

Segundo Tal & Okon (1985), bactérias do gênero *Azospirillum* são capazes de acumular poli-β-hidroxibutirato (PHB), um material de reserva que permite às bactérias resistirem às condições de estresse ambiental. Esta substância pode ser acumulada de forma diferenciada de acordo com o meio de cultivo utilizado e diversos estudos foram feitos para que a estirpe apresentasse um conteúdo elevado de PHB por ocasião do preparo do inoculante, visando maior longevidade celular (BURDMAN *et al.*, 1998).

Apesar do meio YMB ter apresentado o segundo melhor resultado, este possui em sua composição quase o dobro de fonte de carbono (10 g/L de sacarose), assim pode-se verificar uma produtividade em 24h de cultivo ($P_{X\ YMB} = 0,050\text{ g/L.h}$), praticamente duas vezes menor em relação para o meio DYGS ($P_{X\ DYGS} = 0,095\text{ g/L.h}$). Este fato está, provavelmente, relacionado com o diferente nível de complexidade destes meios, uma vez que o DYGS é composto por 2,0 g/L de glicose, 2,0 g/L de ácido málico e 1,5 g/L de ácido glutâmico, totalizando 5,5 g/L em possíveis fontes de carbono e energia que podem ser assimilados mais eficientemente pelo *A. amazonense*. Outro fator nutricional que pode ter influenciado o desempenho destes cultivos é a diferente quantidade das fontes complexas de nitrogênio disponíveis nestes substratos. Enquanto são encontrados presentes no meio DYGS extrato de levedura (2,0 g/L) e peptona bacteriológica (1,5 g/L), no meio YMB estão disponíveis apenas 0,4 g/L de extrato de levedura e nenhuma fonte de nitrogênio no meio LGI, pois de acordo com Döbereiner (1999), este é um meio tradicionalmente usado para seleção de microrganismos diazotróficos.

Deste modo, com base nos resultados comparativos de produtividade obtidos para a produção de biomassa nos meios considerados e no potencial nutricional mais diverso, o meio DYGS foi definido como meio de cultura básico a ser utilizado nos processos de otimização da produção de *A. amazonense* propostos neste trabalho.

4.2 Aperfeiçoamento do Meio de Cultura

Nesta seção são apresentados os resultados de quatro experimentos, planejados com auxílio da metodologia de fatoriais fracionados, com o objetivo de determinar a melhor composição para o meio de cultura previamente selecionada através da avaliação dos rendimentos e dos custos envolvidos.

4.2.1 Primeiro teste: Fatorial fracionado 2^{7-3}

Foi realizado um planejamento fracionado para avaliar o efeito de sete variáveis sobre a produção de biomassa, sendo estas os componentes do meio DYGS: glicose, ácido málico, peptona bacteriológica, extrato de levedura, fosfato dibásico de potássio, sulfato de magnésio e ácido glutâmico. Para tanto, foi empregado o planejamento fatorial fracionado 2^{7-3} denominado FF01. Estabeleceu-se, para cada variável, uma variação de 50% para mais e para menos na quantidade padrão de cada componente do meio DYGS, referentes aos níveis +1 e -1, respectivamente. Na Tabela 4.1 são encontrados os valores usados em cada nível das variáveis dos planejamentos fatoriais.

Tabela 4.1: Variáveis codificadas referentes aos planejamentos fatoriais fracionados FF01 a FF04.

Componente (g/L)	-1	0	+1
Glicose	1,00	2,00	3,00
Ácido málico	1,00	2,00	3,00
Pep. bacteriana	0,75	1,50	2,25
Extr. levedura	1,00	2,00	3,00
K₂HPO₄	0,25	0,50	0,75
MgSO₄	0,25	0,50	0,75
Ácido glutâmico	0,75	1,50	2,25

A matriz do planejamento 2^{7-3} com a resposta para biomassa é apresentada na Tabela 4.2. Pode-se observar que os valores de biomassa obtidos neste experimento variaram entre 0,399 e 1,596 g/L. O menor valor foi obtido no ensaio n°16, quando foi empregado o meio composto pelos níveis inferiores de todos os seus componentes, já o maior valor corresponde ao ensaio n°6, quando foram empregados os níveis superiores de glicose, peptona bacteriológica e sulfato de magnésio. Também se pode destacar os ensaios n°1 e n°4, uma vez que apresentam valores acima de 1,5 g/L de biomassa. Os ensaios de n°17 a 19 correspondem aos pontos centrais, neles foram obtidos resultados que variaram entre 1,053 e 1,102 g/L, evidenciando uma boa repetibilidade do cultivo, uma vez que se tratam de repetições das mesmas condições de tratamento.

Tabela 4.2: Matriz do planejamento FF01 (2^{7-3}) e a resposta para biomassa (g/L).

Ensaio	Glicose	Ácido málico	Peptona bacteriológica	Extrato levedura	K ₂ HPO ₄	MgSO ₄	Ácido glutâmico	Biomassa (g/L)
1	1	1	1	1	1	1	1	1,537
2	1	1	1	-1	1	-1	-1	0,733
3	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1,150
4	1	1	-1	-1	-1	1	1	1,502
5	1	-1	1	1	-1	-1	1	0,956
6	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1,596
7	1	-1	-1	1	1	1	-1	1,358
8	1	-1	-1	-1	1	-1	1	0,781
9	-1	1	1	1	-1	1	-1	1,447
10	-1	1	1	-1	-1	-1	1	1,329
11	-1	1	-1	1	1	-1	1	1,298
12	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1,055
13	-1	-1	1	1	1	-1	-1	0,598
14	-1	-1	1	-1	1	1	1	0,816
15	-1	-1	-1	1	-1	1	1	0,523
16	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0,399
17	0	0	0	0	0	0	0	1,093
18	0	0	0	0	0	0	0	1,053
19	0	0	0	0	0	0	0	1,102

Na Tabela 4.3 são encontrados os valores dos efeitos estimados das variáveis sobre a biomassa. Analisando a um nível de confiança de 90%, verificou-se que das 7 variáveis somente a glicose, o ácido málico e o sulfato de magnésio foram estatisticamente significativos ($p < 0,10$). Todos apresentaram efeitos positivos, indicando que ao passar dos níveis inferiores para os superiores, de 1,0 para 3,0 g/L no caso da glicose e do ácido málico, e de 0,25 para 0,75 g/L no caso do sulfato de magnésio, ocorreu um incremento na produção de biomassa. Deste modo, sugeriu-se que a utilização de maiores quantidades destes componentes na composição do meio de cultura pode maximizar a produção de células.

Supõe-se ter havido um efeito de compensação na produção de biomassa nestes ensaios causado pela presença de três diferentes fontes de carbono na composição do meio de cultura estudado. Quando o microrganismo consumia totalmente um destes componentes, possivelmente ocorria uma mudança em seu metabolismo e começava a consumir outro, dando, então, prosseguimento à multiplicação celular. Outra hipótese é que diferentes rotas de assimilação das fontes de energia estavam sendo usadas ao mesmo tempo, o que poderia provocar uma situação de desperdício metabólico.

Tabela 4.3 – Estimativa dos efeitos para a variável Biomassa referente ao planejamento FF01(2^{7-3}).

Variável	Efeito	Desvio Padrão	Valor p
Média	2,218	0,134	0,000
Glicose	0,556	0,293	0,084
Ácido málico	0,784	0,293	0,021
Peptona	0,245	0,293	0,419
Ext. levedura	0,170	0,293	0,572
K₂HPO₄	-0,188	0,293	0,533
MgSO₄	0,672	0,293	0,042
Ácido glutâmico	0,105	0,293	0,725

Visto que a principal resposta avaliada neste estudo foi a biomassa, o comportamento metabólico apresentado pelas bactérias mascarou os efeitos de maximização ou minimização que deveriam ser causados pelas mudanças de nível de cada variável, daí a necessidade da realização dos demais planejamentos fatoriais fracionados onde foram avaliados os efeitos das variáveis com a eliminação do ácido glutâmico (FF02), do ácido málico (FF03) e de ambos (FF04).

4.2.2 Segundo teste: Fatorial fracionado 2^{6-3}

No segundo teste, denominado experimento FF02, foi executado um planejamento fatorial fracionado 2^{6-3} cuja matriz de ensaios é encontrada na Tabela 4.4, assim como as respostas da biomassa e compostos indólicos em termos de AIA. Os ensaios de n° 9 a 11 correspondem aos pontos centrais, neles foram obtidos resultados que variaram entre 0,347 e 0,381 g/L, evidenciando uma boa repetibilidade dos cultivos. Observou-se que os valores de biomassa obtidos encontram-se compreendidos entre 0,299 g/L no ensaio n°6, onde foram empregados os níveis superiores apenas do ácido málico e do fosfato dibásico de potássio, até 1,582 g/L no ensaio n°3, no qual fez-se uso dos níveis superiores de glicose, peptona e fosfato. Destacou-se, ainda, o ensaio n°1 com as segundas maiores produções de biomassa (1,481 g/L) e de compostos indólicos (45,972 mM). Os valores desta auxina se encontram

entre 12,083 mM no ensaio n°7 e 51,111 mM no ensaio n°5, e o comparativo das produções de biomassa e compostos indólicos em cada ensaio pode ser melhor visualizado na Figura 4.2.

Tabela 4.4 – Matriz do planejamento FF02 (2^{6-3}) e as respostas Biomassa (g/L) e Compostos Indólicos (mM).

Ensaio	Glicose	Ácido málico	Peptona bacteriológica	Extrato de levedura	K ₂ HPO ₄	MgSO ₄	Biomassa (g/L)	Compostos indólicos (mM)
1	1	1	1	1	1	1	1,481	45,972
2	1	1	-1	1	-1	-1	0,859	25,139
3	1	-1	1	-1	1	-1	1,582	32,361
4	1	-1	-1	-1	-1	1	0,391	20,694
5	-1	1	1	-1	-1	1	0,608	51,111
6	-1	1	-1	-1	1	-1	0,299	19,583
7	-1	-1	1	1	-1	-1	0,545	12,083
8	-1	-1	-1	1	1	1	0,371	19,306
9	0	0	0	0	0	0	0,347	19,722
10	0	0	0	0	0	0	0,371	18,472
11	0	0	0	0	0	0	0,381	19,861

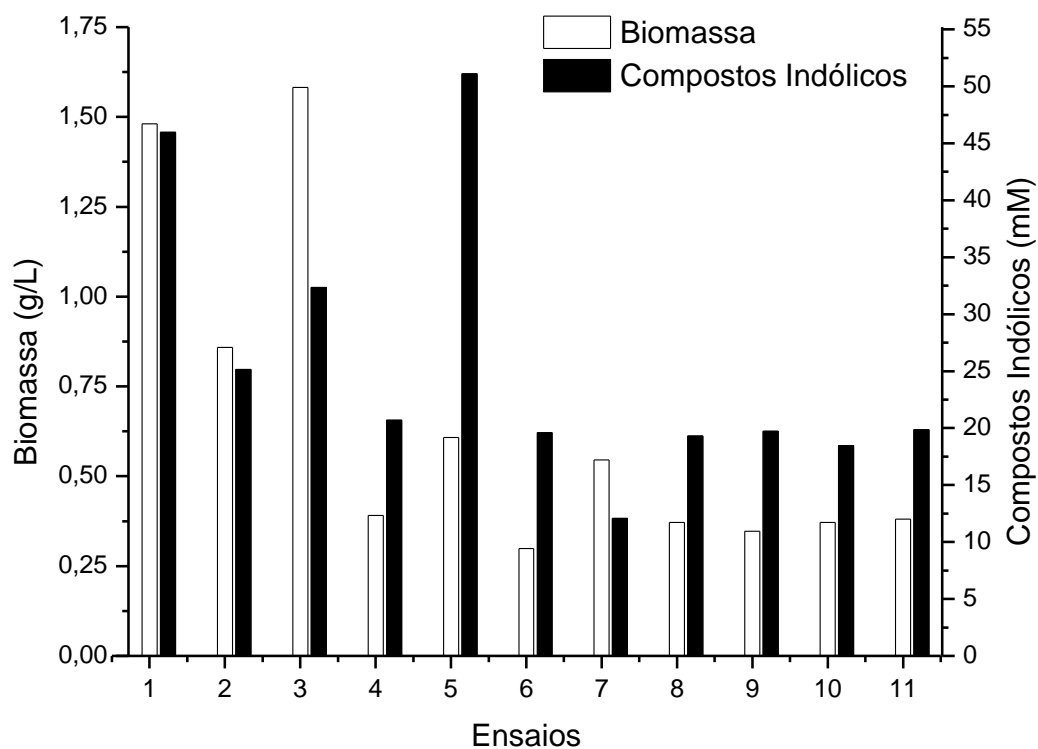


Figura 4.2 – Comparativo das produções de biomassa e compostos indólicos nos ensaios do planejamento FF02.

A Tabela 4.5 apresenta os efeitos estimados das variáveis sobre a biomassa e o compostos indólicos. Analisando os resultados deste experimento realizado sem o componente ácido glutâmico e com 90% de confiança verificou-se que a glicose apresentou efeito estatisticamente significativo e positivo para a formação de biomassa ($p=0,052$). A peptona bacteriológica, além de incrementar positivamente a produção de biomassa ($p=0,065$), apresentou efeito positivo para a produção de compostos indólicos ($p=0,076$), assim como o ácido málico ($p=0,074$) e o sulfato de magnésio ($p=0,115$), este por possuir valor de p muito próximo a 0,1.

Mais uma vez foi observada a interferência nos resultados estatísticos em decorrência do efeito de compensação das quantidades das fontes de carbono ácido málico e glicose propostas pela matriz experimental do FF02.

Tabela 4.5 – Estimativa dos efeitos para as respostas biomassa e compostos indólicos referente ao planejamento FF02 (2^{6-3}).

Variável	Biomassa			Compostos Indólicos		
	Efeito	Desvio Padrão	Valor p	Efeito	Desvio Padrão	Valor p
Média	1,364	0,201	0,002	25,846	2,543	0,001
Glicose	1,290	0,471	0,052	5,521	5,964	0,407
Ácido málico	0,185	0,471	0,714	14,340	5,964	0,074
Peptona	1,190	0,471	0,065	14,201	5,964	0,076
Ext. levedura	1,195	0,471	0,700	-5,312	5,964	0,423
K₂HPO₄	0,690	0,471	0,217	2,049	5,964	0,749
MgSO₄	-0,225	0,471	0,658	11,979	5,964	0,115

4.2.3 Terceiro teste: Fatorial fracionado 2^{6-3}

A fim de verificar a interferência causada nos dados estatísticos pela compensação nas quantidades de glicose e ácido glutâmico foi realizado o planejamento experimental FF03.

Na Tabela 4.6 está disposta a matriz do planejamento 2^{6-3} realizado sem o componente ácido málico e as respostas biomassa. Os ensaios de nº 9 a 11 correspondem aos pontos centrais, neles foram obtidos resultados que variaram entre 0,656 e 0,685 g/L, evidenciando uma boa repetibilidade dos cultivos. Pode-se observar que os valores de biomassa obtidos neste experimento estiveram entre 0,449 e 1,225 g/L. O menor valor foi obtido no ensaio nº7, quando foi empregado o meio composto pelos níveis superiores apenas do extrato de levedura e do fosfato dibásico de potássio, já o maior valor corresponde ao ensaio nº5, quando foram empregados os níveis superiores de extrato de levedura, peptona bacteriológica e do ácido glutâmico. Para a produção de auxinas os valores se encontram entre 9,167 mM nos ensaios nº4 e 6, e 52,500 mM no ensaio nº1, onde para todas as variáveis foram utilizados os níveis superiores. O comparativo das produções de biomassa e compostos indólicos em cada ensaio pode ser melhor visualizado na Figura 4.3.

Tabela 4.6 – Matriz do planejamento FF03 (2^{6-3}) e as respostas biomassa (g/L) e compostos indólicos (mM).

Ensaio	Glicose	Peptona Bacteriológica	Extrato de Levedura	K ₂ HPO ₄	MgSO ₄	Ácido Glutâmico	Biomassa (g/L)	Compostos Indólicos (mM)
1	1	1	1	1	1	1	0,955	52,500
2	1	1	-1	1	-1	-1	0,728	18,889
3	1	-1	1	-1	1	-1	0,897	26,389
4	1	-1	-1	-1	-1	1	0,835	9,167
5	-1	1	1	-1	-1	1	1,225	9,722
6	-1	1	-1	-1	1	-1	0,786	9,167
7	-1	-1	1	1	-1	-1	0,449	10,833
8	-1	-1	-1	1	1	1	0,531	13,194
9	0	0	0	0	0	0	0,685	16,111
10	0	0	0	0	0	0	0,656	16,111
11	0	0	0	0	0	0	0,675	13,750

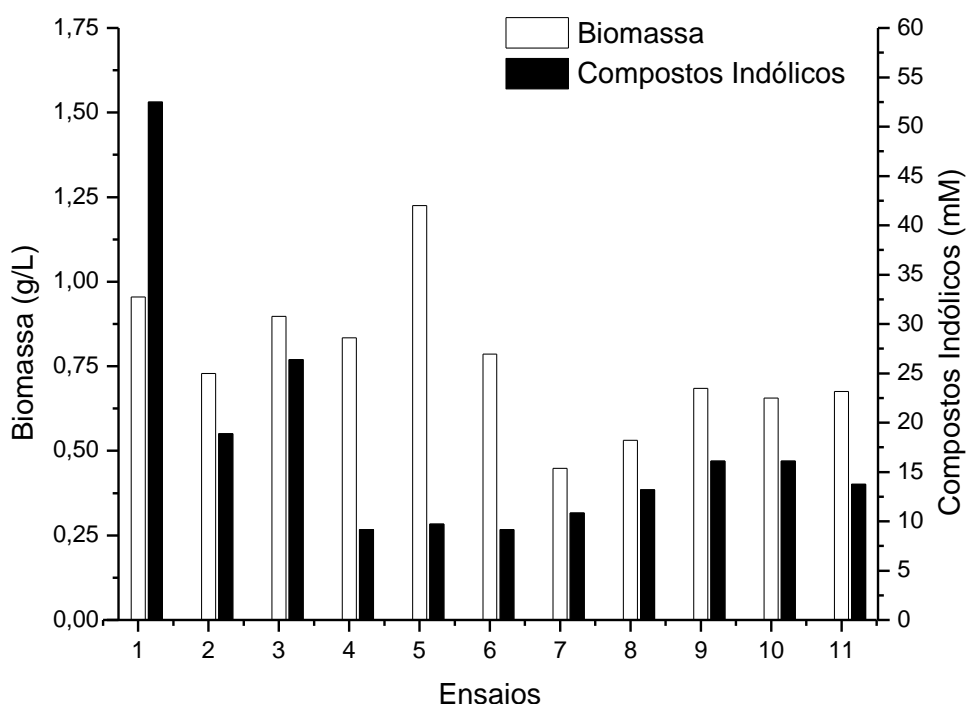


Figura 4.3 – Comparativo das produções de biomassa e compostos indólicos nos ensaios do planejamento FF03.

A Tabela 4.7 apresenta os efeitos estimados das variáveis sobre a biomassa e o compostos indólicos. Analisando os resultados deste experimento também a 90% de confiança verificou-se que apenas a glicose e o sulfato de magnésio não foram estatisticamente significativos para a variável biomassa apresentando valores de p iguais a 0,260 e 0,845, respectivamente. Este fato indica a ocorrência do efeito de compensação das fontes de carbono que matem as bactérias sob nutrição constante. Das variáveis consideradas significativas: peptona, extrato de levedura, ac. glutâmico e fosfato dibásico de potássio, apenas esta ultima apresentou efeito negativo sobre o crescimento celular. Com referência à

variável compostos indólicos todos os fatores foram significativos, inclusive o ácido glutâmico ($p = 0,131$), e apresentaram efeitos positivos.

Tabela 4.7 – Estimativa dos efeitos para as variáveis biomassa e compostos indólicos referente ao planejamento FF03 (2^{6-3}).

Variável	Biomassa			Compostos Indólicos		
	Efeito	Desvio Padrão	Valor p	Efeito	Desvio Padrão	Valor p
Média	1,587	0,072	0,000	17,803	1,085	0,000
Glicose	0,220	0,168	0,260	16,007	2,544	0,003
Peptona	0,510	0,168	0,038	7,674	2,544	0,039
Ext. Levedura	0,335	0,168	0,117	12,257	2,544	0,009
K₂HPO₄	-0,560	0,168	0,029	10,243	2,544	0,016
MgSO₄	-0,035	0,168	0,845	13,160	2,544	0,007
Ac. Glutâmico	0,355	0,168	0,101	4,826	2,544	0,131

4.2.4 Quarto teste: Fatorial fracionado 2^{5-2}

Por fim, encerrando a série de planejamentos fatoriais, foi realizado o experimento denominado FF04 (2^{5-2}), onde o *A. amazonense* foi cultivado em formulações de meios contendo apenas uma fonte de carbono: a glicose. A matriz de ensaios do FF04 está disposta na Tabela 4.8, assim como os valores obtidos para as respostas biomassa e compostos indólicos. Os ensaios de nº 9 a 11 correspondem aos pontos centrais, neles foram obtidos resultados que variaram entre 0,604 e 0,696 g/L, evidenciando uma repetibilidade aceitável dos cultivos. Destacaram-se neste experimento os ensaios nº 3, por apresentar os melhores resultados para biomassa e compostos indólicos, 1,107 g/L e 32,083 mM, respectivamente, e o ensaio nº 8, que apresentou os piores resultados para ambas as respostas: 0,406g/L para biomassa e 4,306 mM de compostos indólicos. Este comparativo de produções de cada ensaio pode ser melhor visualizado na Figura 4.4.

Tabela 4.8 – Matriz do planejamento FF04 (2^{5-2}) e as respostas biomassa (g/L) e compostos indólicos (mM).

Ensaio	Glicose	Peptona bacteriológica	Extrato de levedura	K ₂ HPO ₄	MgSO ₄	Biomassa (g/L)	Compostos indólicos (mM)
1	1	1	1	1	1	0,862	13,611
2	1	1	-1	1	-1	0,452	9,861
3	1	-1	1	-1	1	1,107	32,083
4	1	-1	-1	-1	-1	0,745	5,556
5	-1	1	1	-1	-1	0,604	19,444
6	-1	1	-1	-1	1	0,578	5,417
7	-1	-1	1	1	-1	0,540	8,194
8	-1	-1	-1	1	1	0,406	4,306
9	0	0	0	0	0	0,627	6,250
10	0	0	0	0	0	0,604	7,222
11	0	0	0	0	0	0,696	6,528

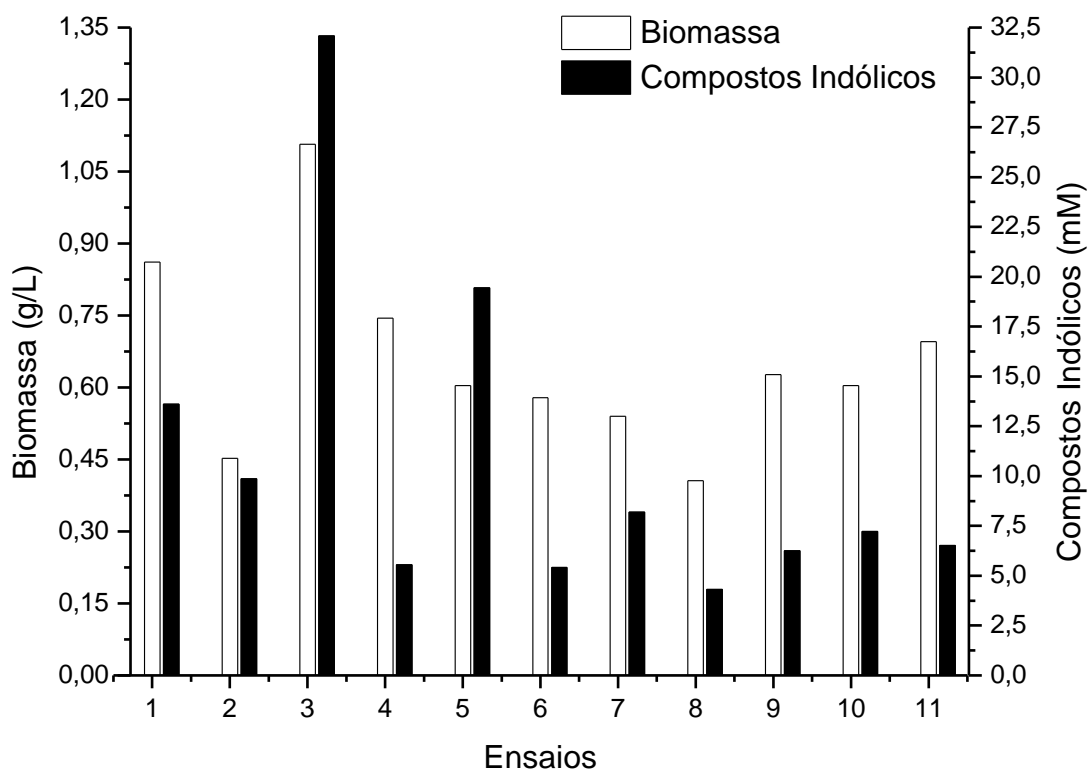


Figura 4.4 – Comparativo das produções de biomassa e compostos indólicos nos ensaios do planejamento FF04.

Os efeitos estimados para as variáveis deste experimento podem ser visualizados na Tabela 4.9. Verificou-se que para a resposta biomassa todos os fatores foram estatisticamente significativos, com destaque para a peptona e para o fosfato, que apresentaram efeitos negativos. O mesmo comportamento dos fatores não foi detectado para a produção de compostos indólicos, uma vez que apenas o extrato de levedura foi significativo e apresentou efeito positivo.

Tabela 4.9 – Estimativa dos efeitos para as variáveis biomassa e compostos indólicos referente ao planejamento FF04 (2^{5-3}).

Variável	Biomassa			Compostos Indólicos		
	Efeito	Desvio Padrão	Valor p	Efeito	Desvio Padrão	Valor p
Média	1,361	0,026	0,000	10,770	2,024	0,003
Glicose	0,538	0,062	0,000	5,938	4,747	0,266
Peptona	-0,157	0,062	0,053	-0,452	4,747	0,928
Ext. levedura	0,483	0,062	0,001	12,048	4,747	0,052
K₂HPO₄	-0,402	0,062	0,001	-6,632	4,747	0,221
MgSO₄	0,317	0,062	0,004	3,091	4,747	0,544

4.2.5 Avaliação de rendimentos, custos e definição do novo meio de cultura

A fim de se definir a nova formulação simplificada, eficiente e mais barata que o meio DYGS, foram calculados os custos de produção, em R\$/g de células produzidas, para cada um dos ensaios dos planejamentos fatoriais a partir dos preços das matérias-primas cotadas pela Embrapa Agrobiologia – CNPAB no pregão eletrônico para aquisição de reagentes de 2011-2, demonstrado na Tabela 4.10. Nesta cotação destacaram-se os itens ácido málico, extrato de levedura e a peptona bacteriológica como os principais responsáveis pelo encarecimento do meio de cultura, apresentando valores de R\$1,05, R\$ 0,47 e R\$0,36 por grama, respectivamente, ao contrário da glicose que teve o seu preço em R\$0,03 por grama como menor entre as matérias-primas, inclusive as fontes de carbono sacarose (R\$0,10) e glicerina (R\$0,07), testadas posteriormente neste trabalho. Ressalta-se que todos os reagentes são de padrão analítico, porém foram adquiridos ao menor preço de mercado na ocasião.

Na Tabela 4.11 encontram-se relacionados, além dos custos de produção, os fatores de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$), de células em produto ($Y_{P/X}$) e de substrato em produto ($Y_{P/S}$), sendo que o produto (P) se refere à produção de compostos indólicos e o substrato (S) a quantidade total de fonte de carbono presente no meio de cultura, englobando a glicose e os ácidos orgânicos, quando for o caso. Para os ensaios do experimento FF01, não foram dosados os teores de compostos indólicos, sendo assim, não foi possível efetuar os cálculos de $Y_{P/X}$ e $Y_{P/S}$ referentes a este experimento.

Tabela 4.10 – Cotação de matérias-primas realizada pela Embrapa Agrobiologia – CNPAB no pregão de 2011 -2.

Reagentes	Conteúdo da Embalagem (g)	Preço R\$	Preço R\$/g
Ácido málico	50	52,40	1,05
Ácido glutâmico	1000	188,17	0,19
Extrato de levedura	500	236,12	0,47
Fosfato bibásico de potássio	500	140,50	0,28
Glicerina	1000	72,50	0,07
Glicose	500	13,29	0,03
Peptona bacteriológica	1000	356,99	0,36
Sacarose	1000	100,44	0,10
Sulfato de magnésio	500	41,73	0,08

O experimento FF02 apresentou os maiores rendimentos de produção de compostos indólicos em relação à biomassa, com valores chegando a atingir $Y_{P/X} = 14,732$ no ensaio nº5. Porém os baixos rendimentos em relação à biomassa como o apresentado pelo experimento nº 6 ($Y_{X/S} = 0,075$) associados presença do ácido málico na composição destes meios provocaram altos custos de produção com valor médio de R\$ 7,59 por grama de biomassa e máximo de R\$ 13,85.

O planejamento FF03 apresentou ensaio mais barato (nº4) com custo estimado de R\$1,60, assim como o menor custo médio: R\$ 2,73. Entretanto, seu maior rendimento para biomassa não passou de $Y_{X/S} = 0,449$.

Utilizando o $Y_{X/S}$ como principal fator de interesse, verificou-se que os rendimentos dos ensaios dos experimentos FF01 a FF03 foram considerados baixos quando comparados aos do FF04. Enquanto o FF01 teve maior rendimento no ensaio nº6, $Y_{X/S} = 0,336$, no FF02 o melhor foi o ensaio nº3, $Y_{X/S} = 0,396$, e no FF03 o ensaio nº6 com $Y_{X/S} = 0,449$, o FF04

apresentou 3 melhores rendimentos de todo o planejamento fatorial, com rendimentos de $Y_{X/S} = 0,604$, $Y_{X/S} = 0,578$ e $Y_{X/S} = 0,540$ nos ensaios nº 5, 6 e 7, respectivamente.

Por apresentar em seus ensaios melhores resultados relacionados à biomassa e demandar um custo médio de produção moderado de R\$ 5,10, o planejamento FF04 foi escolhido para que, a partir da análise dos efeitos estimados para suas variáveis (glicose, peptona, extrato de levedura, fosfato e sulfato), descritos na Tabela 4.9, fosse proposta a nova formulação do meio de cultura.

Tabela 4.11 – Fatores de rendimento e custo de produção para os ensaios dos planejamentos fatoriais fracionados.

Ensaio	FF01		FF02				FF03				FF04			
	Y _{X/S} (g/g)	Custo (R\$/g _{cel.})	Y _{X/S} (g/g)	Y _{P/X} (g/g)	Y _{P/S} (g/g)	Custo (R\$/g _{cel.})	Y _{X/S} (g/g)	Y _{P/X} (g/g)	Y _{P/S} (g/g)	Custo (R\$/g _{cel.})	Y _{X/S} (g/g)	Y _{P/X} (g/g)	Y _{P/S} (g/g)	Custo (R\$/g _{cel.})
1	0,186	3,99	0,247	5,439	1,342	3,86	0,182	9,630	1,752	3,14	0,287	2,768	0,795	2,99
2	0,109	6,65	0,143	5,129	0,734	5,82	0,194	4,541	0,882	2,37	0,151	3,822	0,576	9,36
3	0,170	4,47	0,396	3,583	1,417	1,67	0,239	5,153	1,233	2,51	0,369	5,077	1,874	1,71
4	0,116	3,01	0,098	9,279	0,906	5,12	0,159	1,924	0,306	1,60	0,248	1,307	0,324	4,77
5	0,153	4,04	0,152	14,732	2,239	7,53	0,377	1,390	0,524	2,25	0,604	5,641	3,407	3,87
6	0,336	1,68	0,075	11,472	0,858	13,85	0,449	2,042	0,918	1,85	0,578	1,641	0,949	7,05
7	0,286	2,38	0,273	3,884	1,059	6,21	0,256	4,231	1,085	4,93	0,540	2,657	1,436	3,60
8	0,125	3,23	0,186	9,106	1,691	8,16	0,163	4,356	0,711	2,76	0,406	1,859	0,754	9,07
9	0,305	3,91	0,087	9,948	0,864	10,97	0,196	4,121	0,806	2,92	0,314	1,746	0,548	4,09
10	0,213	3,73	0,093	8,713	0,809	10,26	0,187	4,302	0,806	2,89	0,302	2,095	0,633	5,35
11	0,208	4,24	0,095	9,131	0,870	10,00	0,193	3,567	0,688	2,77	0,348	1,644	0,572	4,29
12	0,222	4,10												
13	0,218	6,13												
14	0,192	3,73												
15	0,123	6,33												
16	0,145	5,13												
17	0,199	4,63												
18	0,191	4,81												
19	0,200	4,59												
Média	0,195	4,25	0,168	8,220	1,163	7,59	0,236	4,114	0,883	2,73	0,377	2,751	1,079	5,10

A Tabela 4.12 apresenta a composição definitiva do meio aperfeiçoado. O novo meio foi escalonado para ser utilizado nos experimentos em biorreator conforme o delineamento composto central rotacional - DCCR01. A fim de maximizar a produção de células, a concentração de glicose foi aumentada para 5,0 g/L. O extrato de levedura se destacou como uma importante fonte de nitrogênio para o sistema, apresentando efeito positivo, e teve sua concentração fixada no nível superior do planejamento - 3,0 g/L. O sulfato de magnésio incrementou positivamente as produções e teve sua concentração fixada em 0,75 g/L, ao contrário do fosfato dibásico de potássio apresentou efeito negativo, portanto, teve seu valor fixado no nível inferior, 0,25 g/L. A peptona bacteriológica, que também apresentou efeito negativo, foi excluída da formulação por se tratar de uma segunda e onerosa fonte de nitrogênio. Por fim foi adicionada à formulação final 4,0 mL/L de uma solução de micronutrientes.

Tabela 4.12 – Composição do Meio de Cultura Aperfeiçoado.

Composição	Glicose	Ext. levedura	K ₂ HPO ₄	MgSO ₄	Micronutrientes (mL/L)
g/L	5,00	3,00	0,25	0,75	4,00

Conforme apresentado no Tabela 4.13, o meio aperfeiçoado exige menos investimento em matérias-primas, custando R\$ 1,70 por litro, que corresponde a 1/3 do valor do meio DYGS original, além de possuir capacidade de produção de biomassa celular aproximadamente 66,7% maior.

Tabela 4.13 – Comparativo entre os custos dos Meio DYGS e ELG.

Meio	Glicose	Ácido málico	Peptona	Extrato de levedura	K ₂ HPO ₄	MgSO ₄	Ácido glutâmico	Micronutrientes	Custo (R\$/L)
DYGS	0,05	2,10	1,5	0,94	0,14	0,04	0,28	0,00	5,06
Aperfeiçoado	0,15	0,00	0,00	1,42	0,07	0,06	0,00	Desprezível	1,70

4.3 Otimização das Condições de Processamento em Biorreator

4.3.1 Delineamento Composto Central Rotacional - DCCR

As variáveis independentes avaliadas neste experimento foram a temperatura de crescimento do microrganismo (°C), a agitação (rpm) e a aeração do sistema, registrada em litros por minuto (LPM) de ar. Como respostas (variáveis dependentes), foram avaliadas a produção de biomassa e de compostos indólicos. Na Tabela 4.14 estão demonstrados os níveis das variáveis independentes cujos valores de estavam compreendidos entre 28 e 48°C para a temperatura, 100 a 250 rpm para a agitação e 2 a 4 LPM para a aeração do sistema.

Tabela 4.14 – Tabelada das variáveis codificadas referentes ao DCCR para o cultivo de *A. amazonense* em biorreator.

Variável	- α	-1	0	1	+ α
Temperatura (°C)	28	30,8	35	39,2	42
Agitação (RPM)	100	130	175	220	250
Aeração (LPM)	2	2,4	3	3,6	4

Foi empregado um DCCR 2³ com 3 repetições na condição central e 6 ensaios nos pontos axiais, resultando em um número total de 17 ensaios cuja matriz experimental e respostas estão dispostas na Tabela 4.15.

Tabela 4.15 – Matriz de ensaios do DCCR e as respostas biomassa (g/L) e compostos indólicos (mM).

Ensaio s	Temperatura (°C)	Agitação (RPM)	Aeração (LPM)	Biomassa (g/L)	Indol. (mM)
1	-1	-1	-1	1,671	57,255
2	-1	-1	1	2,833	73,725
3	-1	1	-1	3,166	70,196
4	-1	1	1	2,852	35,972
5	1	-1	-1	1,749	43,611
6	1	-1	1	2,415	39,444
7	1	1	-1	2,960	58,472
8	1	1	1	2,766	53,750
9	-1,68	0	0	2,764	36,389
10	1,68	0	0	2,640	42,083
11	0	-1,68	0	2,759	60,276
12	0	1,68	0	3,140	73,750
13	0	0	-1,68	2,500	70,417
14	0	0	1,68	3,703	70,639
15	0	0	0	1,810	37,451
16	0	0	0	2,044	85,686
17	0	0	0	1,926	66,471

Os valores de biomassa obtidos variaram de 1,671 g/L no ensaio nº1 a 3,703 g/L no ensaio nº14, segundo os tratamentos de temperatura agitação e aeração aplicados nos 17 ensaios do DCCR. Para o ensaio nº1 todas as condições de tratamento foram realizadas no nível -1, o que provocou a consequente redução valor de biomassa obtido. Já o ensaio nº14, por se tratar de um ponto axial, impeliu condições centrais de temperatura e agitação acompanhados pela condição máxima de aeração. Essa disponibilidade aumentada de oxigênio dissolvido foi responsável pelo melhor rendimento de produção de biomassa obtido no experimento.

Quanto a produção de compostos indólicos, foram observados valores entre 35,972 mM no ensaio nº4, em que o microrganismo foi submetido a uma condição reduzida de temperatura (nível -1) e aumentada do binômio aeração/agitação, e de 85,686 mM no ensaio nº16 onde foram fornecidas condições centrais de tratamento. A temperatura exerceu forte influência sobre estes resultados. Pela avaliação da Tabela 4.15 percebeu-se que os ensaios de 11 a 17 cuja temperatura foi fixada no ponto central (35°C) apresentou a melhor produção média (66,384 mM) quando comparados outros dois grupos: Ensaios de 1 a 4 com T = 30,8°C e produção média de 59,287 mM, e ensaios de 5 a 8 com produção de 48,819 mM.

As curvas que mostram a evolução das concentrações de biomassa, compostos indólicos, glicose e pO₂ com o tempo referentes a cada ensaio do DCCR estão descritas da Figura 4.5 até a Figura 4.21. Estas figuras foram agrupadas em pares ou trios para fins de comparação, seguindo um padrão tal que pelo menos duas das três variáveis avaliadas em cada ensaio estivessem fixadas. Desta forma, os pares de ensaios 1 e 5, 2 e 6, 3 e 7, e 4 e 8 constituem o grupo dos ensaios principais e foram realizados nas mesmas condições de aeração e agitação tendo como item diferenciador a temperatura. Os pares 9 e 10, 11 e 12 e 13

e14 pertencem ao grupo dos pontos axiais, sendo diferenciados pela temperatura, agitação e aeração, respectivamente. Por fim, o trio dos ensaios 15, 16 e 17 constitui o grupo dos pontos centrais, tratando-se então de réplicas.

Os ensaios 1 (Figura 4.5) e 5 (Figura 4.6) foram realizados a 100 rpm e sob aeração de 2,4 LPM, e a temperaturas de 30,8°C e 39,2°C, respectivamente. Sob estas condições, observou-se a produção de quantidades similares de biomassa ($X_1 = 1,671$ g/L e $X_5 = 1,749$ g/L) e o consumo total da glicose disponível, além de apresentarem uma grande demanda por oxigênio, fazendo com que os valores de pO_2 chegassem a 0% em 3 horas de fermentação. O processo, na maior temperatura, proporcionou a redução do tempo de batelada em 3h, fato que confere vantagem para a produção industrial, no entanto, quando processado a 30,8°C, o microrganismo produziu 57,255 mM de compostos indólicos, contra 43,611 mM a 39,2°C, um acréscimo de 31,3% que deve ser levado em conta quando há a intenção de se obter um produto final rico em auxinas.

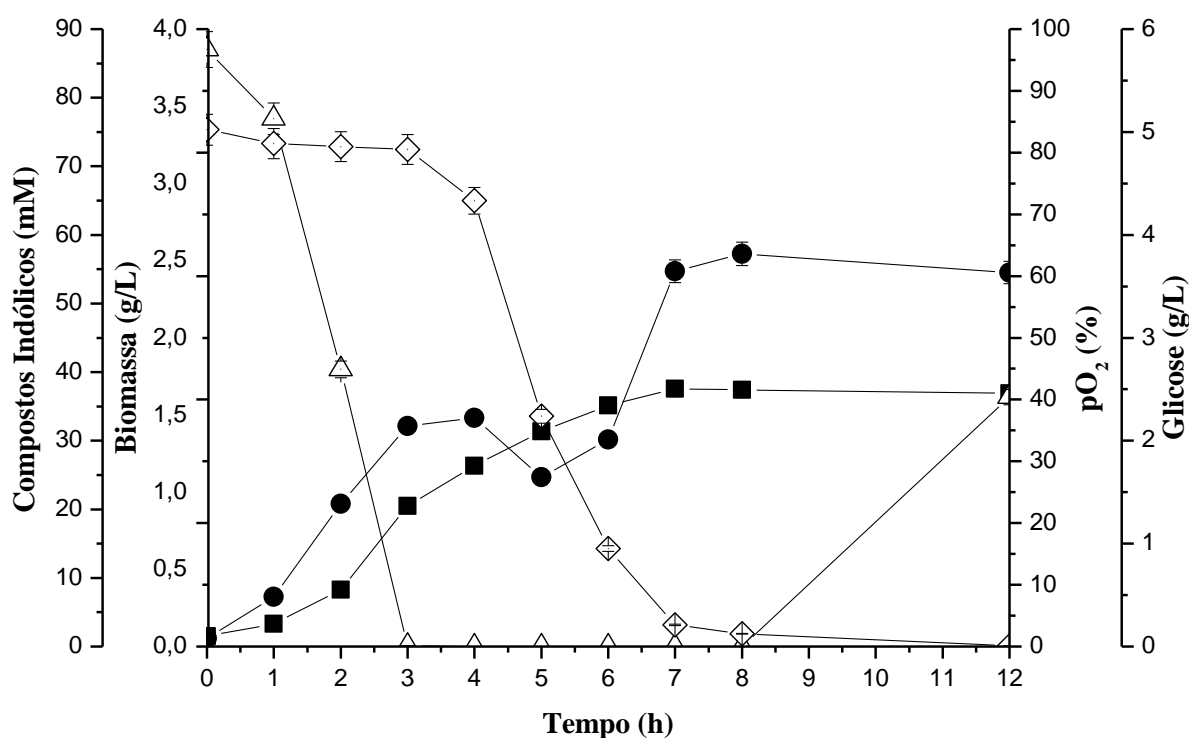


Figura 4.5 – Evolução das concentrações de Compostos Indólicos (●), Biomassa (■), pO_2 (△) e Glicose (◇) para o ensaio DCCR 01.

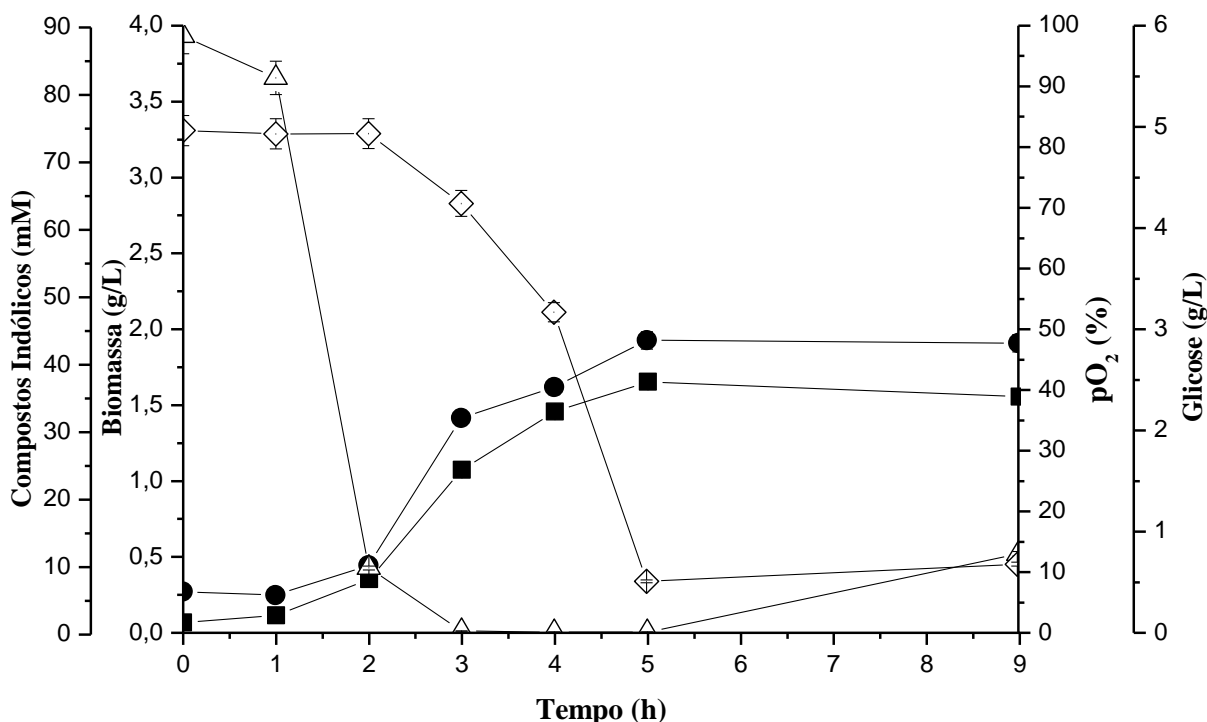


Figura 4.6 – Evolução das concentrações de Compostos Indólicos (●), Biomassa (■), pO₂ (△) e Glicose (◇) para o ensaio DCCR 05.

Os cultivos 2 (Figura 4.7) e 6 (Figura 4.8) foram realizados sob a mesma agitação (130 rpm), sob aeração aumentada (3,6 Lpm) e diferindo-se nas temperaturas ($T_2 = 30,8$ e $T_6 = 39,2^\circ\text{C}$). Nestas condições de processamento o cultivo em menor temperatura sobressaiu-se, apresentando melhores resultados tanto para a biomassa ($X_2 = 2,833$ g/L contra $X_6 = 2,415$ g/L) quanto para os compostos indólicos ($CI_2 = 73,725$ mM contra $CI_6 = 39,444$ mM). Em ambos os ensaios foi observada alta demanda de oxigênio e seu consequente esgotamento durante um longo período, além da formação de duas fases de crescimento exponencial. Outro fato que chamou atenção nestes ensaios foi o perfil da curva de consumo de glicose, que ao tender para o esgotamento do substrato, teve seu valor aumentado novamente, sugerindo a produção de algum metabólito redutor durante a transição entre as fases de crescimento exponencial, em quantidade suficiente para ser detectado pelo método DNS (quantificação de açúcares redutores).

O ensaio 6 destacou-se pela intensa densidade entre a quinta e a sétima hora de fermentação, apresentando alta produção de metabólitos, possivelmente poliméricos, de tal maneira que zonas de estagnação foram criadas dentro do biorreator. Com o passar do tempo essas zonas se desfizeram e a densidade do sistema voltou à sua condição normal.

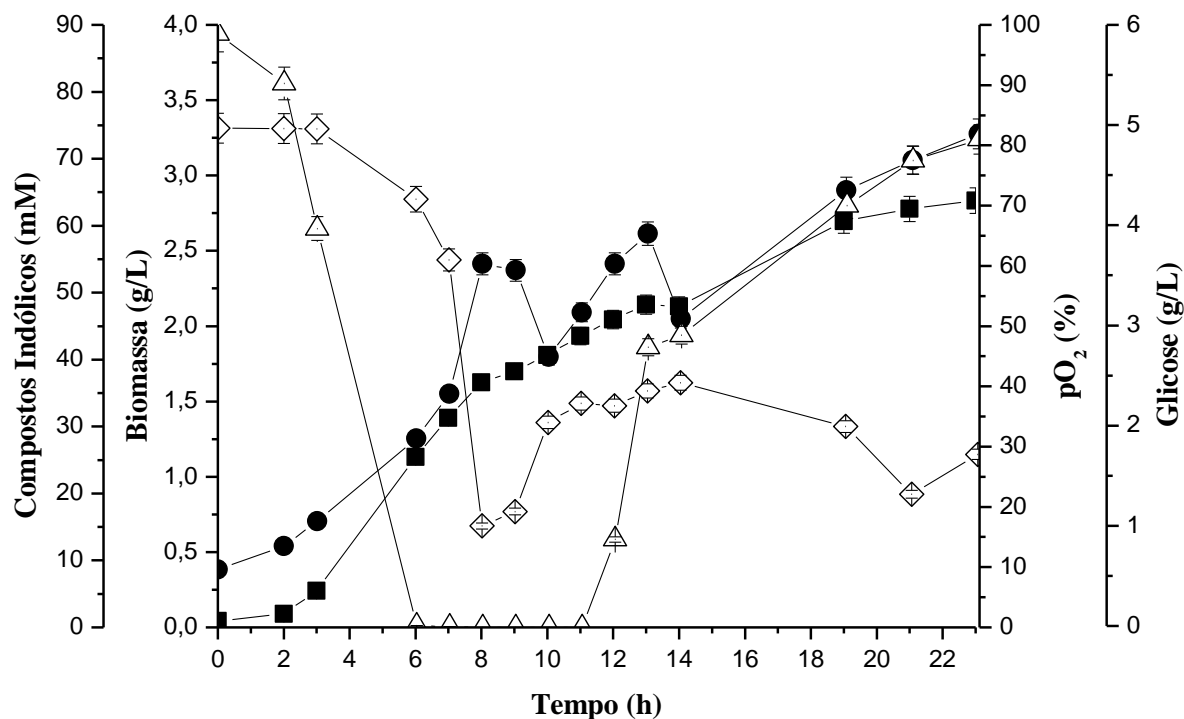


Figura 4.7 – Evolução das concentrações de Compostos Indólicos (●), Biomassa (■), pO₂ (△) e Glicose (◇) para o ensaio DCCR 02.

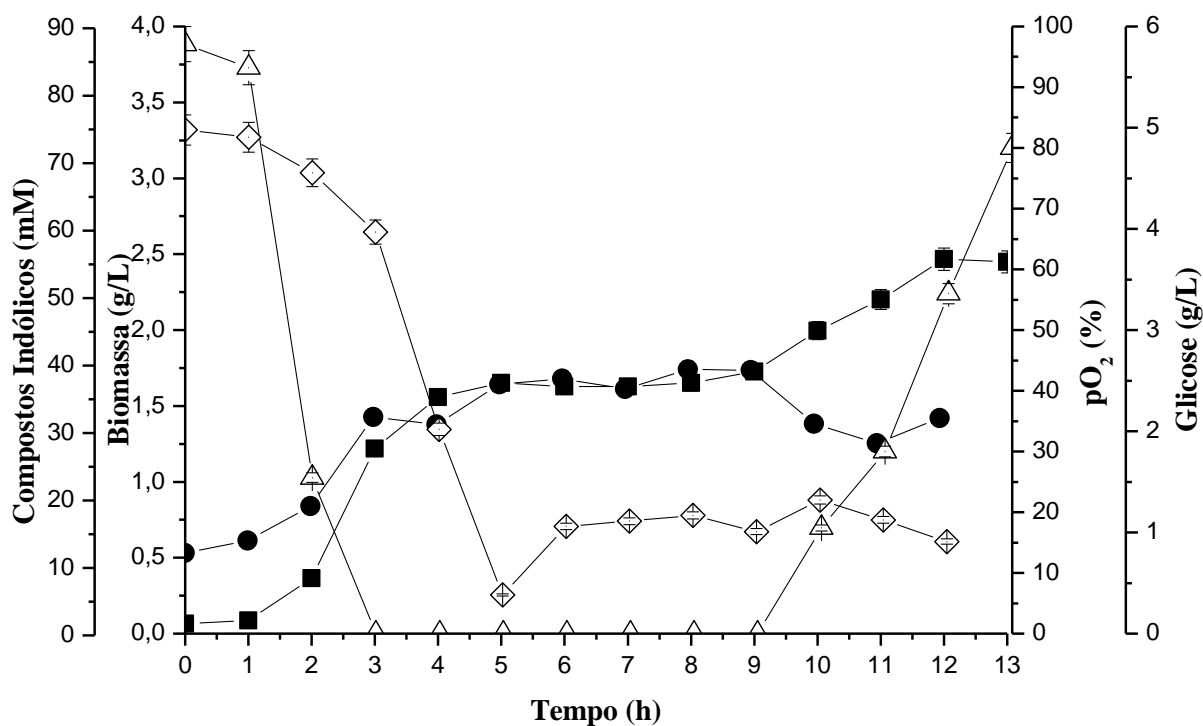


Figura 4.8 – Evolução das concentrações de Compostos Indólicos (●), Biomassa (■), pO₂ (△) e Glicose (◇) para o ensaio DCCR 06.

No ensaio 3, realizado a 30,8°C (Figura 4.9) e no ensaio 7, realizado a 39,2°C (Figura 4.10), os níveis de agitação e aeração foram invertidos em relação ao ensaio 2, tendo sido aplicadas estas variáveis em +1 e -1, respectivamente. Nestes casos, mais uma vez o processo realizado em menor temperatura apresentou vantagem sobre seu par, atingindo concentração máxima de biomassa de $X_3 = 3,166$ g/L contra $X_7 = 2,960$ g/L. Assim como no par de ensaios anterior, (2 e 6), houve formação de duas fases de crescimento exponencial: a primeira com intensa inclinação e a segunda com inclinação abrandada (verificar valores de μ na Tabela 4.16). Foi possível constatar que nos ensaios em temperaturas maiores, a curva de biomassa apresentou uma fase de transição mais longa, o que a tornou mais definida, enquanto na menor temperatura a curva apresentou uma breve estabilização antes de iniciar a nova fase de crescimento. Em ambos os ensaios o microrganismo assimilou toda a glicose, porém no ensaio 3 constatou-se a produção de metabólitos redutores a partir da nona hora de fermentação.

Com relação à produção de compostos indólicos, foram obtidos valores máximos de $CI_3 = 70,196$ mM em $t = 6$ h e $CI_7 = 58,472$ mM em $t = 7$ h. No entanto, no decorrer das fermentações estas concentrações oscilaram e decaíram a valores finais de $CI_3 = 25,686$ mM e $CI_7 = 41,250$ mM. Apesar do cultivo em menor temperatura ter produzido altos valores de compostos indólicos durante a primeira fase de crescimento exponencial, a diminuição drástica de 63% do decorrer da fermentação fez com que o cultivo em maior temperatura apresentasse produção muito maior.

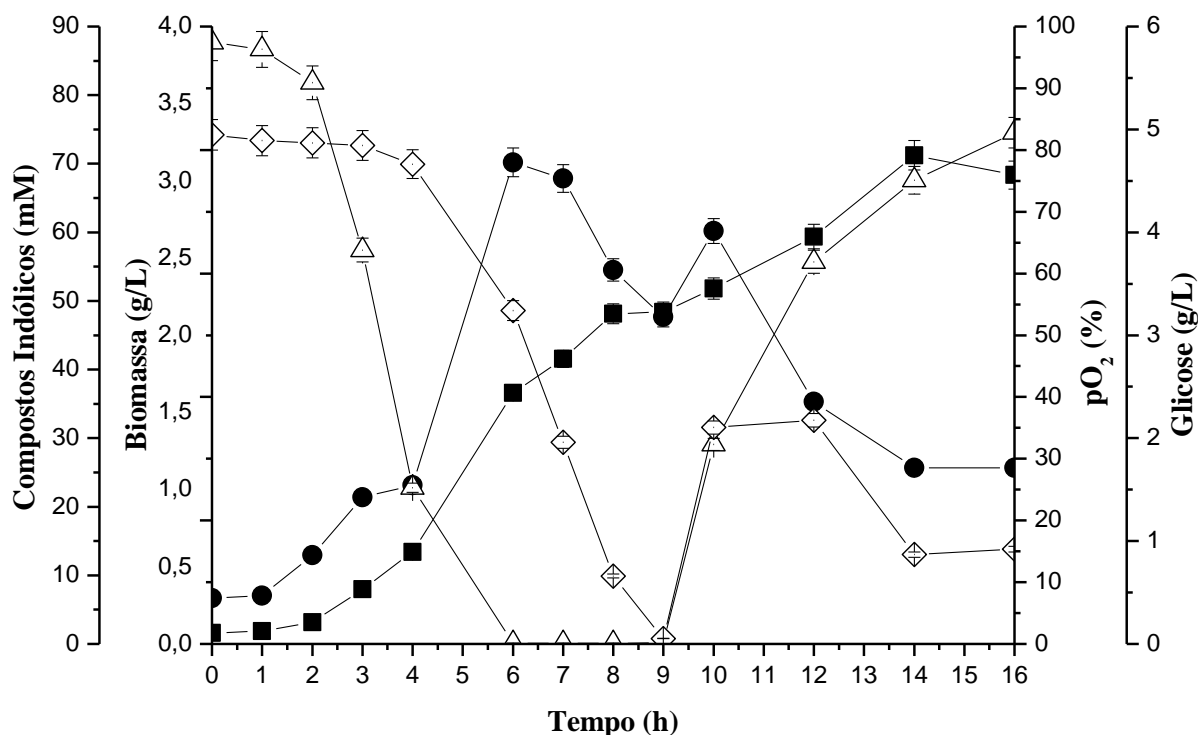


Figura 4.9 – Evolução das concentrações de Compostos Indólicos (●), Biomassa (■), pO₂ (△) e Glicose (◇) para o ensaio DCCR 03.

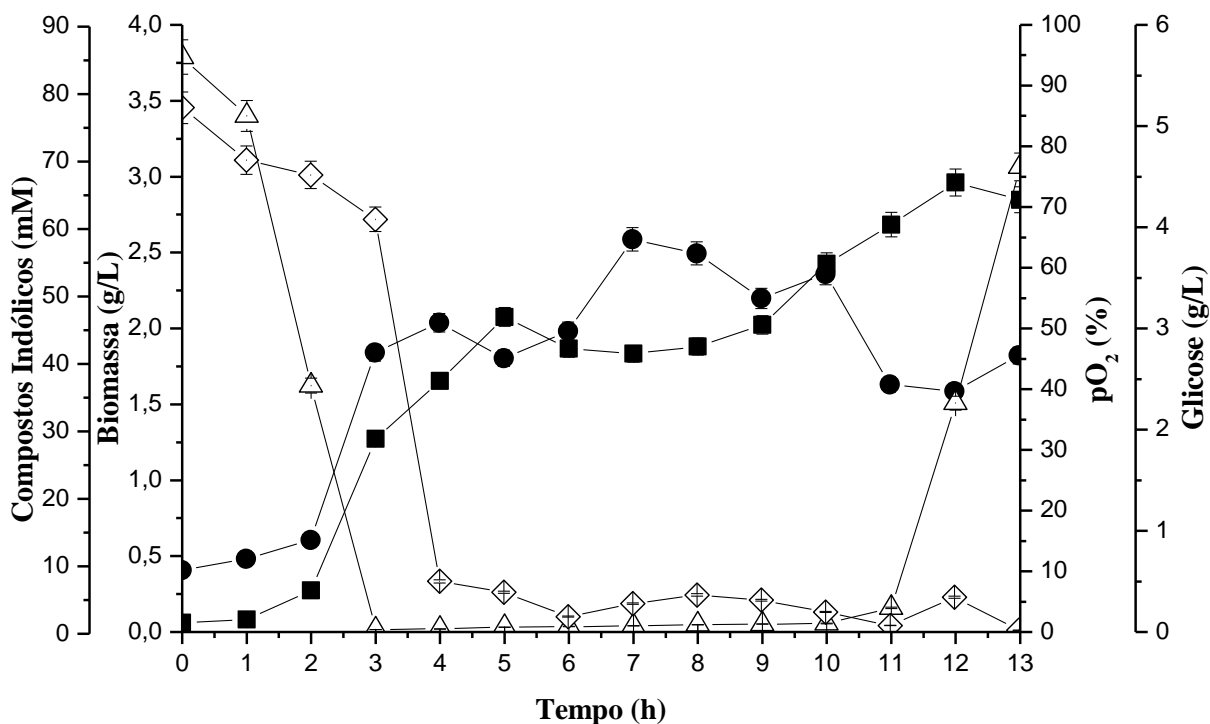


Figura 4.10 – Evolução das concentrações de Compostos indólicos (●), biomassa (■), pO₂ (△) e glicose (◇) para o ensaio DCCR 07.

Os ensaios 4 (Figura 4.11) e 8 (Figura 4.12) foram realizados nos níveis +1 de agitação e aeração. Sob estas condições, observou-se a produção de quantidades próximas de biomassa ($X_4 = 2,852$ g/L e $X_8 = 2,766$ g/L) e o consumo parcial da glicose disponível (70% e 60% da quantidade disponível, respectivamente), além de apresentarem grande demanda por oxigênio, fazendo com que os valores de pO₂ chegassem a 0% em $t = 7$ h no cultivo 4 (30,8°C) e em $t = 3$ h cultivo 8 (39,2°C). Foi observada uma fase *lag* de 4 horas no ensaio a 30,8°C, comprometendo a produtividade do processo.

Os ensaios 4 e 8 apresentaram concentrações finais de compostos indólicos abaixo de 35,0 mM, as mais baixas do experimento DCCR. No cultivo 8 foi observado a presença de duas fase de crescimento exponencial coincidente com o período de baixa ou nenhuma oxigenação e com a produção de metabólitos redutores que interferem na curva de quantificação da glicose. Esse perfil tem sido observado para todos os ensaios em temperaturas elevadas.

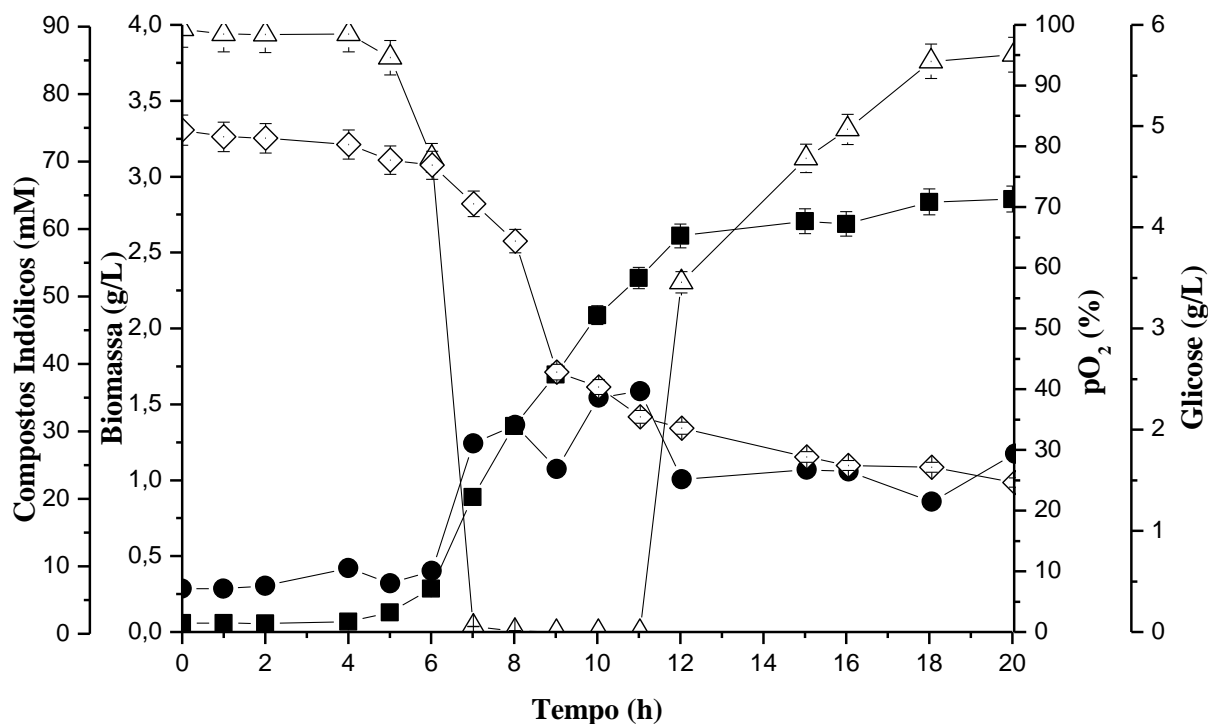


Figura 4.11 – Evolução das concentrações de Compostos Indólicos (●), Biomassa (■), pO₂ (△) e Glicose (◇) para o ensaio DCCR 04.

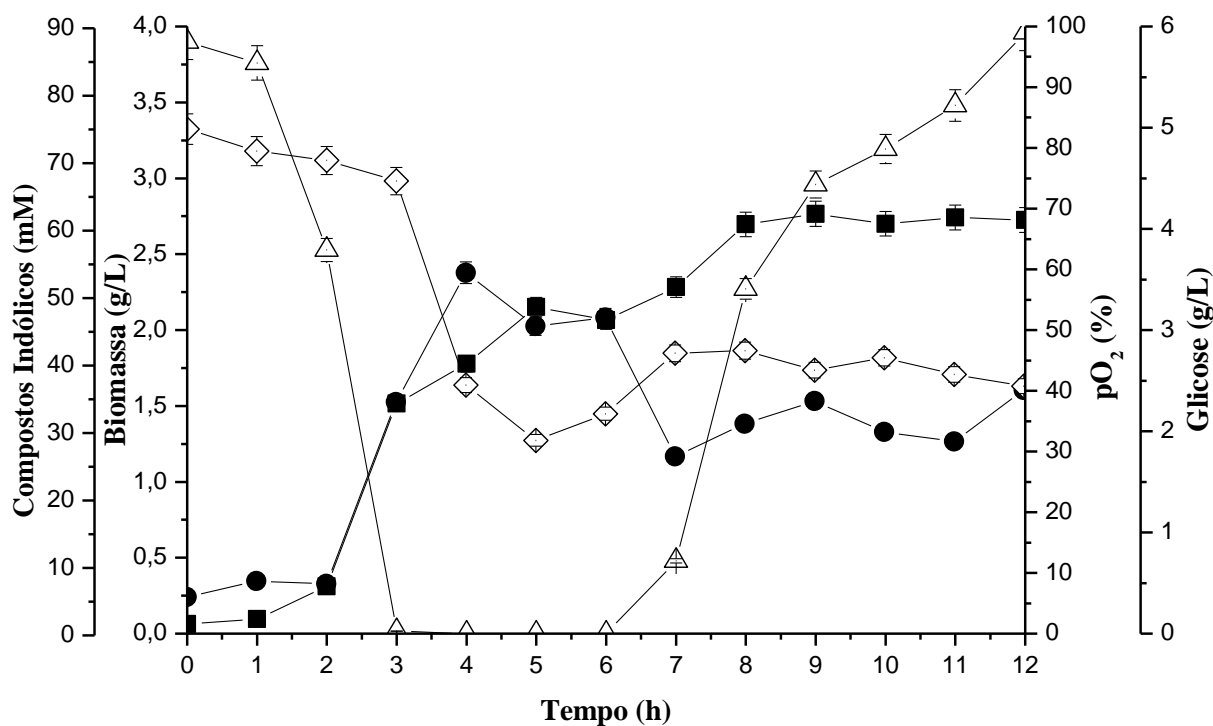


Figura 4.12 – Evolução das concentrações de Compostos indólicos (●), biomassa (■), pO₂ (△) e glicose (◇) para o ensaio DCCR 08.

Outra análise que pode ser feita com relação aos resultados de biomassa é a comparação dos grupos de ensaios realizados na mesma temperatura. Tanto nos cultivos a 30,8°C (1, 2, 3 e 4), quanto nos cultivos 39,2°C (5, 6, 7 e 8), notou-se o aumento progressivo na quantidade de biomassa produzida nos três primeiros ensaios e um decréscimo no quarto: $X_1 = 1,671$ g/L, $X_2 = 2,833$ g/L, $X_3 = 3,166$ g/L, $X_4 = 2,852$ g/L, $X_5 = 1,749$ g/L, $X_6 = 2,415$ g/L, $X_7 = 2,960$ g/L e $X_8 = 2,766$ g/L. Pela análise da matriz experimental do DCCR (Tabela 4.15), verificou-se que o primeiro ensaio de cada grupo esteve sob agitação e aeração em nível -1 e apresentaram menores valores. O segundo ensaio dos grupos esteve sob agitação em -1 e aeração em +1. Esse acréscimo na aeração favoreceu a dissolução de O_2 no sistema proporcionando maior produção de biomassa. No terceiro ensaio as condições se inverteram, sendo fornecida a agitação em nível +1 e a aeração em nível -1. O consequente aumento da produção de biomassa nos ensaios 3 e 7 indicam que a variável agitação foi mais eficiente na dissolução do O_2 que a aeração em ambas as temperaturas e seu valor deve ser levado em conta quando se quiser aumentar a produção de biomassa. Entretanto, a aplicação simultânea da agitação e aeração nos níveis +1 provocou redução dos valores de X_4 e X_8 , em 9,91% e 6,55 %, respectivamente.

Os ensaios 9 (Figura 4.13) e 10 (Figura 4.14) correspondem aos pontos axiais de temperatura, onde foram aplicadas de 28 e 42°C, respectivamente. Apesar da grande diferença de temperatura não ter provocado grandes alterações na produção final de biomassa ($X_9 = 2,764$ g/L e $X_{10} = 2,640$ g/L), o ensaio a 28°C apresentou quase 4 horas de fase *lag*, comprometendo a produtividade do processo ($P_{X9} = 0,212$ g/L.h contra $P_{X10} = 0,234$ g/L.h). Neste último apenas 60% da glicose foi assimilada pela bactéria, incrementando o fator de conversão de substrato em biomassa ($Y_{X/S} = 0,882$), além disso, o pO_2 manteve-se acima de 12%, possivelmente pela facilidade de dissolução do O_2 em menores temperaturas. A concentração máxima de compostos indólicos foi de $CI_9 = 36,389$, porém a produção foi interrompida em $t = 10$ horas, três horas antes de finalizar a fase de crescimento exponencial, ponto em que esse fato é mais comumente observado.

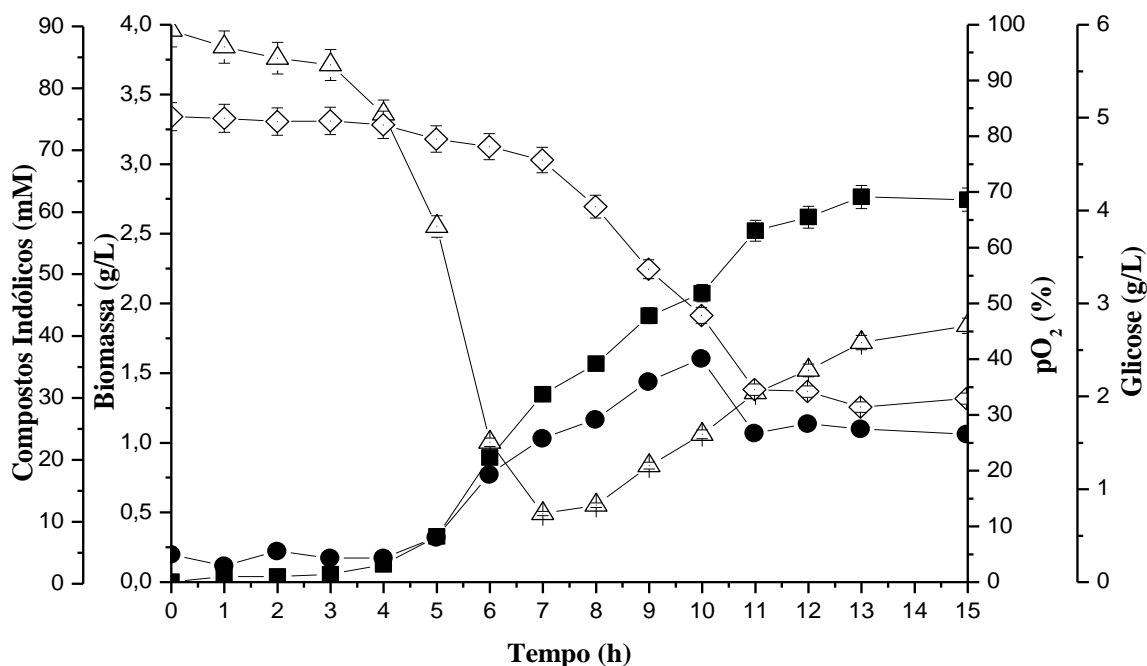


Figura 4.13 – Evolução das concentrações de Compostos Indólicos (●), Biomassa (■), pO_2 (△) e Glicose (◇) para o ensaio DCCR 09.

No cultivo 10 foi observado o comportamento típico do cultivo em temperaturas elevadas descrito nos ensaios anteriores: a presença de duas fases de crescimento exponencial coincidentes com o período de baixa ou nenhuma oxigenação e com a produção de metabólitos redutores que interferem na curva de quantificação da glicose.

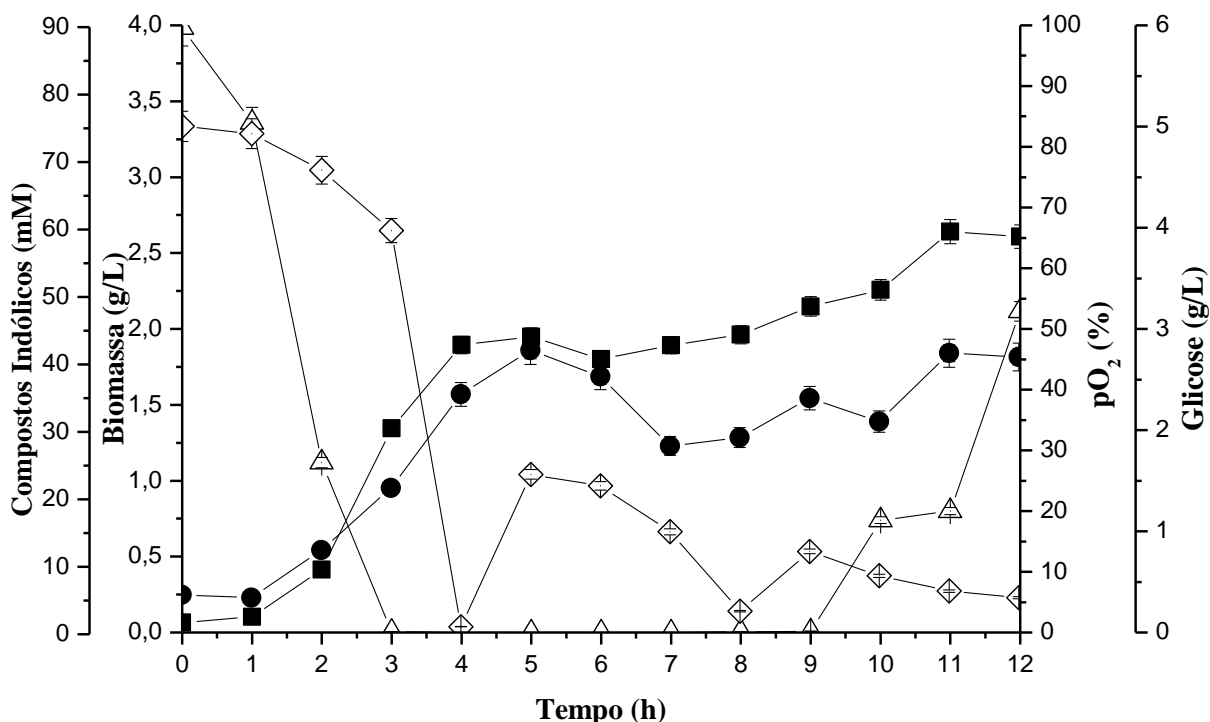


Figura 4.14 – Evolução das concentrações de Compostos Indólicos (●), Biomassa (■), pO₂ (△) e Glicose (◇) para o ensaio DCCR 10.

Os ensaios 11 (Figura 4.15) e 12 (Figura 4.16) trataram-se de pontos axiais de agitação, onde foram aplicados no processo 100 e 250 rpm, respectivamente. Obteve-se nestes ensaios concentrações de biomassa de $X_{11}=2,759$ g/L e $X_{12}=3,140$ g/L e concentrações de compostos indólicos de $CI_{11}=60,276$ mM e $CI_{12}=73,750$ mM. Estes valores mostram que o incremento no valor da agitação de fermentação proporcionou o aumento de 12% na produção de biomassa e de 18,3% na produção de compostos indólicos.

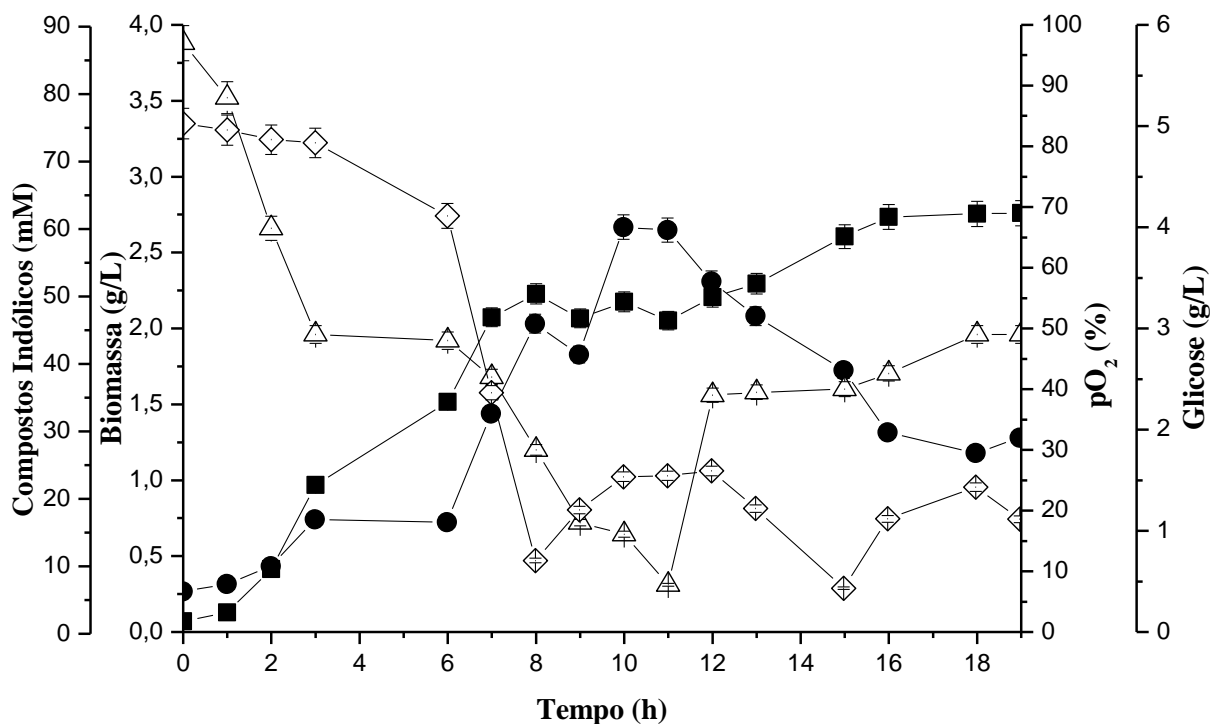


Figura 4.15 – Evolução das concentrações de Compostos Indólicos (●), Biomassa (■), pO₂ (△) e Glicose (◇) para o ensaio DCCR 11.

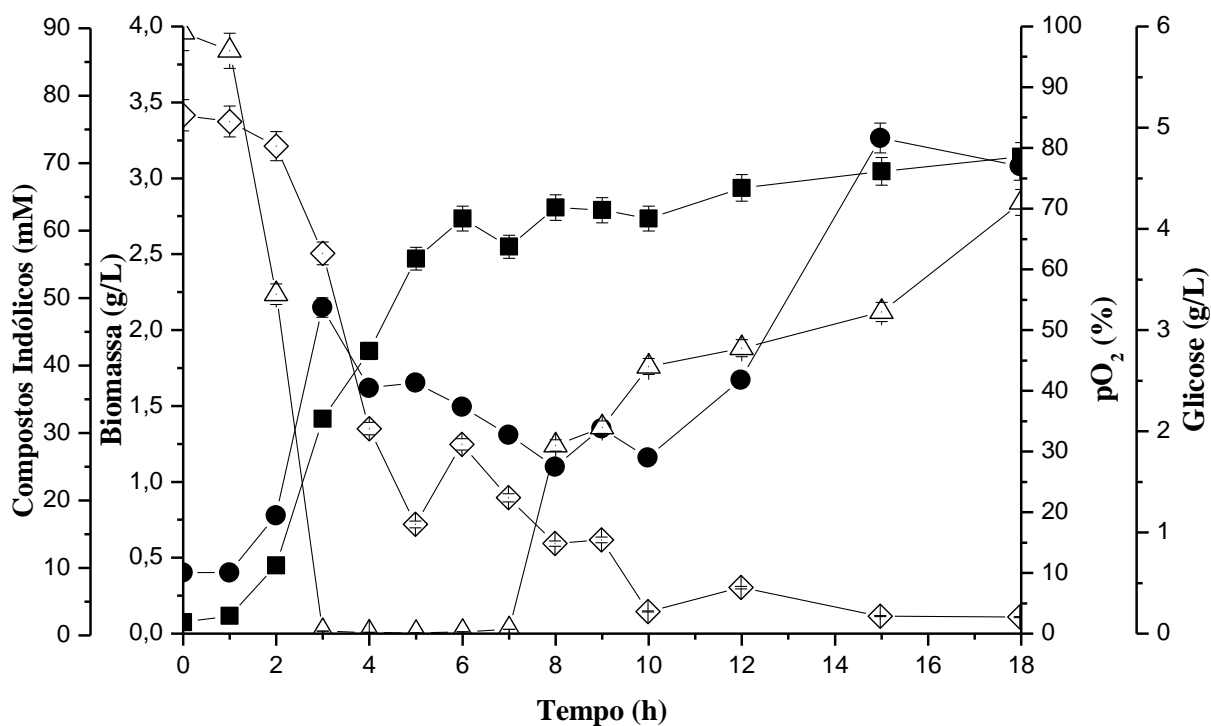


Figura 4.16 – Evolução das concentrações de Compostos Indólicos (●), Biomassa (■), pO₂ (△) e Glicose (◇) para o ensaio DCCR 12.

Os ensaios 13 (Figura 4.17) e 14 (Figura 4.18) tratam-se de pontos axiais de aeração, onde foram aplicadas de 2,0 Lpm e 4,0 Lpm de ar no sistema, respectivamente. Foi possível observar que nestas condições que a variação da aeração não apresentou efeito sobre a produção de compostos indólicos ($CI_{13} = 70,417$ mM e $CI_{14} = 70,639$ mM). Por outro lado, foram obtidas concentrações de biomassa muito distintas: $X_{13} = 2,5$ g/L e $X_{14} = 3,7$ g/L. Essa diferença de 1,2 g/L representa um acréscimo de 32,4% na produção de biomassa. Portanto, a aeração demonstrou ser o parâmetro que mais incrementou a produção de biomassa, uma vez que a agitação proporcionou o aumento de 12% e a temperatura provocou o decréscimo de 4,3% nesta resposta.

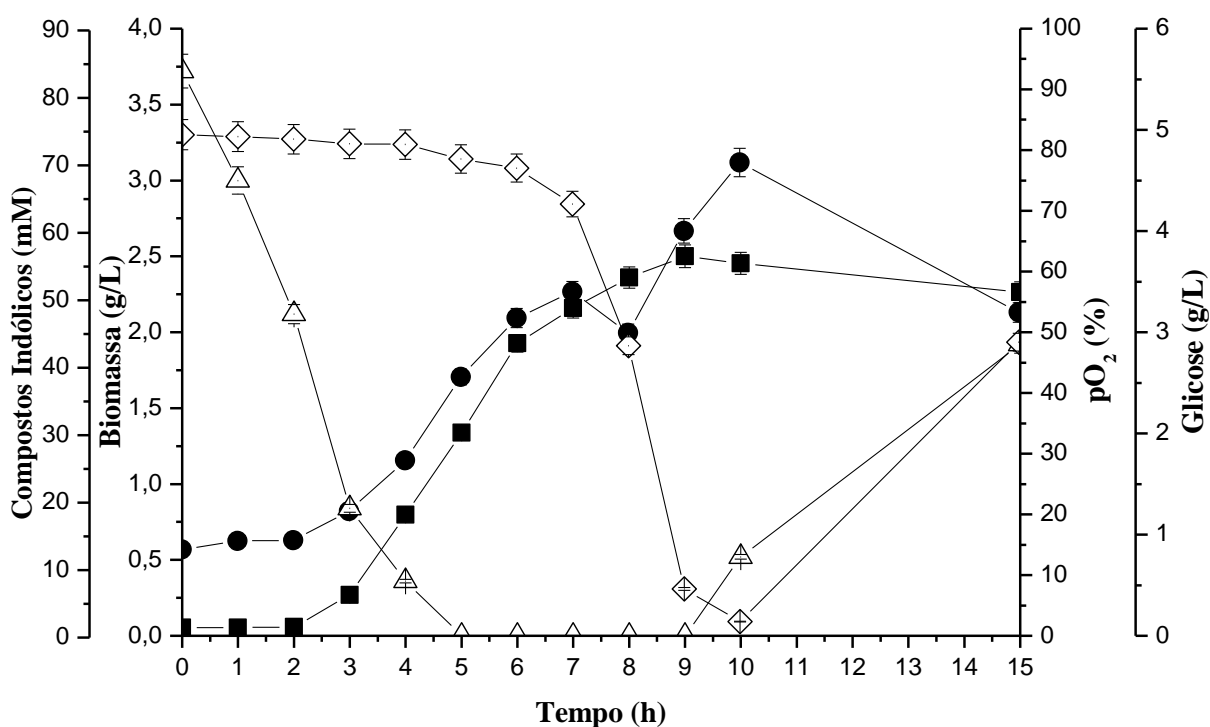


Figura 4.17 – Evolução das concentrações de Compostos Indólicos (●), Biomassa (■), pO₂ (△) e Glicose (◇) para o ensaio DCCR 13.

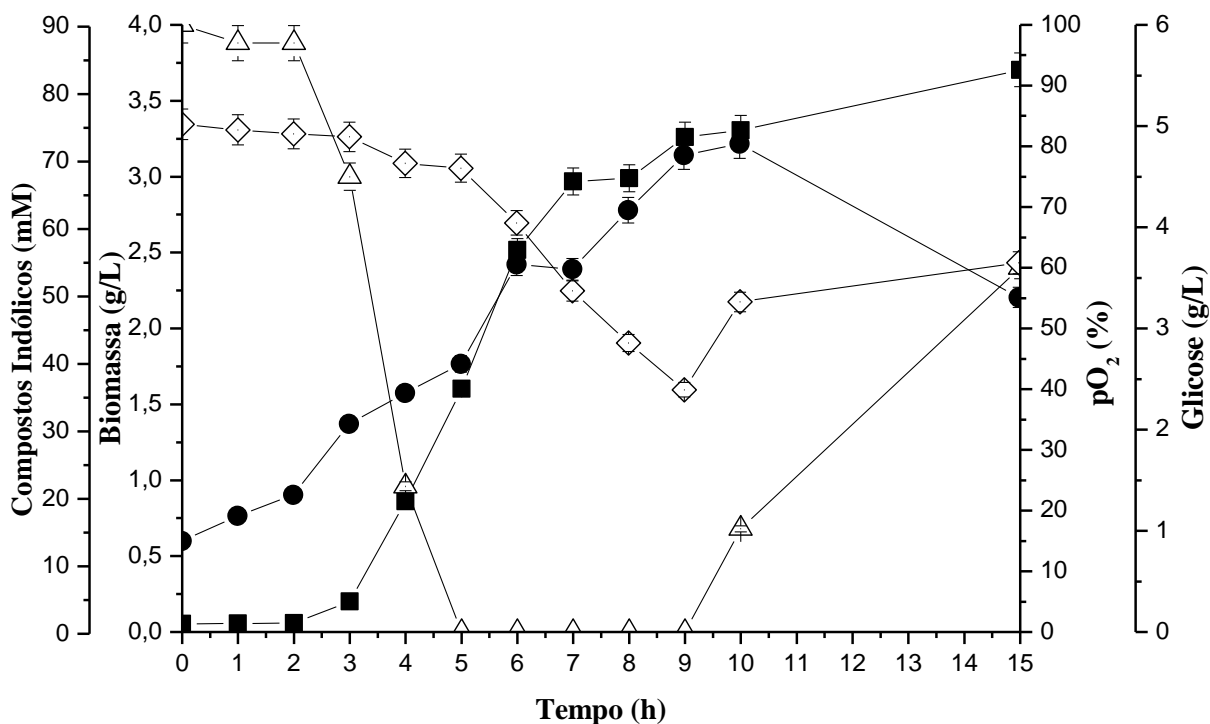


Figura 4.18 – Evolução das concentrações de Compostos Indólicos (●), Biomassa (■), pO₂ (△) e Glicose (◇) para o ensaio DCCR 14.

Fazendo-se a comparação entre os ensaios 15 (Figura 4.19), 16 (Figura 4.20) e 17 (Figura 4.21) foi observada a conformidade entre as curvas de produção de biomassa, principal resposta de interesse. Uma vez que foram obtidas para estes ensaios concentrações celulares de 1,810, 2,044 e 1,926 g/L, respectivamente, estes valores demonstram uma boa repetibilidade do bioprocesso para esta resposta. No entanto, os outros parâmetros avaliados apresentaram divergências. Contrariando o comportamento das demais réplicas, o ensaio 17 apresentou uma fase *lag* de três horas, provocando o aumento de aproximadamente 64% no tempo de finalização da fase de crescimento exponencial e, conseqüentemente, do tempo de batelada.

No ensaio 17, o nível de oxigênio dissolvido atingiu um valor muito baixo (5%), porém não chegando a 0%. Além disso, apresentou o menor fator de conversão de substrato em biomassa deste grupo ($Y_{X/S} = 0,376$ contra $Y_{X/S} = 0,653$ do ensaio 15 e $Y_{X/S} = 0,767$ do ensaio 16, Tabela 4.16) devido ao consumo quase total da glicose disponível no sistema na nona hora. O microrganismo foi capaz de consumir apenas aproximadamente 50% do substrato no ensaio 15 e aproximadamente 70% no ensaio 16.

Verificou-se neste grupo a produção de compostos indólicos principalmente durante a fase de crescimento exponencial, porém as quantidades produzidas de 37,451 mM, 85,686 mM e 66,471 mM nos ensaios 15, 16 e 17, respectivamente, não obedeceram a um padrão de produção uniforme como o da biomassa conforme se era esperado.

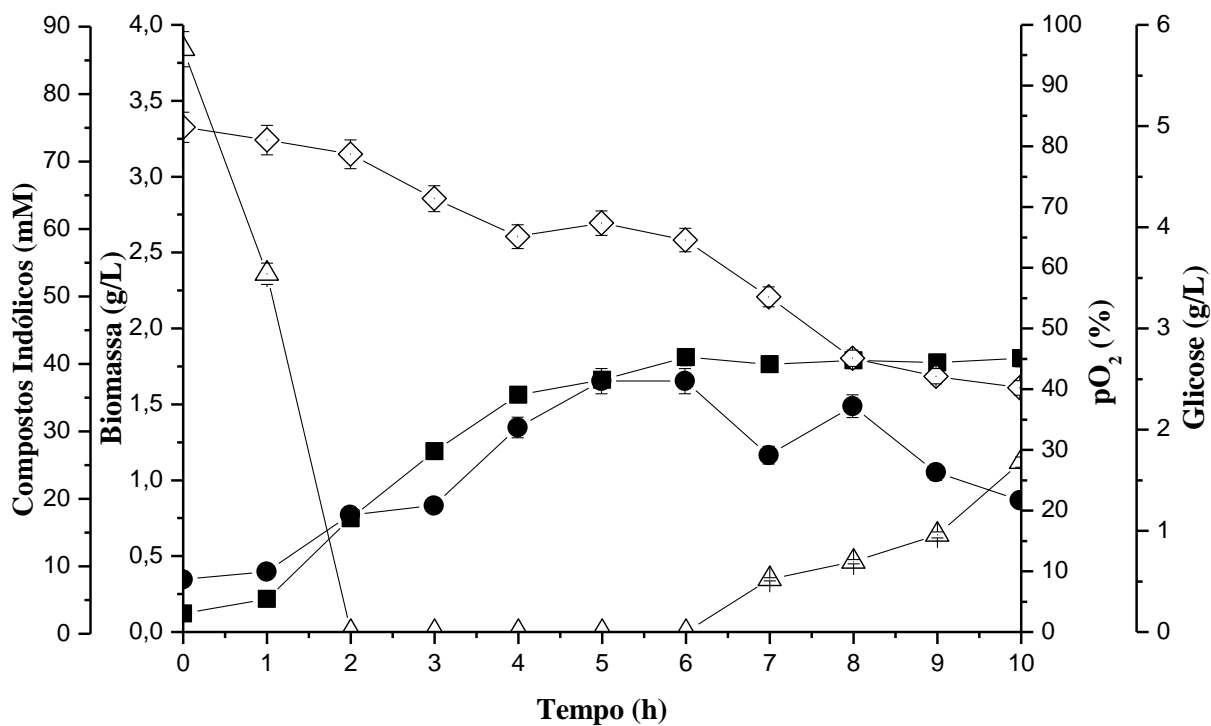


Figura 4.19 – Evolução das concentrações de Compostos Indólicos (●), Biomassa (■), pO₂ (△) e Glicose (◇) para o ensaio DCCR 15.

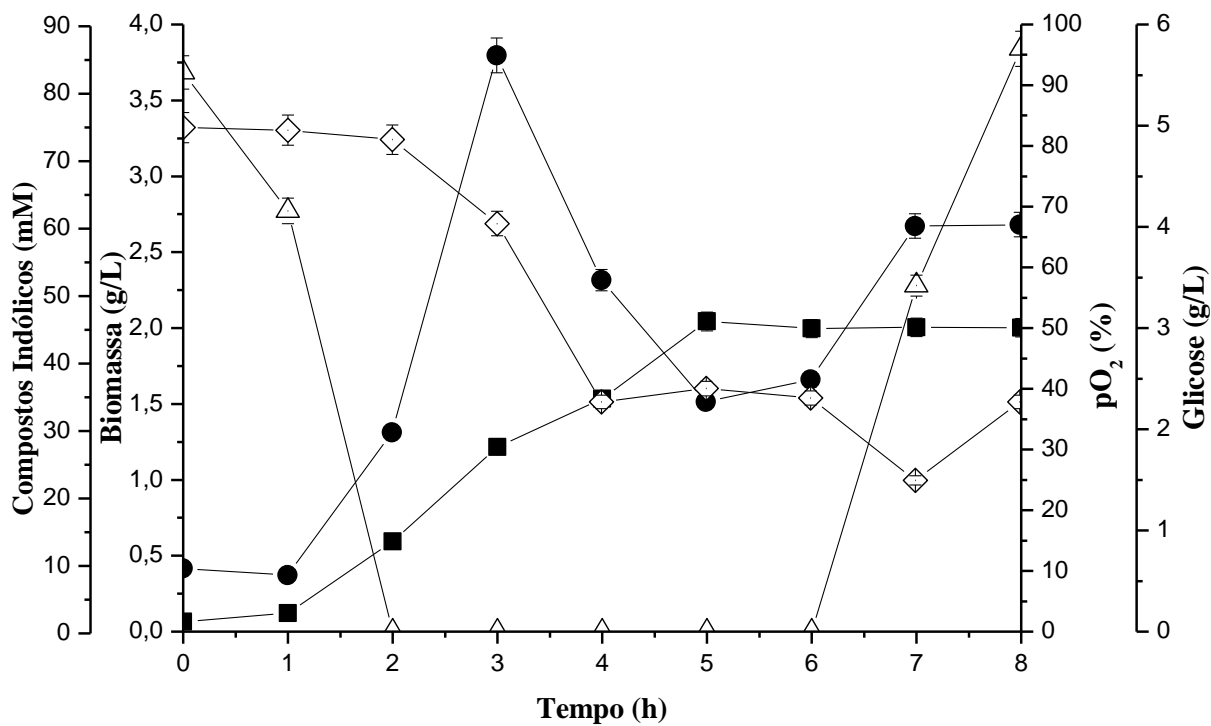


Figura 4.20 – Evolução das concentrações de Compostos Indólicos (●), Biomassa (■), pO₂ (△) e Glicose (◇) para o ensaio DCCR 16.

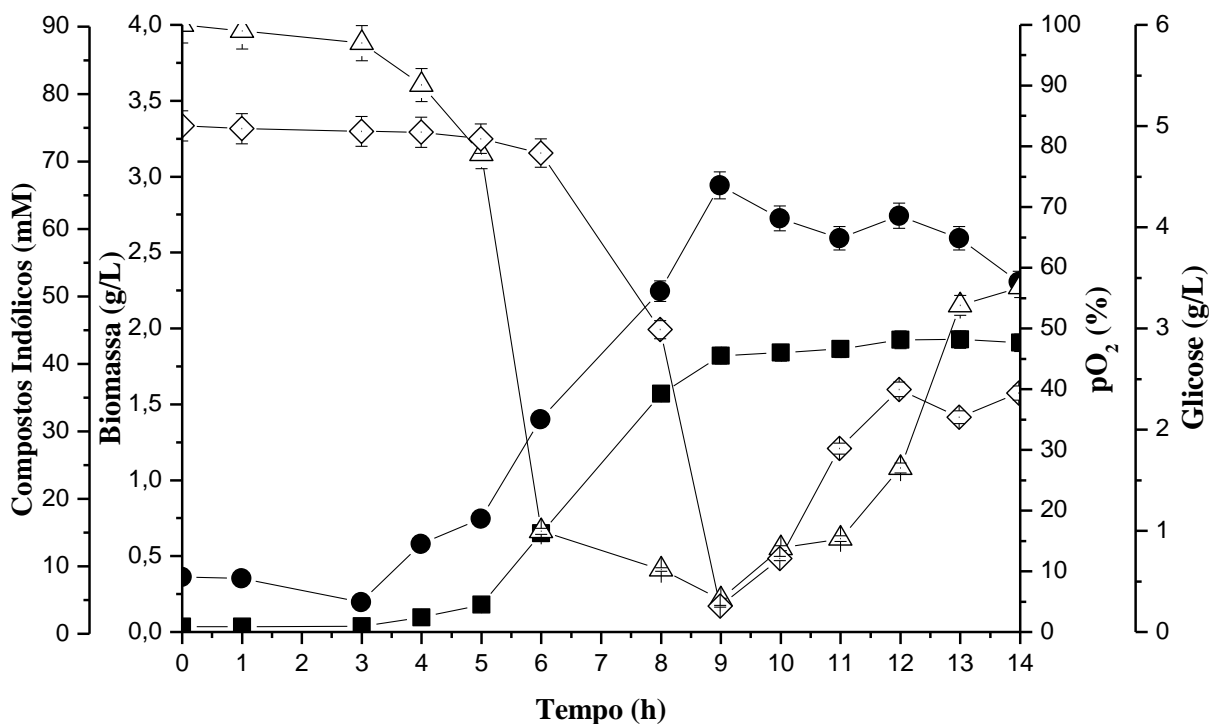


Figura 4.21 – Evolução das concentrações de Compostos Indólicos (●), Biomassa (■), pO₂ (△) e Glicose (◇) para o ensaio DCCR 17.

4.3.2 Observações gerais

A temperatura, variável avaliada nos tratamentos do DCCR, apresentou pouca influência sobre a biomassa produzida. Este fato pode ser observado quando se fez a comparação entre ensaios que em sua configuração só foram alterados os níveis da temperatura, por exemplo: Os ensaios 1 e 5, 2 e 6, 3 e 7, e 4 e 8 apresentam as mesmas condições de aeração e agitação tendo como item diferenciador a temperatura. Assim, pode-se perceber que houve pouca distinção entre os valores de biomassa obtidos nestes pares de ensaios: 1,671 e 1,749; 2,833 e 2,452; 3,166 e 2,960; 2,852 e 2,766 g/L, respectivamente. Os fatores de rendimento para os ensaios do DCCR estão descritos na Tabela 4.16.

Por outro lado, a temperatura apresentou forte influência sobre densidade e a coloração do caldo fermentado uma vez que nos ensaios em nível -1 foram observados sistemas menos densos e de colorações mais claras, enquanto os ensaios em nível +1 apresentaram-se mais densos e escuros.

Verificou-se nos ensaios 2, 3, 6, 7, 8, 10, e 14 o aparecimento de uma segunda fase de crescimento exponencial. Em todos os casos este fenômeno foi precedido por uma notável alteração na curva de consumo de glicose. Essas alterações foram caracterizadas pela formação de metabólitos redutores detectados juntamente com a glicose pelo método DNS, portanto, assim que a fonte de carbono atingiu a concentração mínima, seja ela próxima 0 g/L ou não, a curva de DNS iniciava uma nova crescente. Provavelmente estes metabólitos foram responsáveis pelo incremento na produção de biomassa formada a partir desta nova etapa de crescimento.

De acordo com Goebel & Krieg, (1984), os produtos finais do cultivo deste microrganismo, além de CO_2 e H_2O , compreendem compostos como ácidos orgânicos, principalmente acético, lático, glioxálico, málico, 2-oxoglutarico e β -hidroxibutírico, que podem ser utilizados como fontes de carbono secundárias ou até mesmo como precursores de reservas energéticas acumuladas pelas células bacterianas. Estes ácidos são formados em quantidades reduzidas, que conseqüentemente decrescem o pH e não apresentaram efeito inibidor no metabolismo bacteriano.

A presença de corpos internos visualmente evidentes ao microscópio de contraste de fase sugere a presença de grânulos de acumulação semelhantes aos grânulos internos de polihidroxibutirato (PHB), reportada por Del Gallo & Fendrik, (1994), sendo intensamente notada em todos os ensaios do DCCR e pode ser observada na Figura 4.22.



Figura 4.22 – Formação de grânulos de acumulação (possivelmente PHB) em células de *Azospirillum amazonense* (Ensaio DCCR n°06).

O período de transição entre a fase de crescimento exponencial e a fase estacionária ou ainda a segunda fase de crescimento (quando foi o caso) foi caracterizada por uma mudança fisiológica do microrganismo, de tal forma que os metabólitos ácidos responsáveis pela queda do pH do meio foram consumidos ou deixaram ser produzidos, fazendo com que o sistema tendesse a ter seu valor de pH aumentado. Foi possível fazer esta constatação analisando as curvas de bombas de controle de pH (Figura 4.23). Esta figura descreve a evolução da adição de ácido, base e anti-espumante do ensaio 6 (utilizado como modelo por apresentar o perfil de fermentação mais completo). Pode-se observar a intensa adição de base até $t = 3$ h, momento em que se termina a fase de crescimento exponencial, evidenciando a tendência de queda do pH nesta fase.

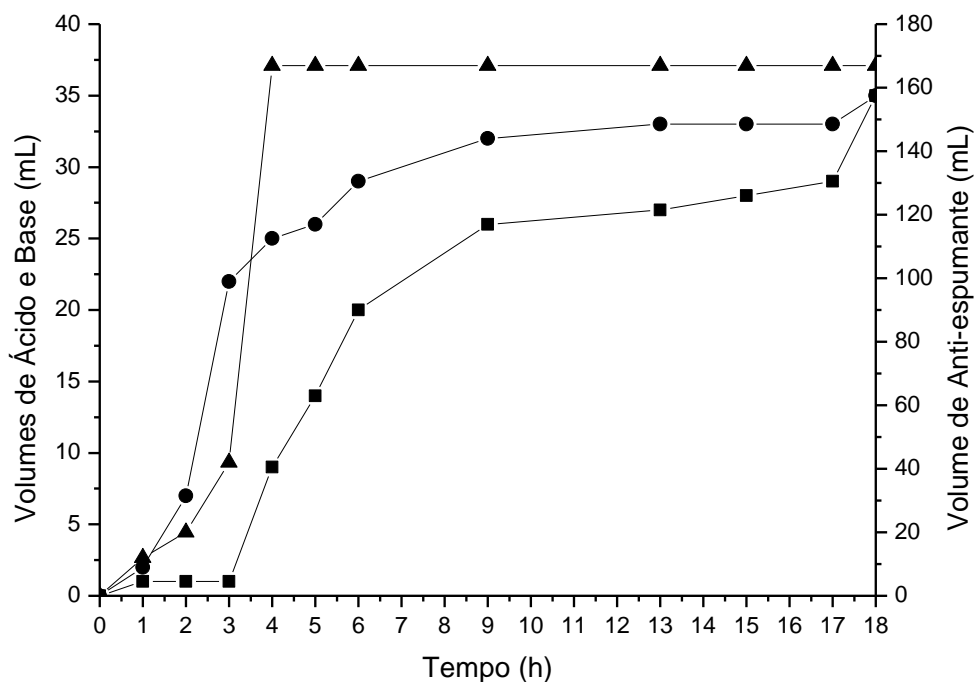


Figura 4.23 – Volumes de base (●), ácido (■) e anti-espumante (▲) adicionados ao sistema do ensaio DCCR n°06.

Todos os ensaios do planejamento apresentaram intensa formação de uma espuma, que dificultava momentaneamente o controle de pH uma vez que as soluções de controle ficavam retidas e demoravam a entrar em contato com o caldo fermentado.

Observando-se as variações de oxigênio dissolvido no sistema, notou-se um mesmo padrão de comportamento, ou seja, ao longo dos ensaios a concentração de oxigênio, que era inicialmente de aproximadamente 100%, tendia a decrescer a 0% de saturação, permanecendo assim até o fim da primeira fase de crescimento exponencial. A partir daí as bactérias não tendo mais o que oxidar deixavam de demandar oxigênio, fazendo com que a concentração subisse de forma acentuada.

Este parâmetro poderá ser de grande utilidade no controle do processo descontínuo, indicando rapidamente o término do crescimento e evitando que o reator fique em operação com células em estado estacionário ou de declínio.

Tendo em vista que a taxa de respiração para adequar ao biorreator seja suficiente para atender às necessidades do crescimento da cultura microbiana, faz-se necessário conhecer a concentração crítica de O_2 dissolvido para *Azospirilla* em cultivo submerso. Tal & Okon (1985) concluíram que as bactérias do gênero *Azospirillum* desenvolvem-se em uma ampla faixa de oxigênio dissolvido.

Verificou-se, ainda, que a produção de compostos indólicos está diretamente relacionada à multiplicação celular, apresentado um bom potencial para ser definido como um parâmetro de controle de processo. A evolução das concentrações desta auxina segue o mesmo perfil de acompanhar proporcionalmente a curva de crescimento celular em todos os ensaios do DCCR durante a etapa exponencial de desenvolvimento. Este comportamento também foi observado por Hartmann *et al.* (1983), que verificaram que a produção de AIA em culturas puras de *A. brasilense* e *lipoferum* silvestres ocorreram durante a fase de crescimento exponencial, produzindo quantidades significativas principalmente quando crescidas em meio mineral suplementado com triptofano.

Tabela 4.16 – Produtividades, fatores de rendimento, velocidades máximas de crescimento e custos para os ensaios do Delineamento Composto Central Rotacional – DCCR.

Ensaio	Tempo (h)	X (g/L)	P _X (g/L.h)	Indol (mM)	P _P (mM.h ⁻¹)	Y _{X/S} (g/g)	Y _{P/X} (g/g)	Y _{P/S} (g/g)	μ _{x1}	μ _{x2}	Custo (R\$/g _{cel.})
1	7	1,670	0,229	57,255	7,647	0,333	5,847	1,949	0,916	-	1,01
2	23	2,833	0,121	73,725	2,830	0,857	4,087	3,502	0,994	0,047	0,59
3	14	3,166	0,221	70,196	1,359	0,758	1,077	0,827	0,932	0,080	0,53
4	20	2,853	0,140	35,972	1,000	0,802	1,253	1,006	1,137	-	0,59
5	5	1,654	0,317	43,611	7,528	0,356	4,157	1,480	1,117	-	0,96
6	12	2,467	0,200	39,444	1,667	0,590	1,459	0,861	1,424	0,119	0,70
7	12	2,960	0,242	58,472	2,211	0,599	1,602	0,961	1,533	0,181	0,57
8	11	2,742	0,244	53,750	2,096	1,105	1,508	1,666	1,580	0,166	0,61
9	13	2,764	0,212	36,389	1,677	0,882	1,386	1,222	1,006	-	0,61
10	11	2,640	0,234	42,083	3,384	0,561	2,533	1,420	1,386	0,157	0,64
11	18	2,759	0,149	60,276	1,265	0,688	1,484	1,021	1,178	0,127	0,61
12	18	3,140	0,170	73,750	3,349	0,618	3,445	2,129	1,347	-	0,54
13	9	2,500	0,272	70,417	5,247	0,545	3,381	1,842	1,509	-	0,67
14	15	3,703	0,243	70,639	2,407	2,667	4,624	4,624	1,454	-	0,45
15	6	1,810	0,281	37,451	4,902	1,516	3,051	4,624	1,230	-	0,93
16	5	2,044	0,396	85,686	5,255	0,767	2,326	1,785	1,587	-	0,82
17	13	1,926	0,146	66,471	3,952	0,657	4,757	3,125	1,277	-	0,87

4.3.3 Análise estatística para a resposta biomassa

Analisando-se o Diagrama de Pareto contendo efeitos estimados para as variáveis (Figura 4.24) para a resposta biomassa, a um grau de confiança de 90%, pode-se observar que os termos relacionados à temperatura não foram estatisticamente significativos. Tanto os termos quadráticos quanto os termos lineares e interações com a aeração e a agitação apresentaram valores de efeito abaixo da linha limite de significância cujo valor é $p = 0,1$.

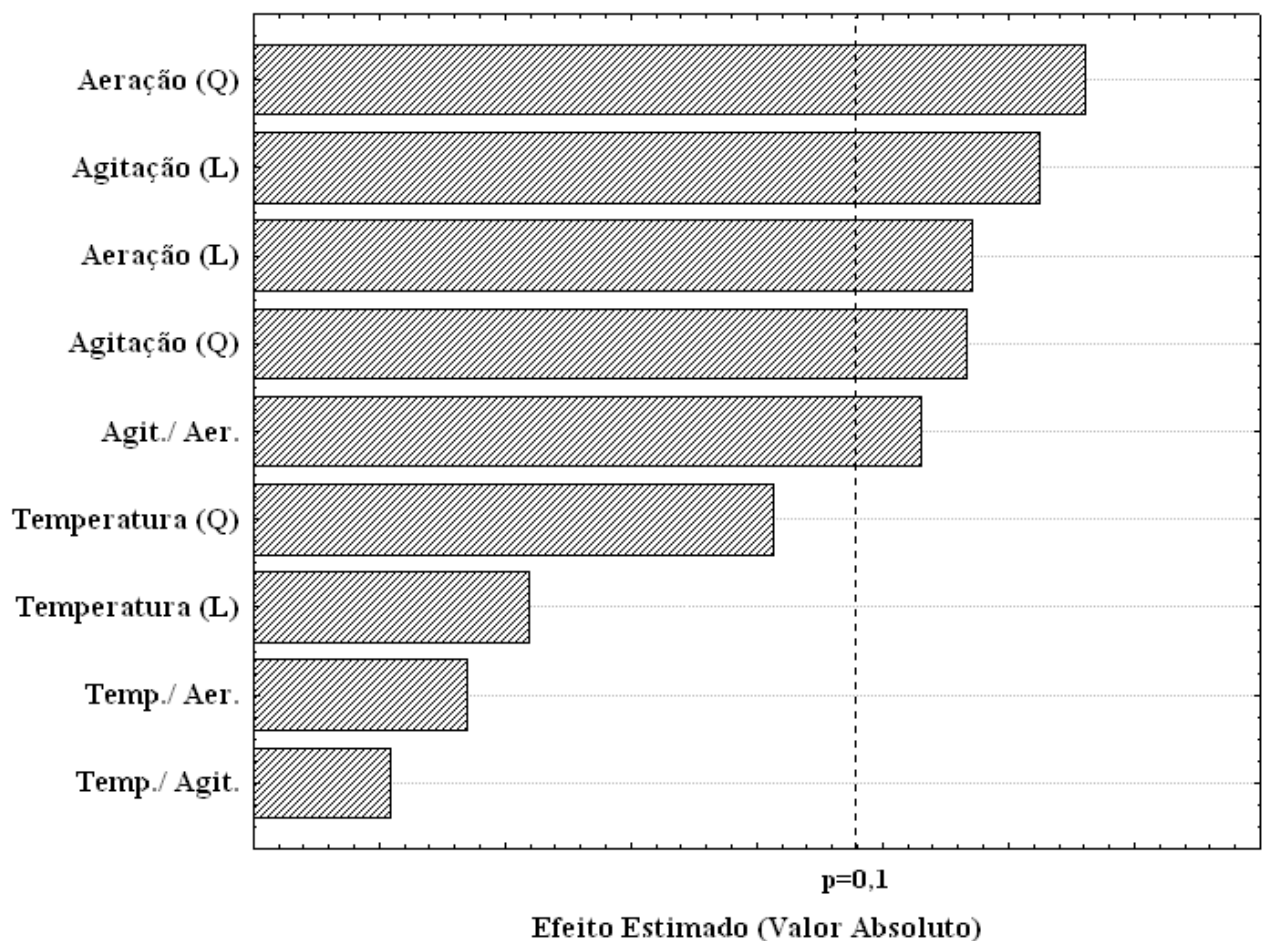


Figura 4.24 – Diagrama de Pareto com os valores dos efeitos para a biomassa.

A partir dos coeficientes de regressão disponíveis na Tabela 4.17, foi possível expressar o modelo matemático com as variáveis codificadas incluindo os parâmetros estatisticamente significativos a $p < 0,1$:

$$\text{Biomassa} = 1,955 + 0,272Ag + 0,245Ae + 0,267Ag^2 + 0,321Ae^2 - 0,292AgAe$$

Tabela 4.17 – Coeficientes de regressão para a variável biomassa.

Variável	Coef. de Regressão	Desvio Padrão	$t(7)$	Valor p
Média	1,955	0,221	8,843	0,000
Temperatura (L)	-0,062	0,104	-0,593	0,572
Temperatura (Q)	0,179	0,114	1,565	0,162
Agitação (L)	0,272	0,104	2,621	0,034
Agitação (Q)	0,267	0,114	2,331	0,053
Aeração (L)	0,245	0,104	2,357	0,051
Aeração (Q)	0,321	0,114	2,801	0,026
Temp./ Agit.	0,006	0,136	0,044	0,966
Temp./ Aer.	-0,047	0,136	-0,346	0,739
Agit./ Aer.	-0,292	0,136	-2,152	0,068

O cálculo da ANOVA (Tabela 4.18) apresenta uma variação explicada de 80,02% e um valor de $F_{calculado}$ altamente significativo e maior que o $F_{tabelado}$, o que evidencia a validade do modelo matemático proposto. A Figura 4.25 apresenta os resultados experimentais versus os resultados previstos pelo modelo ajustado, mostrando uma concordância entre os mesmos.

Tabela 4.18 – ANOVA para a variável biomassa.

	Soma de Quadrados (SQ)	Grau de Liberdade (GL)	Quadrado Médio (QM)	$F_{calc.}$	$F_{tab.}$
Regressão	3,700	5	0,740	5,57	2,45
Resíduo	1,461	11	0,133		
Total	5,161	16			

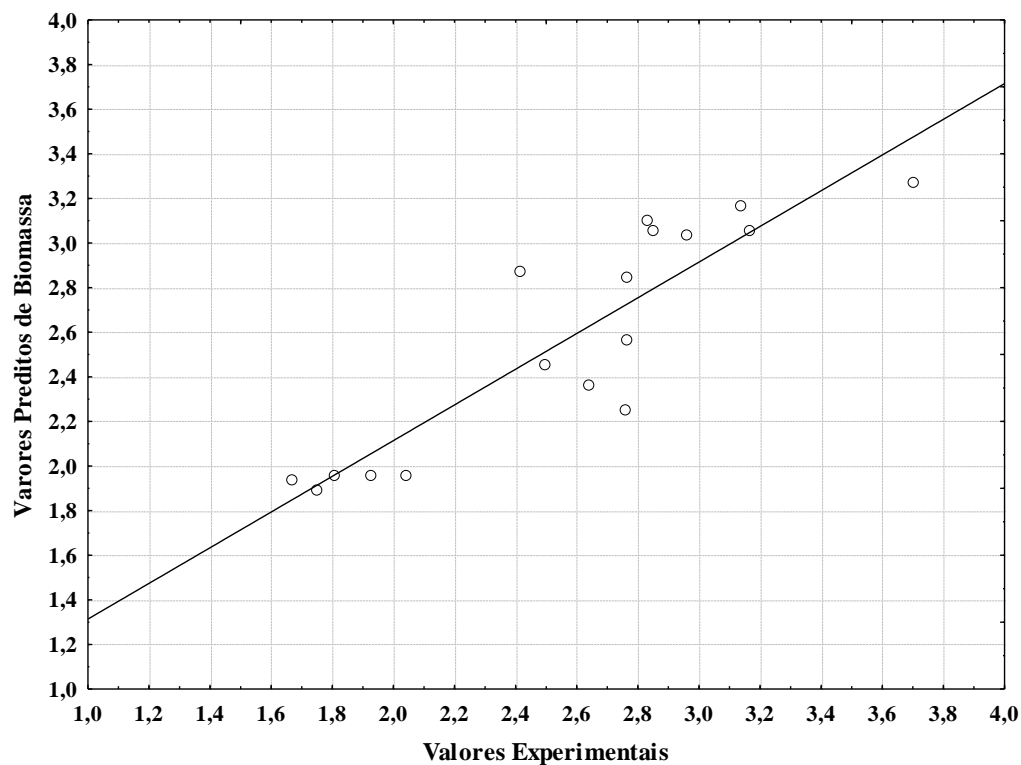


Figura 4.25 – Valores preditos versus valores experimentais para a biomassa.

Assim, foi possível construir as superfícies de resposta e curvas de contorno da biomassa em função da temperatura versus agitação (a) e (b), em função da temperatura versus aeração (c) e (d) e em função da aeração versus agitação (e) e (f). O resultado está apresentado na Figura 4.26.

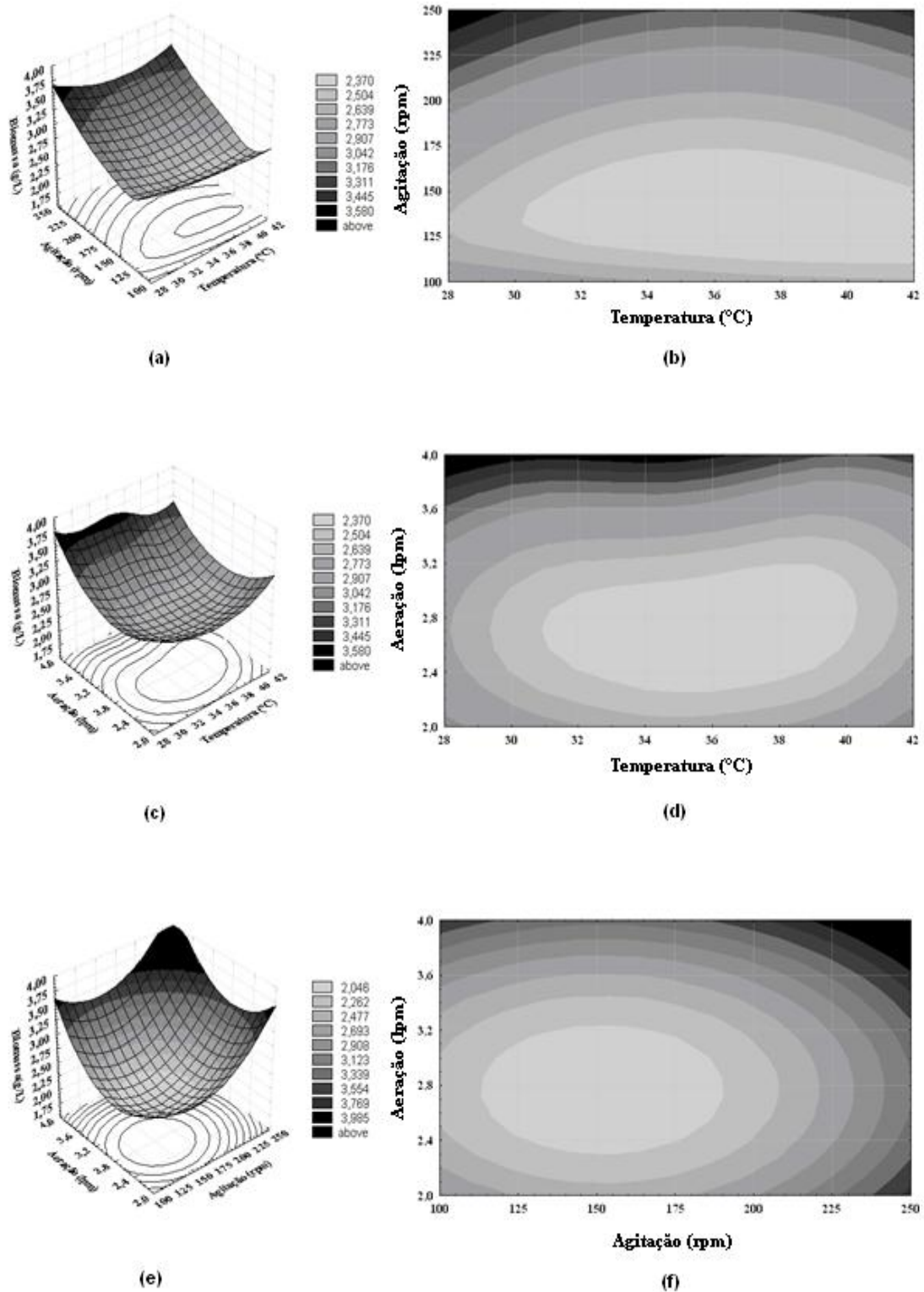


Figura 4.26 – Superfícies de resposta e curva de contorno para resposta biomassa em função da temperatura versus agitação (a) e (b), em função da temperatura versus aeração (c) e (d) e em função da aeração versus agitação (e) e (f).

Analisando os itens de (a) a (d) da Figura 4.26, foi possível visualizar que os maiores índices de formação de biomassa se deram em praticamente toda a faixa de temperatura analisada, fato este que justifica a não significância desta variável e sua baixa influência sobre a resposta em questão. Observou-se ainda a ocorrência destes altos índices de produção quando as condições de aeração e agitação foram máximas, 4,0 lpm e 250 rpm, respectivamente, evidenciando que o índice de oxigênio dissolvido no sistema foi um fator limitante para o crescimento celular. Porém, é importante salientar que as condições de aeração impostas pelo planejamento experimental DCCR 2³ contemplaram os limites, superior e inferior, do rotâmetro do equipamento biorreator disponível (Sartorius Biostat B-Plus) para a realização dos experimentos. As curvas (e) e (f) sintetizam as quatro curvas anteriores, corroborando as afirmações referentes à demanda por oxigênio pelo microrganismo.

4.3.4 Análise estatística para a resposta compostos indólicos

Pela avaliação do Diagrama de Pareto do parâmetro compostos indólicos (Figura 4.27) e dos coeficientes de regressão (

Tabela 4.19) constatou-se que apenas o termo quadrático da temperatura foi capaz de afetar a produção desta auxina dentro dos limites das variáveis estudadas.

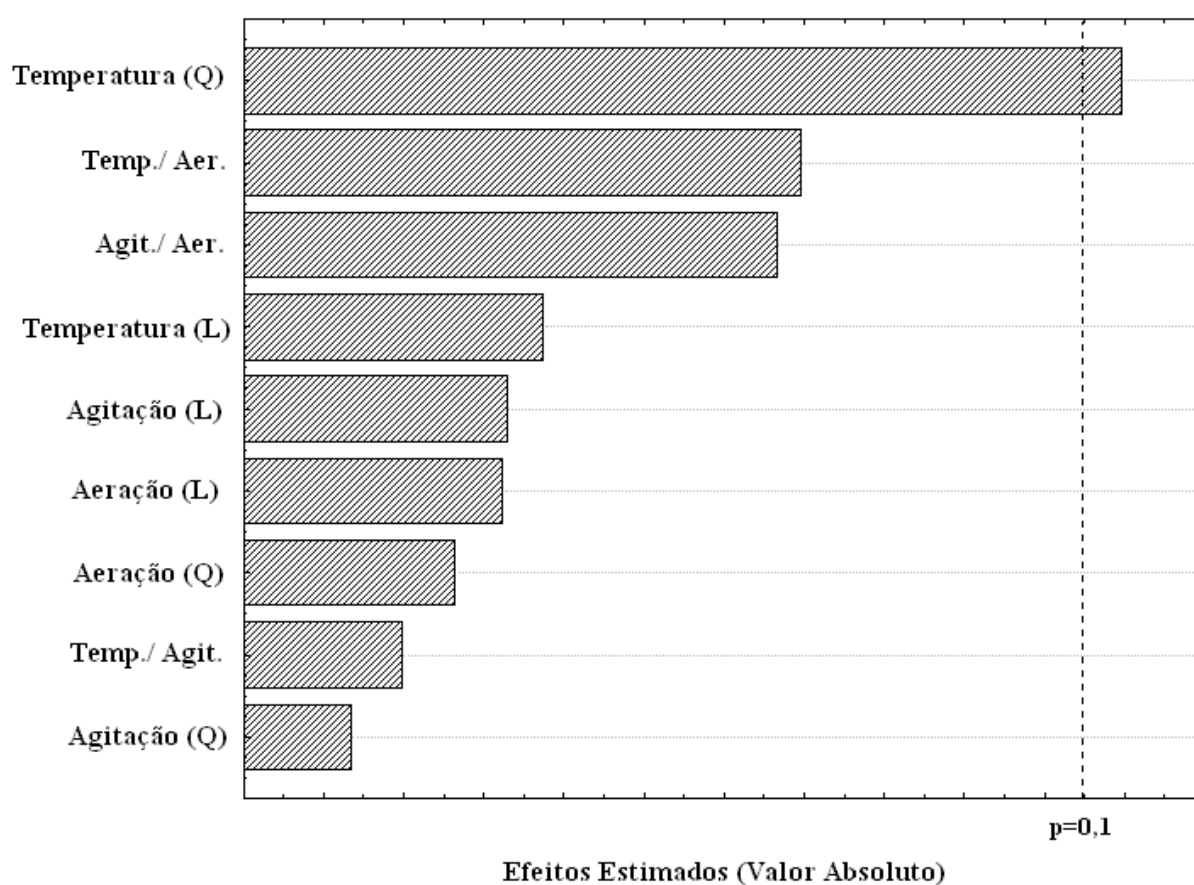


Figura 4.27 – Diagrama de Pareto com os valores dos efeitos para os Compostos Indólicos.

Tabela 4.19 – Coeficientes de regressão para a variável compostos indólicos.

Variável	Coef. de Regressão	Desvio Padrão	t(7)	Valor <i>p</i>
Média	63,510	9,233	6,879	0,000
Temperatura (L)	-2,368	4,338	-0,546	0,602
Temperatura (Q)	-9,519	4,780	-1,992	0,087
Agitação (L)	1,978	4,338	0,456	0,662
Agitação (Q)	0,323	4,780	0,068	0,948
Aeração (L)	-1,925	4,338	-0,444	0,671
Aeração (Q)	1,568	4,780	0,328	0,752
Temp./ Agit.	6,747	5,666	1,191	0,273
Temp./ Aer.	1,108	5,666	0,196	0,850
Agit./ Aer.	-6,406	5,666	-1,131	0,295

Considerando o modelo com as variáveis codificadas e os parâmetros estatisticamente significativos a $p < 0,1$, obteve-se:

$$CI = 63,510 - 9,519T^2$$

A ANOVA (Tabela 4.20) para a resposta compostos indólicos em função da variável temperatura mostra que os resultados não foram bem explicados pela regressão, uma vez que esta análise apresentou um $R^2 = 54,98\%$. Porém, obteve-se um valor de $F_{calculado}$ altamente significativo ($F_{calc} = 7,11$) e maior que o $F_{tab} = 3,07$, o que validou o modelo estatístico proposto.

Tabela 4.20 – ANOVA para a variável compostos indólicos.

	Soma de Quadrados (SQ)	Grau de Liberdade (GL)	Quadrado Médio (QM)	F_{calc}	F_{tab}
Regressão	1283,811	1	1283,811	7,11	3,07
Resíduo	2709,359	15	180,624		
Total	3993,170	16			

A Figura 4.28 mostra que vários pontos não se ajustam ao modelo, entretanto é possível verificar a tendência da produção dos compostos indólicos através das superfícies de resposta e das curvas de contorno apresentadas na Figura 4.29.

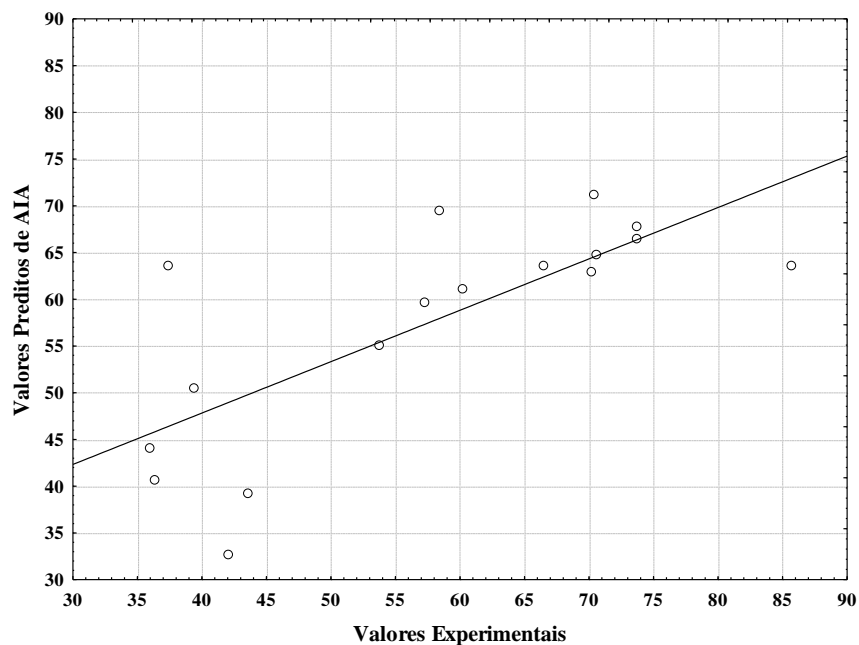


Figura 4.28 – Valores Preditos versus Valores Experimentais para os Compostos Indólicos.

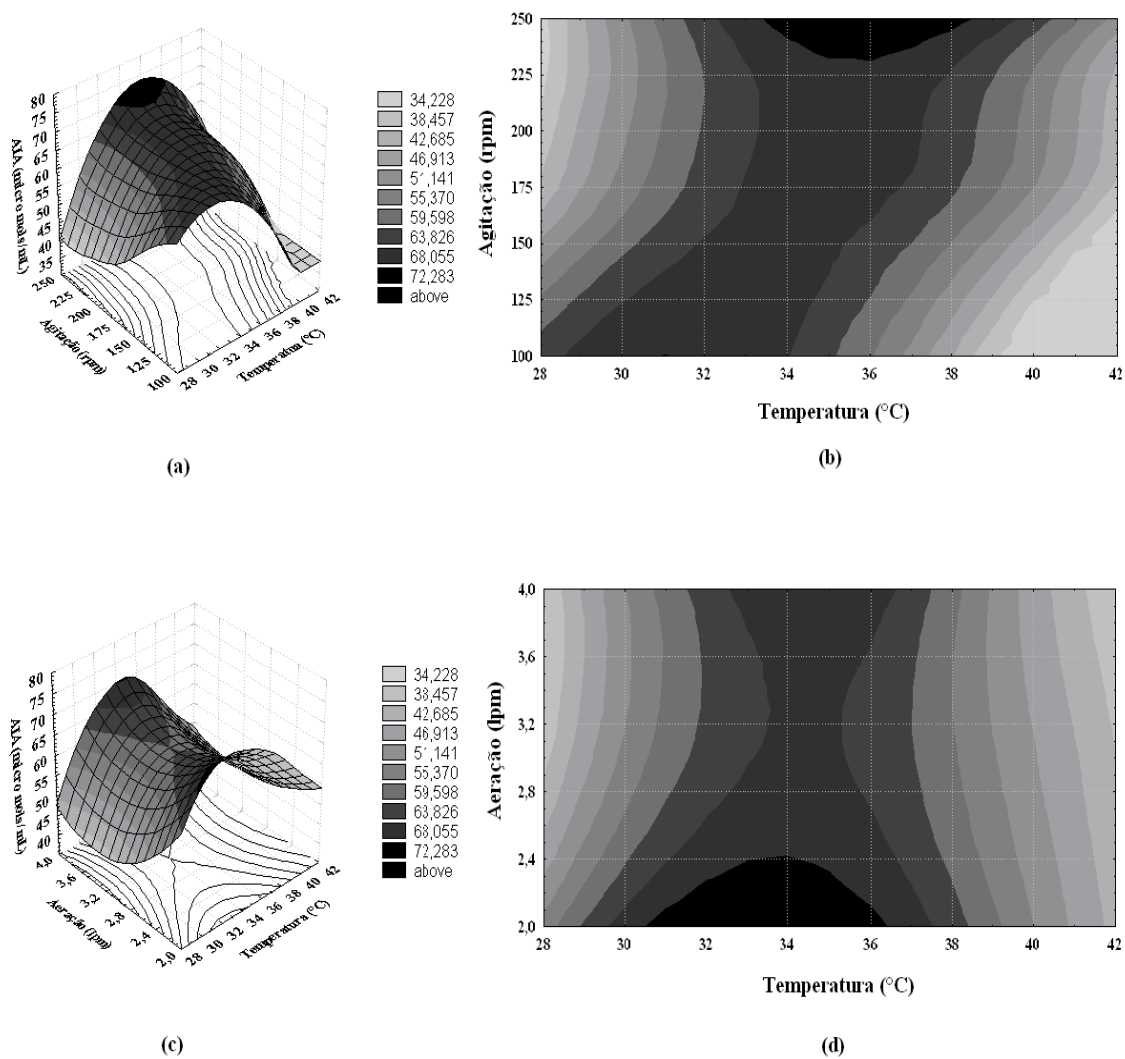


Figura 4.29 – Superfícies de resposta e curva de contorno para resposta compostos indólicos.

As superfícies de resposta de (a) e (b) evidenciaram que os melhores rendimentos de compostos indólicos tendem a se concentrar em um valor de temperatura em torno de 36°C aproximadamente, enquanto as superfícies (c) e (d) mostram este valor está em torno de 34°C. De modo geral, esta figura corrobora e proporciona a visualização da análise feita no item 5.3.1 deste capítulo, onde se afirmou que a os ensaios realizados nos níveis centrais de temperatura (35°C) apresentaram a maior produção média de auxinas.

4.4 Ensaio em Biorreator em Condições Otimizadas e com Substituição da Fonte de Carbono

4.4.1 Ensaio 1: Glicose 5,0 g/L

Com base nos resultados obtidos pela realização do planejamento experimental DCCR, foi proposta uma condição aperfeiçoada para o cultivo do *Azospirillum amazonense* que consistiu na fixação da temperatura na condição central de 35°C, impelindo uma agitação em nível axial positivo de 250 rpm e extrapolando o nível de aeração para 8,0 lpm, ou seja, o dobro do nível axial positivo para esta variável. Para isso foi necessário providenciar a ampliação da capacidade de aeração do biorreator trocando o rotâmetro com capacidade máxima de 4,0 lpm para um outro com capacidade de até 12 lpm.

O Ensaio 1 foi realizado nas condições citadas utilizando o meio aperfeiçoado e os resultado é apresentado na Figura 4.30. Neste ensaio foram obtidos 3,673 g/L de biomassa e 44,861 mM de compostos indólicos num tempo de batelada de 5h. Não foi detectada a formação de duas fases de crescimento exponencial nem momentos em que o sistema tenha ficado completamente sem oxigênio dissolvido, apresentando o valor mínimo de $pO_2 = 7,3\%$ em $t=3h$. Observou-se ainda que o microrganismo não foi capaz de consumir toda a glicose disponível tendo seu metabolismo finalizado ainda com aproximadamente 1g/L de glicose restante.

O valor de biomassa obtido foi muito próximo do encontrado no ensaio n°14 do planejamento DCCR (3,703 g/L), onde as condições de processamento só se diferiram pela maior aeração presente no ensaio 1. Apesar desta resposta não ter sido maximizada, ficou claro que a maior disponibilidade de oxigênio dissolvido proporcionou a aceleração do metabolismo celular e a consequente redução do tempo de batelada em 10h.

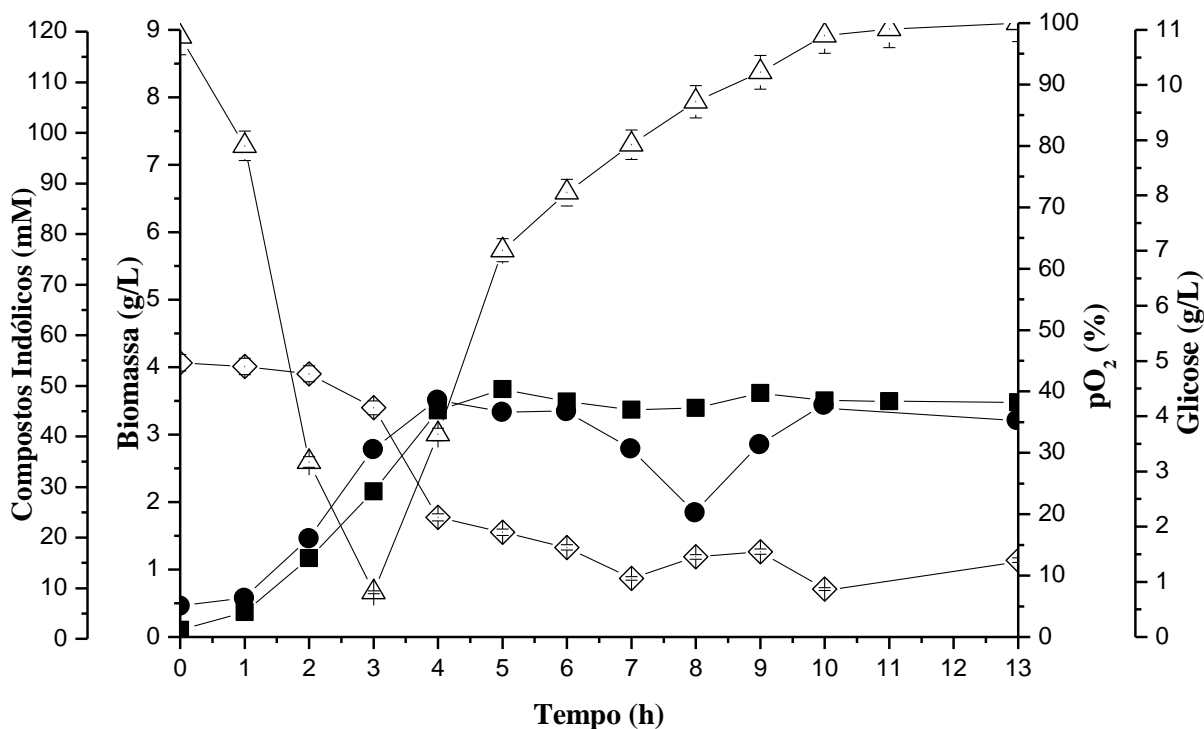


Figura 4.30 – Evolução das concentrações de compostos indólicos (●), biomassa (■), pO₂ (△) e glicose (◇) para o ensaio 1 em condições de processo otimizadas.

O ensaio 1 apresentou fatores de conversão de $Y_{X/S} = 1,161$, $Y_{P/X} = 10,332$ e $Y_{P/S} = 12,479$, conforme apresentado na Tabela 4.21. A formação dos compostos redutores observados no DCCR 14 (discutida no item 4.3.1) impediu a comparação dos seus fatores de rendimento com os do ensaio 1, pois o aumento na concentração final da fonte de carbono (DCCR 14) elevou os valores das conversões deste cultivo os tornando superestimados a partir de $t = 9h$.

4.4.2 Ensaio 2: Glicose 10,0 g/L

A fim de se maximizar a quantidade de biomassa produzida foi feito um incremento na quantidade de substrato, realizando-se cultivos com concentrações de 10,0 g/L das fontes de carbono: glicose, glicerol e sacarose. Dias (1988), estudou diferentes concentrações de substrato para o cultivo de *Azospirillum sp* e concluiu que para meios de cultura com 1,0 g/L de extrato de levedura, concentrações iniciais de substratos maiores que 11,5 g/L não seriam vantajosas, pois não aumentariam os fatores de conversão nem a produtividade celular.

Para o ensaio 2 de cultivo em glicose (Figura 4.31) obteve-se uma produção total de 5,737 g/L de biomassa em 18 horas de fermentação a uma produtividade $P_X = 0,315$ g/L.h. e $\mu_{max} = 1,253$ (Tabela 4.21). Assim como alguns ensaios do DCCR citados no item 4.3.1, houve a formação da segunda fase de crescimento exponencial, que foi responsável pela elevação da concentração de biomassa e que na quinta hora de batelada alcançou o valor de 3,271 g/L, até atingir o seu valor final, totalizando um incremento de aproximados 43%.

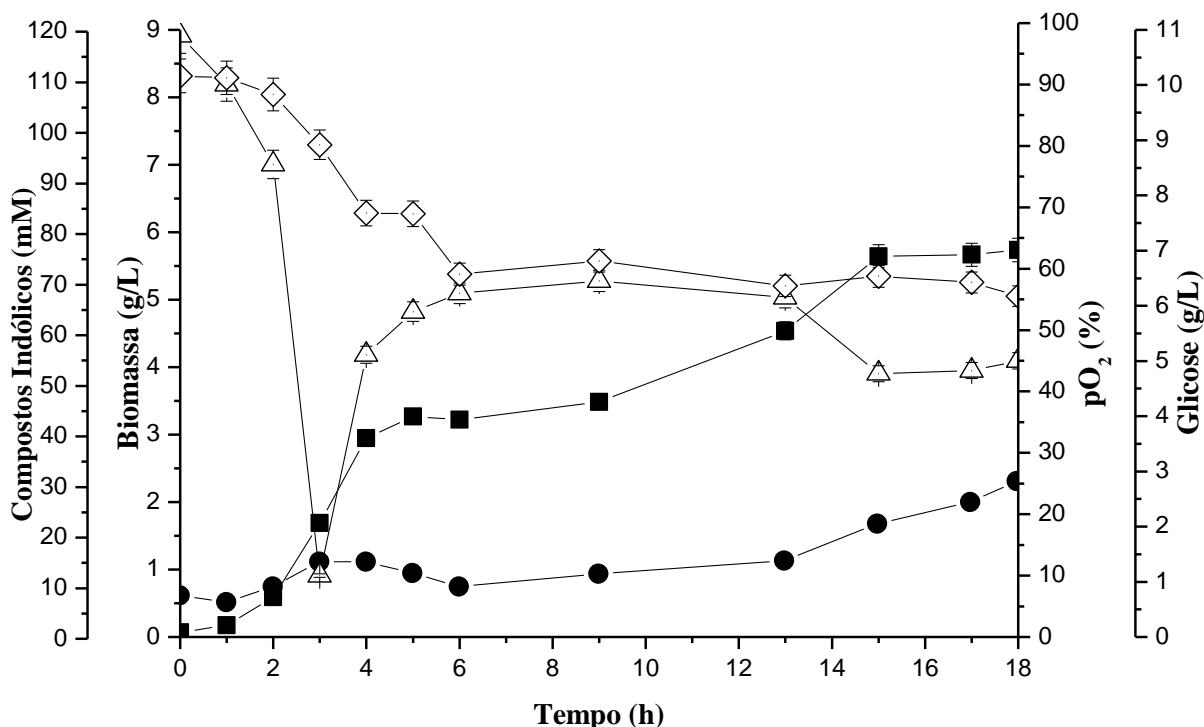


Figura 4.31 – Evolução das concentrações de compostos indólicos (●), biomassa (■), pO₂ (△) e glicose (◇) para o ensaio 2 em condições de processo otimizadas.

Repetindo o comportamento apresentado do ensaio realizado a 5,0 g/L, o microrganismo não ficou totalmente sem oxigênio dissolvido (pO_2 mínimo = 10%) e não foi capaz de metabolizar toda a glicose, consumindo apenas 4 das 10 g disponível no sistema. A produção de compostos indólicos foi de 31,79 mM a uma produtividade $P_p = 1,257 \text{ mM} \cdot \text{h}^{-1}$, apresentando uma redução significativa destes parâmetros em relação ao DCCR 14 (44,861 e 7,667, respectivamente). Neste ensaio também foi notada a formação de grânulos de acúmulo (provavelmente PHB) semelhantes aos encontrados no experimento DCCR, ilustrados na Figura 4.22.

4.4.3 Ensaio 3: Glicerol 10,0 g/L

No ensaio 3 foi realizado o cultivo do microrganismo utilizando glicerol. Em *Azospirillum sp.*, esta fonte de carbono é catabolizada através da segunda etapa da via glicolítica, após a transformação em gliceraldeído-3-fosfato (GAP) a partir da desidrogenação e subsequente fosforilação, ou invertendo a ordem com a fosforilação seguida pela desidrogenação com a subsequente ativação do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (Figura 4.32). A formação da di-hidroxiacetona-3-fosfato requer 1 mol de ATP, qualquer que seja o caminho. Para a formação de frutose-6-fosfato são necessárias duas trioses fosforiladas (2 moles de ATP) e na posterior transformação a frutose-6-fosfato, um mol de ATP é regenerado, com um balanço total de 1 mol de ATP gasto por mol G6P formado.

consumo completo do glicerol, portanto sugere-se que o fim deste processo tenha acontecido pelo esgotamento do substrato.

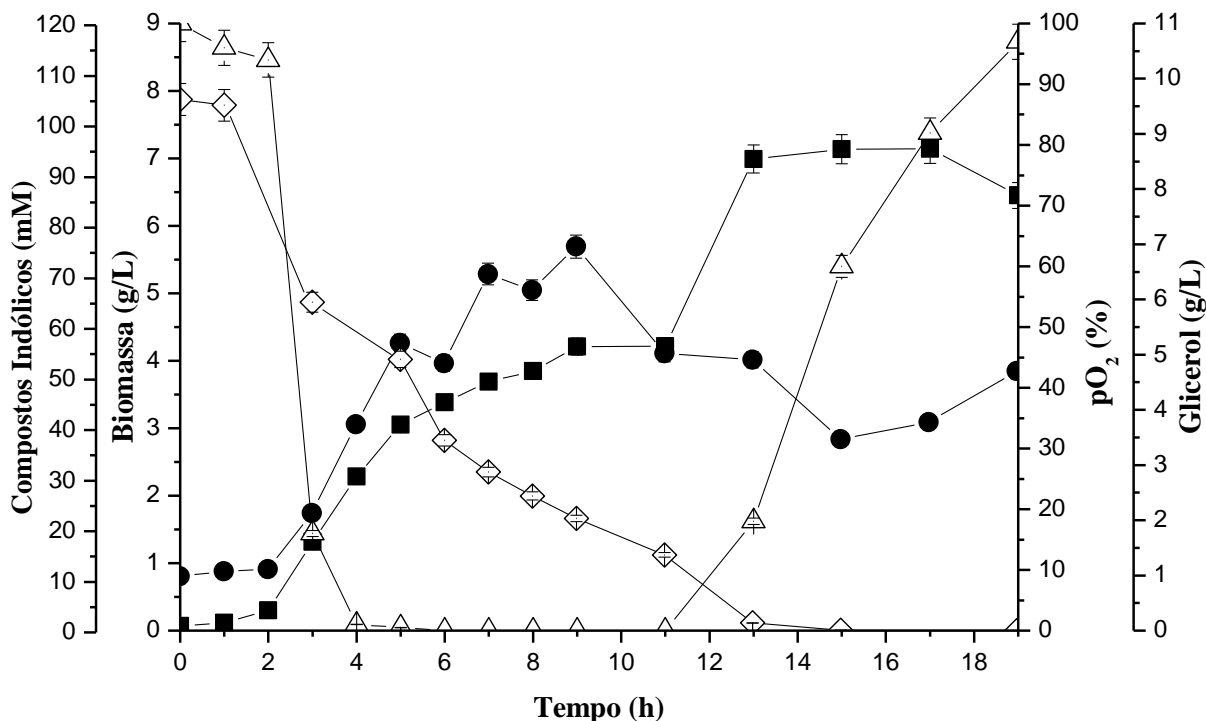


Figura 4.33 – Evolução das concentrações de compostos indólicos (●), biomassa (■), pO₂ (△) e glicerol (◇) para o ensaio 3 em condições de processo otimizadas.

Neste ensaio, o oxigênio dissolvido foi um fator limitante para o metabolismo celular, apresentando uma queda brusca de pO₂ = 94% em $t = 2h$ para pO₂ = 16% em $t = 3h$ e permanecendo zerado até a 11ª hora. Esse período de baixo pO₂ estimulou a possivelmente formação dos grânulos de PHB, detectados nas células deste cultivo e apresentados na Figura 4.34. Diferentemente dos grânulos visualizados no cultivo com glicose, estes são menores, porém mais numerosos e se encontram espalhados em toda a extensão celular.

Foram calculadas as velocidades específicas máximas de crescimento celular e, como se observa, foram obtidas duas fases de crescimento exponencial, com valores de $\mu_{x1} = 1,482$ e $\mu_{x2} = 0,109$ (Tabela 4.21), corroborando o resultado observado por Dias (1988). Este autor concluiu que o aparecimento de duas fases de crescimento nos cultivos de *A. brasilense* sp 245 em glicerol e extrato de levedura não era devido à diauxia, mas devia-se ao consumo preferencial de compostos nitrogenados presentes no extrato de levedura. Realizando seu experimento em biorreator com meio glicerol a 10,30 g/L e numa temperatura de 36°C, Dias (1988) obteve uma concentração de biomassa $X = 4,37$ g/L em 18h de batelada a $P_X = 0,23$ e $Y_{X/S} = 0,42$.

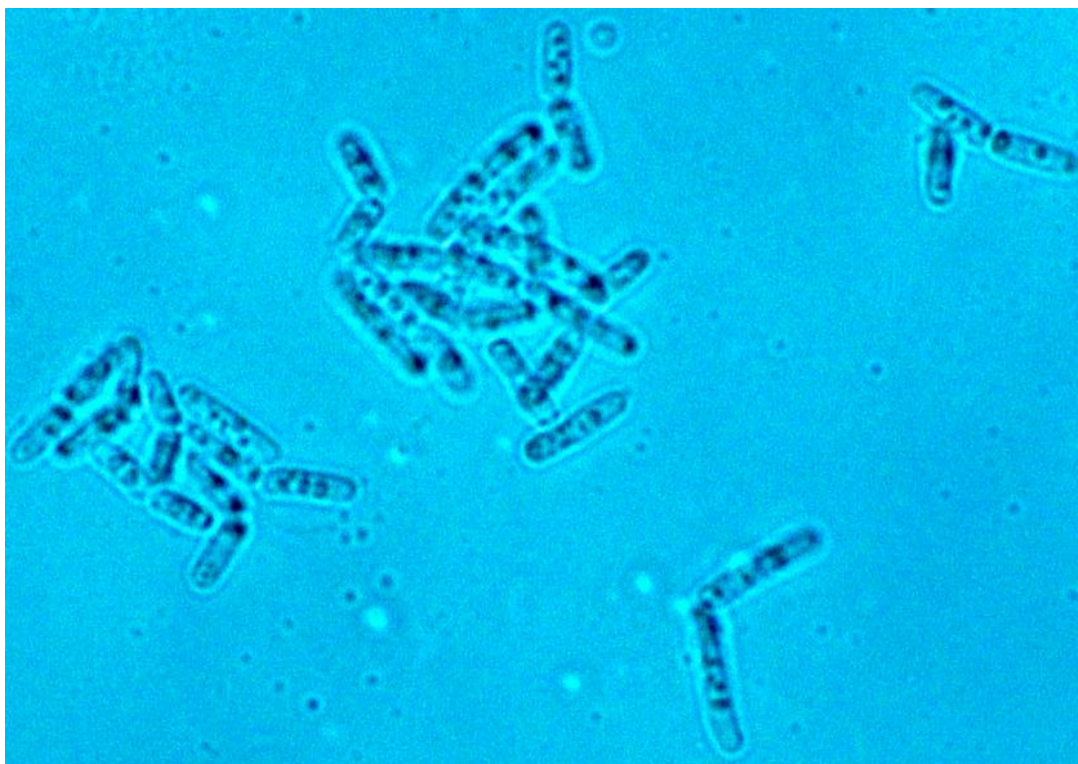


Figura 4.34 – Formação de grânulos de PHB em células de *Azospirillum amazonense* (Ensaio3 - Glicerol).

Silva (2006), realizou o crescimento de *A. brasilense* sp 7 e *A. lipoferum* BR17 a 30°C utilizando concentrações iniciais de glicerol de 5,7 g/L e 5,2 g/L, respectivamente. Para *A. brasilense* foram obtidos $X = 4,04$ g/L e $Y_{X/S} = 0,69$, enquanto para o *A. lipoferum* obteve-se $X = 2,56$ g/L e $Y_{X/S} = 0,46$.

4.4.4 Ensaio 4: Sacarose 10,0 g/L

O quarto e último ensaio do presente trabalho tratou-se do cultivo do *A. amazonense* em sacarose a 10,0 g/L e suas curvas cinéticas são apresentadas na Figura 4.35.

Supõe-se que para utilização de sacarose em *Azospirillum* sp, necessita-se de uma enzima que hidrolise as ligações α , β (1→2) da sacarose em glicose e frutose. Através da via Entner-Doudoroff (ED) estes açúcares são convertidos em piruvato. O piruvato é transformado em acetil CoA, que é totalmente oxidado no ciclo do ácido cítrico com a formação de duas moléculas de CO₂. Os elétrons oriundos da reoxidação do NADH em NAD⁺ em condições aeróbicas são transferidos para o oxigênio molecular para a síntese de ATP pela fosforilação oxidativa (SILVA, 2006).

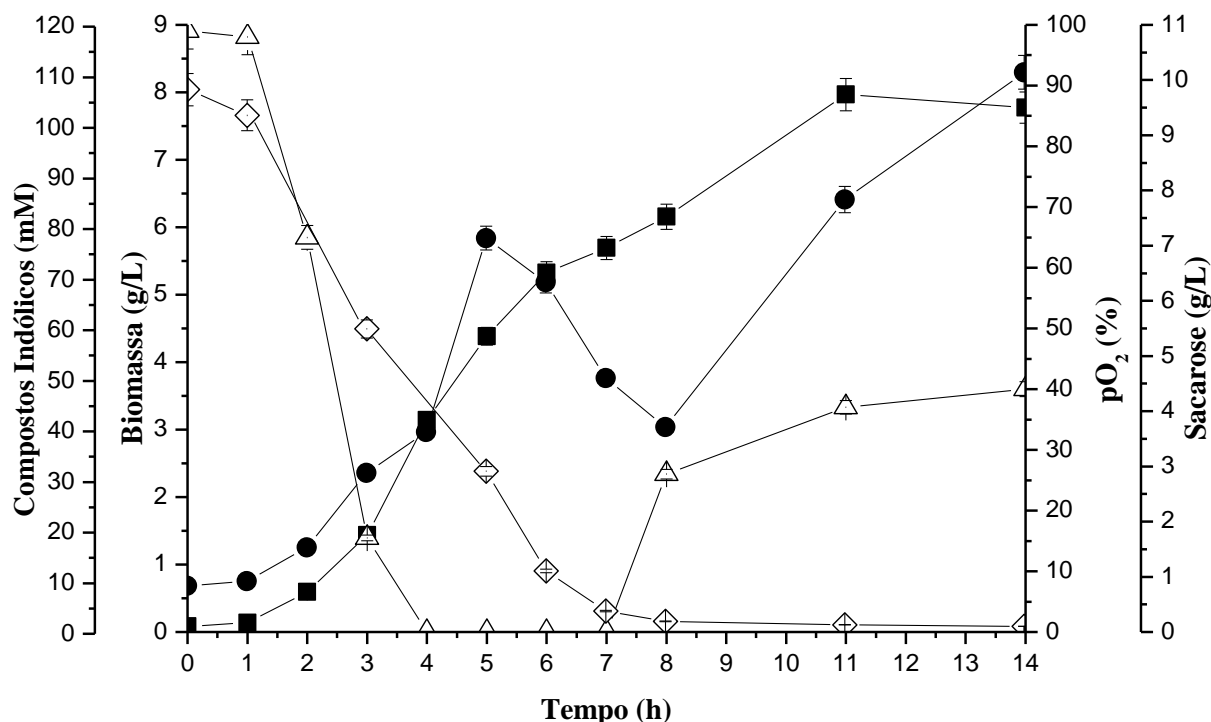


Figura 4.35 – Evolução das concentrações de compostos indólicos (●), biomassa (■), pO₂ (△) e sacarose (◇) para o ensaio 4 em condições de processo otimizadas.

Inicialmente acreditava-se que frutose não seria metabolizada pelo *A. amazonense*, porém, a ausência de crescimento neste açúcar relatado por Magalhães *et al.* (1984) pode ser devido a diferenças na composições dos meios de cultura (MARTÍNEZ-DRETS *et al.*, 1985).

Neste ensaio foram obtidas as maiores produções de biomassa, $X = 7,966$ g/L, a uma produtividade $P_X = 0,717$ g/L.h. A produção de compostos indólicos foi de 85,833 mM a uma produtividade $P_P = 6,944$ mM.h⁻¹. O *A. amazonense* apresentou velocidade específica de crescimento $\mu_{max} = 1,472$ e tempo de batelada de 11h (Tabela 4.21).

Na 8ª hora de fermentação houve o esgotamento da sacarose. Pode-se observar a partir deste momento uma segunda elevação nos valores de biomassa produzido podendo indicar aí a formação da segunda fase de crescimento exponencial, porém não foram coletadas amostras no intervalo entre $t = 8$ e $t = 11$ h, o que impede a comprovação deste fato.

O oxigênio dissolvido foi um fator limitante para o metabolismo celular, apresentando uma queda brusca permanecendo zerado até a 7ª hora. Neste ensaio também foi notada a formação de grânulos, provavelmente de PHB, semelhantes aos encontrados nos cultivos em glicose descritos pela Figura 4.22.

Silva (2006) também estudou o crescimento em biorreator de *A. lipoferum* utilizando sacarose a 5,0g/L como fonte de carbono. Realizando o cultivo a 30°C obteve os seguintes resultados: $X = 2,2$ g/L, $P_X = 0,24$ g/L.h, $\mu_{max} = 0,35$ h⁻¹; $Y_{XS} = 0,41$ e $Y_{XN} = 1,35$.

Martínez-Drets *et al.* (1985) estudaram a absorção de glicose, sacarose, manitol, e 2-cetoglutarato por *A. amazonense* Y1. A evolução das concentrações destes açúcares com o tempo, a uma concentração externa de 106 μ M, é apresentada na Figura 4.36.

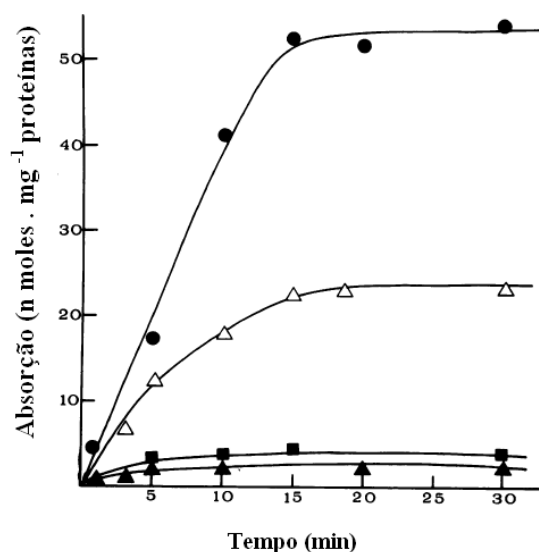


Figura 4.36 – Absorção de sacarose (●), glicose (△), manitol (■), e 2-cetoglutarato (▲) por *A. amazonense* Y1 cultivadas em AAM acrescido de sacarose, glicose, manitol e 2 - cetoglutarato, respectivamente. Três amostras foram colhidas para cada ponto. Adaptado de Martínez-Drets *et al.* (1985).

A absorção de sacarose foi rápida e atingiu o nível estacionário, o que foi equivalente a 73,5% da concentração externa após 15 minutos, enquanto a absorção de glicose atingiu o seu valor máximo, o que é equivalente a 33% da concentração externa, após 18 minutos. Estes resultados evidenciam a maior facilidade que este microrganismo possui para metabolizar a sacarose, o que pode justificar o total consumo deste açúcar no ensaio 4, apresentando o menor tempo de batelada assim como as maiores produções de biomassa e compostos indólicos. De acordo com Krieg (1984), a sacarose e outros dissacarídeos são os melhores substratos para o cultivo das estirpes de *A. amazonense*.

Tabela 4.21 – Rendimentos para os ensaios de substituição da fonte de carbono.

Ensaio	Tempo (h)	X (g/L)	P_x (g/L.h)	Indol. (mM)	P_p (mM.h ⁻¹)	$Y_{X/S}$	$Y_{P/X}$	$Y_{P/S}$	μ_{x1}	μ_{x2}
1 - Glicose 5g/L	5	3,673	0,713	44,861	7,667	1,161	10,332	12,479	1,253	-
2 - Glicose 10g/L	18	5,737	0,315	31,179	1,257	1,421	3,990	18,631	1,235	0,109
3 - Glicerol 10g/L	15	7,136	0,471	38,194	1,805	0,735	3,832	17,471	1,482	0,253
4 - Sacarose 10g/L	11	7,966	0,717	85,833	6,944	0,813	9,690	7,879	1,472	0,086

4.4.5 Análise de custos

Os ensaios de 1 a 4 permitiram ainda a estimativa dos custos de produção, apresentados na Tabela 4.22 e calculados levando em conta apenas o preço (Tabela 4.10) e a quantidade de matéria-prima total utilizada no preparo dos meios de cultura e as relativas quantidades de biomassa. O custo total de produção foi estimado através da seguinte relação:

$$C_{\text{Total}} = \frac{\text{Custo do Meio (R$. L}^{-1}\text{)}}{\text{Biomassa Produzida (g. L}^{-1}\text{)}}$$

Tabela 4.22 – Custos para os ensaios de substituição da fonte de carbono.

Ensaio	Fonte de Carbono	Extrato de Levedura	K ₂ HPO ₄	MgSO ₄	Custo do Meio (R\$/L _{Meio})	Biomassa (g _{Cel} /L _{Meio})	Custo (R\$/g _{cel})
1 - Glicose 5g/L	0,15	1,42	0,07	0,06	1,70	3,67	0,46
2 - Glicose 10g/L	0,30	1,42	0,07	0,06	1,85	5,74	0,32
3 - Glicerol 10g/L	0,73	1,42	0,07	0,06	2,27	7,14	0,32
4 - Sacarose 10g/L	1,00	1,42	0,07	0,06	2,55	7,97	0,32

Como se pode observar, o custo da fonte de carbono foi o item diferenciador dos preços do meio de cultura, tendo os meios compostos por glicose apresentado o menor custo, R\$1,70 e R\$ 1,85, para 5,0 e 10,0 g/L, respectivamente. Contudo, as produções inferiores de biomassa fizeram com que o ensaio 1 fosse o mais oneroso e com que o ensaio 2 se igualasse aos demais.

Os ensaios realizados a 10,0 g/L de fonte de carbono apresentaram o mesmo custo de produção, o que indica a produtividade como fator decisivo para a escolha do substrato. Apesar de requerer o maior investimento inicial, de R\$ 2,55 por litro de meio, a sacarose propiciou um melhor desempenho para o bioprocessamento tanto na produção de biomassa o quanto na produção de compostos indólicos relatados ao longo deste trabalho. Sendo assim, recomenda-se esta fonte de carbono para o cultivo do *Azospirillum amazonense* na produção de inoculantes agrícolas em escala piloto.

5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

A partir dos experimentos e procedimentos analíticos realizados neste trabalho foi possível chegar às seguintes conclusões:

Aperfeiçoamento do meio de cultura

Por meio da realização dos ensaios dos planejamentos fatoriais fracionados (FF01, FF02, FF03 e FF04) foi possível simplificar o meio de cultura utilizado para a produção em larga escala de *Azospirillum amazonense*, alcançando uma redução do número de componentes de 7 (do meio DYGS original) para apenas 4 componentes nutricionais e monetariamente significativos para a produção de biomassa e compostos indólicos.

O meio aperfeiçoado composto por (em g/L): glicose, 5,0; extrato de levedura, 3,0; K_2HPO_4 , 0,25; $MgSO_4$, 0,75 e micronutrientes 4,0 ml/L, foi formulado a um custo de R\$ 1,70 por litro, o que representou uma redução de 66,4% no custo da matéria-prima, além de possuir uma capacidade de produção de biomassa celular aproximadamente 66,7% maior.

Otimização das condições de processamento em biorreator

A temperatura, variável avaliada nos tratamentos do DCCR, apresentou pouca influência sobre a biomassa produzida, conforme mostra a discussão dos resultados no item 4.3.2 e a análise estatística no item 4.3.3.

Por outro lado, a temperatura apresentou forte influência sobre densidade e a coloração do caldo fermentado uma vez que nos ensaios em nível -1 foram observados sistemas menos densos e de colorações mais claras, enquanto os ensaios em nível +1 apresentaram-se mais densos e escuros.

A presença de corpos internos visualmente evidentes ao microscópio de contraste de fase sugere a presença de grânulos de acumulação semelhantes aos grânulos internos de polihidroxibutirato (PHB).

Todos os ensaios do planejamento apresentaram intensa formação de uma espuma, que dificultam momentaneamente o controle de pH e provocam o entupimento de filtros de ar.

O valor de pO_2 está diretamente relacionado com a produção de biomassa uma vez que os incrementos na aeração e agitação resultou em aumento de biomassa. Este parâmetro poderá ser de grande utilidade no controle do processo descontínuo, indicando rapidamente o término do crescimento e evitando que o reator fique em operação com células em estado estacionário ou de declínio.

A produção de compostos indólicos está diretamente relacionada à multiplicação celular apresentando um bom potencial para ser definido como um parâmetro de controle de processo. As concentrações desta auxina seguem o mesmo perfil de acompanhar proporcionalmente a curva de crescimento celular durante a etapa exponencial de desenvolvimento.

Foi traçado perfil típico do cultivo em temperaturas elevadas onde foi observada a presença de duas fases de crescimento exponencial coincidentes com o período de baixo ou nulo pO_2 e com a produção de metabólitos redutores que interferem na curva de quantificação da glicose. Provavelmente estes metabólitos foram responsáveis pelo incremento na produção de biomassa formada a partir desta nova etapa de crescimento. Com base nos resultados obtidos a condição aperfeiçoada para o cultivo do *Azospirillum amazonense* que consistiu na fixação da temperatura na condição central de 35°C, impelindo uma agitação de 250 rpm e extrapolando o nível de aeração para 8,0 Lpm.

Substituição das fontes de carbono

Foram produzidas quantidades de biomassa e de compostos indólicos de $X_{\text{Glicose}} = 5,737 \text{ g/L}$ e $CI_{\text{Glicose}} = 31,179 \text{ mM}$, $X_{\text{Glicerol}} = 7,136 \text{ g/L}$ e $CI_{\text{Glicose}} = 38,194 \text{ mM}$, $X_{\text{Sacarose}} = 7,966 \text{ g/L}$ e $CI_{\text{Glicose}} = 85,833 \text{ mM}$, todos a um custo de produção de R\$ 0,32 por grama de células.

Para os cultivos nas 3 diferentes fontes de carbono foi possível observar a formação dos grânulos de acúmulo interno.

Portanto, pelo melhor rendimento de produção de biomassa e compostos indólicos recomenda-se a sacarose como fonte de carbono para o cultivo do *Azospirillum amazonense* na produção de inoculantes agrícolas em escala piloto.

Continuidade do trabalho

Para a continuidade e complementação deste trabalho sugere-se a realização de novos planejamentos experimentais que contemplem limites mais abrangentes das variáveis agitação e aeração, a fim de se estabelecer plenamente a condição otimizada deste bioprocessos.

Sugere-se ainda, a análise de identificação e quantificação dos grânulos de acúmulo observados no interior das células do microrganismo a fim de se pleitear a exploração do *A. amazonense* na produção industrial de biopolímeros.

6 BIBLIOGRAFIA

- BALDANI, J. I. Ocorrência e caracterização de *Azospirillum amazonense* em comparação com as outras espécies deste gênero em raízes de milho, sorgo e arroz. **Tese de Mestrado**, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1984. 110p.
- BALDANI, J.I.; DOBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legumes plants. In: international symposium on sustainable agriculture for the tropics – the role of biological nitrogen fixation, 1995, Angra dos Reis. Abstracts... Angra dos Reis: **The National Center for Agrobiology Research** (Embrapa-CNPAB), 1995. p.53-54.
- BURDMAN, S.; JURKEVITCH, E.; SCHWARTSBURD, B.; HAMPEL, M.; OKON, Y. Aggregation in *Azospirillum brasilense*: effects of chemical and physical factors and involvement of extracellular components. **Microbiology**, New York, v. 144, p. 1989-1999, 1998.
- CARVALHO, J. C. M; SATO, S. Fermentação descontínua alimentada. In: Schmidell et al. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. Editora Edgard, v. 2, 2001.
- CAVALLET, L.E.; PESSOA, A.C. DOS S.; JAIME JOSÉ HELMICH, J.J.; HELMICH, P.R. & CHARLES FABIANO OST, C.F. Produtividade do milho em resposta à aplicação de nitrogênio e inoculação das sementes com *Azospirillum spp.* **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.4, n.1, p.129-132, 2000.
- CHAPLIN, M. F. Monosaccharides. In.: CHAPLIN, M. F., KENNEDY, J. F. (eds) **Carbohydrate analysis**. Oxford: JRL Press, p 1-3, 1986.
- CONWAY,G.R., BARBIER,E.B. After the green revolution: sustainable agriculture for development, **Earthscan Publications**, London, p. 205, 1990.
- CORSON, W. H. (Ed.). **Manual global de ecologia: O que você pode fazer a respeito da crise do meio ambiente**. São Paulo: Ed. Augustus, p. 413, 2002.
- CROUCH, M.L. Biotechnology is not compatible with sustainable agriculture. **Journal of Agricultural and Environmental Ethics**, v. 8, n.2, p. 03-111, 1995.
- DALLA SANTA, O.R.; HERNÁNDEZ, R.H.; ALVAREZ, G.L.M.; JUNIOR, P.R. AND SOCCOL, C.R. *Azospirillum* sp. Inoculation in Wheat, Barle y and Oats Seeds Greenhouse Experiments. **Brazilian archives of biology and technology**, v.47, n. 6, p. 843-850, 2004.
- DEL GALLO, M.; FENDRIK, I. The rhizospheres and *Azospirillum*. Okon, Y., ed. ***Azospirillum/ plant associations***. Boca Raton:CRC Press, p.57-75, 1994.
- DIAS, J. M. C. S. Cultivo de *Azospirillum brasilense* sp 245 em frutose ou glicerol como fontes de carbono para produção de inoculantes agrícolas. **Tese de Doutorado**. Escola Politécnica da USP, 1988.
- DIDONET, A. D.; DIDONET, C. C. G. M. E.; GOMES, G.F. Avaliação de Linhagens de Arroz de Terras Altas Inoculadas com *Azospirillum lipoferum* Sp59b e *A.brasilense*

- Sp245. **Comunicado Técnico 69**, Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, 2003.
- DÖBEREINER, J. Emerging technology based on biological nitrogen fixation by associative N₂ – fixing organisms. Graham, P. H.; Harris, S. C.; ed. **Biological nitrogen fixation technology for tropical agriculture**. Cali: Centro Internacional de Agricultura tropical, p.469-483, 1982a.
- DÖBEREINER, J. Fixação de nitrogênio em gramíneas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v. 1, p. 1-54, 1977a.
- DÖBEREINER, J.; ANDRADE, V. de O.; BALDANI, V.L.D. **Protocolos para Preparo de Meios de Cultura da Embrapa Agrobiologia**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, p. 38, 1999. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 110).
- EHLERS, E. **Agricultura Sustentável: origens e perspectivas de um novo paradigma**. São Paulo: Ed. Livros da Terra Editora, 178 p, 1996.
- EVANS, H.J.; BURRIS, R.H. Highlights in Biological Nitrogen Fixation during the last 50 years. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H. J. (Eds.) **Biological Nitrogen Fixation**. New York: Chapman and Hall, p.1-42, 1992.
- FAGES, J., MULARD, D. Isolement de bactéries rhizosphériques et effet de leur inoculation en pots chez *Zea mays*. **Agronomie** 8, p. 309–314, 1988.
- FAQUIN, V. **Nutrição Mineral de Plantas**. Lavras: UFLA / FAEPE, 2005. p.: il. - Curso de Pós-Graduação “Lato Sensu” (Especialização) a Distância: Solos e Meio Ambiente.
- FERNANDES, M. S. FERREIRA, M. B. and FREIRE, L. R. Efeitos da interação de NO₃⁻ e NH₄⁺ na atividade da nitrato redutase e acumulação de N-proteico em *Brachiaria*. **Turrialba – Revista Interamericana de Ciências Agrícolas**, v. 28, n.3, 1978.
- FERNANDES, M.S. & SOUZA, S.R. Absorção de nutrientes. In: FERNANDES, M.S., ed. **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p.115-152.
- GORDON, S. A.; WEBER, R. P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant Physiology**, Baltimore, v. 26, n. 1, p.192-195, 1951.
- GUIMARÃES, S.L.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. & JACOB-NETO, J. Adição de molibdênio ao inoculante turfoso com bactérias diazotróficas usado em duas cultivares de arroz irrigado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n.3, p. 393-398, 2007.
- GUNARTO, L., ADACHI, K. & SENBOKU, T. Isolation and selection of indigenous *Azospirillum spp.* from a subtropical island, and effect of inoculation on growth of lowland rice under several levels of N application. **Biol Fertil Soils**, v. 28, p. 129-136, 1999.

- HARTMANN, A.; SINGH, M.; KLINGMÜLLER, W., Isolation and characterization of *Azospirillum* mutants excreting high amounts of indolacetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 29, p. 916-923, 1983.
- HISS, H. Cinética de Processos Fermentativos. In: Schmidell et al. **Biotecnologia Industrial. Engenharia Bioquímica**. Editora Edgard Blücher Ltda. v. 2, p. 93-122, 2001.
- KHAMMAS, K. M., AGERON, E., GRIMONT, P. A. D. & KAISER, P. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. **Res Microbiol**, v. 140, p. 679-693, 1989.
- KRIEG, N. R., AND DOBEREINER, J. Genus *Azospirillum*. In N. R. Krieg and J. G. Holt (ed.), **Bergey's manual of systematic bacteriology**, The Williams & Wilkins Co., Baltimore, v.1, p. 94-1041, 1984.
- LEAL, L.T. Resposta de Genótipos de Cana-de-Açúcar à Inoculação de Bactérias Diazotróficas no Rio Grande do Sul. 2011. **Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo)** – Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), 2011.
- LOIRET, F. G.; ORTEGA, E.; KLEINER, D.; ORTEGA-RODÉS, P.; RODÉS, R.; DONG, Z. A putative new endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pantoea* sp. from sugarcane. **J. Appl. Microbiol.**, 97: p. 504-511, 2004.
- MAGALHÃES, F. M.; BALDANI, J. I.; SOUTO, S. M.; KUYKENDALL, J. R.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.55, n.4, p.417-430, 1983.
- MAGALHÃES, F.M.M. & DÖBEREINER, J. Ocorrência de *Azospirillum amazonense* em alguns ecossistemas da Amazônia, **Microbiol**, v. 15, p. 246-252, 1984.
- MANN, C. Reseeding the green revolution. **Science**, Madison, v. 277, p.1038-1043, 1997.
- MARTINEZ-DRETS G, FABIANO E, CARDONA A Carbohydrate catabolism in *Azospirillum amazonense*. **Appl. Environ. Microbiol.** 50: p. 183-185, 1985.
- MASCARUA-ESPARZA, M.A., VILLA-GONZALEZ, R., AND CABALLERO-MELLADO, J. Acetylene reduction and indoleacetic acid production by *Azospirillum* isolates from Cactaceous plants. **Plant Soil**, v. 108, p. 91-95, 1988.
- MOO-YOUNG, M. Comprehensive Biotechnology. **The Principles of Biotechnology: Scientific Fundamentals**, v.1, Ed. Pergamon Press-Oxford, 1985.
- MOREIRA, F. M. S. e SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Editora UFLA, 626p, 2002.
- NELSON, D.L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. New York: Wrth Publishes, 1152p, 2000.
- NETO, B. B.; SCARMINO, L. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e Otimização de Experimentos**. Campinas: Editora da Unicamp, 1996.

- NEVES, M. C. P. e FRANCO, A. A. Fixação biológica e metabolismo de nitrogênio em plantas. In: FERNANDES, M.S.; ROSSIELLO, R. O.; DOBEREINER, J. NEVES, M.C.P.; PIMENTEL, & MIRANDA, R. M. (Eds.) **Anais do I Simpósio Brasileiro sobre N em Plantas**. P. 127-167, Itaguaí, 1993.
- NOVAKOWISKI, J.H.; DANDINI, I.E.; FALBO, M.K.; MORAES, A.; NOVAKOWISKI, J.H. e CHENG, N.C. Efeito Residual da Adubação Nitrogenada e Inoculação de *Azospirillum brasilense* na Cultura do Milho. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, suplemento 1, p. 1687-1698, 2011.
- OLIVARES, F.L.; JAMES, E.K.; BALDANI, J.I. Infection of mottled stripe disease susceptible and resistant varieties of sugar cane by endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. **New Phytologist**, New York, v.135, n.4, p.723-737, 1997.
- OLIVEIRA JR.,P.H.B. Notas sobre a história da agricultura através do tempo. Rio de Janeiro: Ed. Fase, 72p, 1989.
- PAGNONCELLI, M. G. B. Estudo do mecanismo de produção de oligossacarídeos com atividade nutracêuticas a partir da quitosana por hidrólise enzimática com processo fermentativo simultâneo. **Tese (Doutorado)** – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Tecnologia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2008.
- PEREIRA JR., N.; BON, E. P. S.; FERRARA, M. A. **Tecnologia de Bioprocessos**. Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ, 2008.
- PIMENTAL, D. Food production and energy crisis: A comment. **Science**, Madison, v. 187, p. 561-1975, 1975.
- PIMENTEL, C. **Metabolismo de carbono na agricultura tropical**. Seropédica: Edur. Rio de Janeiro. 159p, 1998.
- POLIDORO, J.C. O molibdênio na nutrição nitrogenada e na fixação biológica de nitrogênio atmosférico associada à cultura de cana-de-açúcar. 2001. 185p. **Tese (Doutorado em Ciência do Solo)** – Universidade Federal Rural Rio de Janeiro, Seropédica, 2001.
- PRADELLA, J. G. C., Oliveira, M. S., Urenha, L. C. Produção de inoculantes Agrícolas. In: Lima, U. A.; Aquarone, E., Borzani, W.; Schimidell, W. (Coord.). **Biotechnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blücher, v.3, p. 279-305, 2001.
- RADWAN, T. E. E.; MOHAMED, Z. K.; REIS, V. M. Aeração e adição de sais na produção de ácido indol acético por bactérias diazotróficas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, v. 40, n. 10, p. 997-1004, 2005.
- RADWAN, T. EL-S. EL-D.; MOHAMED, Z.K.; REIS, V.M. Production of indole-3-acetic acid by different strains of *Azospirillum* and *Herbaspirillum* spp. **Symbiosis**, v. 32, p. 39-54, 2002.
- REINHOLD, B., HUREK, T., FENDRIK, I., POT, B., GILLIS, M., KERSTERS, K., THIELEMANS, S. & DE LEY, J. *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogen-

fixing organism associated with roots of Kallar Grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth). **Int J Syst Bacteriol.** v. 37, p. 43-51, 1987.

- REIS JR., F.B.; SILVA, L.G.; REIS, V.M.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.5, p.985-994, 2000.
- REIS JUNIOR, F. B.; SILVA, M. F.; TEIXEIRA, K. R. S.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* associados a *Brachiaria* spp., em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônio pela bactéria. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 28, p. 103-113, 2004.
- REIS, V.M.; O, A.L.M.; BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L. & BALDANI, J.I. Fixação Biológica de Nitrogênio Simbiótica e Associativa. In: FERNANDES, M.S. (Ed) **Nutrição Mineral de Plantas**. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa-MG, p. 153-174, 2006.
- ROCHA, R. E. M.; BALDANI, J. I., DÖBEREINER, J. Specificity of infection by *Azospirillum* spp. in plants with C4 photosynthetic pathway. In: VOSE, P. B.; Rushel, A. P., ed. **Associative N₂ fixation**. Boca ration: CRC Press, p.67-69, 1981.
- RODRIGUES E IEMMA, **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos – Uma estratégia sequencial de planejamentos**, 2ed., São Paulo, Brasil, Editora Casa do Pão, 2009.
- RODRIGUES, E. P.; OLIVEIRA, A. L. M.; VIDAL, M. S.; ARAÚJO, J. L. S.; BALDANI, J. I.; Obtenção e seleção de mutantes Tn5 de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Pal 5) com alterações na produção de auxinas. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, p. 20, 2007. (**Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Agrobiologia**, ISSN 1516-2311; 27).
- RODRIGUES, M.I. & IEMMA, A.F. **Planejamento de Experimentos e Otimizacao de Processos. Uma estrategia sequencial de planejamentos**. 1 ed., – Campinas, SP: Casa do Pao Editora, 2005.
- SARWAR, M.; KREMER R. J. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 20, p. 282-285, 1995.
- SCHMIDELL, W. Microrganismos e meios de cultura para utilização industrial. In: **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. Eds. Lima, U.A.; Aquarone, E.; Borzani, W; Schmidell, W. Editora Edgard Blücher Ltda. São Paulo, Brasil, v.2, 2001.
- SCHMIDELL, W.; FACCIOTTI, M. C. R. Biorreatores e processos fermentativos. In: **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. Eds. Lima, U.A.; Aquarone, E.; Borzani, W; Schmidell, W. Editora Edgard Blücher Ltda. São Paulo, Brasil, v. 2, 2001.
- SCHULLER, D. E. Desenvolvimento de um meio de cultura selectivo/diferencial para a levedura de contaminação alimentar *Zygosaccharomyces bailii*. **Dissertação (Mestrado em Ciências do Ambiente)** - Universidade do Minho, Braga, Portugal, 1998.

- SILVA, L. S., Produção experimental de inoculantes agrícolas á base de *Azospirillum* spp. para Fixação Biológica de Nitrogênio em gramíneas e Forrageiras. **Dissertação de Mestrado**. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ IPT/ I. BUTANTAN Universidade de São Paulo – USP. São Paulo, SP. Brasil. 2006.
- SOUZA, S.R.; FERNANDES, M.S. Nitrogênio. In: FERNANDES, M.S. (Ed) Nutrição Mineral de Plantas. **Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa-MG, p. 215-252, 2006.
- SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiol REV.**, p. 1–24, 2007.
- SPRENT J.I. AND FARIA, S. M. Mechanism of infection of plants by nitrogen fixing organisms. F.A.Skinner et.al.(Eds.) Nitrogen Fixation with legumes, Kulwer. **Academic Publishers**, p. 3-11, 1989
- TAL, S.; OKON, Y. Production of the reserve material poly-betahydroxybutyrate and its function in *Azospirillum brasilense* Cd. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 31, p. 608-613, 1985.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p
- TARRAND, J. J., KRIEG, N. R. & DO\$ BEREINER, J. (1978). A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov., and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, v.24, p. 967±980.
- THIEMANN, J. E. Construção de equipamentos de fermentação. In: **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. Eds. Lima, U.A.; Aquarone, E.; Borzani, W; Schmidell, W. Editora Edgard Blücher Ltda. São Paulo, Brasil, 2001.
- URQUIARGA, S.S; BODDEY, R.M.; ALVES, B.J.R. Dinâmica do N no solo. In: FERNANDES, M.S.; ROSSIELLO, R. O.; DOBEREINER, J. NEVES, M.C.P.; PIMENTEL, & MIRANDA, R. M. (Eds.) **Anais do I Simpósio Brasileiro sobre N em Plantas**. P. 127-167, Itaguaí, 1993.
- VAN LOON, G. W.; DUFFY, S. J. Microbiological processes: In: **Environmental Chemistry**. New York: Oxford University, Cap. 15, p. 492, 2001.
- VICTORIA, R. L.; PICCOLO, M. C. e VARGAS, A. A. T. O ciclo do nitrogênio. In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. (ed.). **Microbiologia do solo**. Campinas, 1992.
- XAVIER, R. P; QUESADA, D. M; RESENDE, A. S; BODDEY, R. M.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S. Quantificação da fixação biológica de nitrogênio na cultura de cana-de-açúcar utilizando a técnica de balanço do nitrogênio total no sistema solo planta. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2004. 16 p. (**Embrapa Agrobiologia. Documentos, 179**).