

6K

F-1-120
v.1 e.1

São Paulo, 1988

Tese apresentada à Escola
Politécnica da USP para a
obtenção do título de
Doutor em Engenharia.

VOLUME 1

CULTIVO DE AZOSPIRILLUM BRASILENSE SP 245 EM FRUTOSE
OU GLICEROL COMO FONTES DE CARBONO PARA
PRODUÇÃO DE INOCULANTES AGRÍCOLAS

NÃO CIRCULA

JOSÉ MANUEL CABRAL DE SOUSA DIAS

v.1 e.1

F-1-120

JOSE MANUEL CABRAL DE SOUSA DIAS
Engº Químico, Escola Politécnica da USP, 1975

CULTIVO DE AZOSPIRILLUM BRASILENSE SP 245 EM FRUTOSE
OU GLICEROL COMO FONTES DE CARBONO PARA
PRODUÇÃO DE INOCULANTES AGRÍCOLAS

VOLUME 1

Tese apresentada à Escola
Politécnica da USP para a
obtenção do título de
Doutor em Engenharia.

Orientador: Prof. Dr. Willibaldo Schmidell Netto
Depto. Engenharia Química

São Paulo, 1988

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Willibaldo Schmidell Netto pelo exemplo, pela dedicação e pela amizade.
- A Dra. Johana Dobreiner pela sugestão inicial, pelo fornecimento do microorganismo utilizado e pelo apoio ao longo do trabalho.
- A Dra. Maria Cândida Reginato Facciotti pelo auxílio na parte inicial do trabalho experimental.
- A Bióloga Katia Sousa de Oliveira pela inestimável colaboração.
- Aos então alunos de Engenharia Química da EPUSP Gastão P. Almeida Prado e Isidro Balleroni pelo auxílio na parte inicial do trabalho experimental.
- Aos amigos Beatriz V. Kilkikian, Estevão Facchin, Henri Aboutboul Luiz Carlos Sornin Vieira e Marina Kahvedjian pelo apoio e sugestões.
- A EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária pela incorporação ao seu Programa de Pós-Graduação.
- Ao Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo pelas facilidades concedidas para execução deste trabalho.
- Aos funcionários do DEQ-EPUSP Luzinete Ferreira da Silva, Euclides Gomes de Lima e Carlos Sérgio Rocha da Silva pelo apoio técnico.
- A Izilda Maria Fischer pela impecável datilografia.

O crescimento aeróbio de *Azospirillum brasilense* sp 245 foi estudado na faixa de temperatura de 30 a 40 °C em agitador rotativo em diversas concentrações de frutose ou glicérol como fontes de carbono e em fermentador (processo contínuo e descontínuo) a 38 °C com frutose e a 36 °C com glicérol, procurando desenvolver um processo industrial de produção de inoculantes para a cultura do tri-go. No crescimento com frutose observou-se que a velocidade específica de crescimento era inibida pela concentração inicial de substrato, segundo uma equação tipo Andrews. A energia de ativação para esse mesmo substrato era de 15,0 kcal/mol e o "zero biológico" 10 °C. Em todos os cultivos com glicérol e extrato de levedura foram observadas duas fases de crescimento exponencial, motivadas pelo consumo preferencial das substâncias nitrogenadas presentes no extrato de levedura. As energias de ativação para as fases de crescimento eram 20,1 kcal/mol (1ª fase) e 9,8 kcal/mol (2ª fase). Em muitas situações de cultivo, principalmente com glicérol foi observada flocculação do microrganismo. Os coeficientes de transferência de oxigênio nos cultivos em ambos os substratos puderam ser ajustados por uma equação tipo Riet. Quatro alternativas de processo de produção foram sugeridas e efetuou-se uma avaliação econômica preliminar imaginando a implantação de unidades com esses processos. A alternativa que apresentou maior rentabilidade foi a de processo contínuo com frutose ($S_0 = 8,5 \text{ g/l}$) seguida da de processo contínuo com glicérol ($G_0 = 5,0 \text{ g/l}$). A produtividade celular (cel/l.h) era a grandeza que causava maiores impactos nos custos de produção, seguida do preço da matéria-prima.

RESUMO

ABSTRACT

The aerobic growth of *Azospirillum brasilense* sp 245 was studied in the temperature range of 30 to 40 °C in rotatory shaker at several concentrations of fructose or glycerol as carbon sources, and in fermenter (continuous and discontinuous processes) at 38°C with fructose and 36 °C with glycerol aiming the development of industrial production process of inoculants for wheat. It was observed that specific growth rate was inhibited by initial fructose concentration, following a Andrews-type equation. The activation energy for this substrate was 15,0 kcal/mol and the "biological zero" was 10 °C. In all runs with glycerol and yeast extract it was observed two exponential growth phases, motivated by preferential consumption of nitrogenous substances present in the yeast extract. The activation energies were 20.1 (1st phase) and 9.8 kcal/mol (2nd). At several culture conditions, specially with glycerol, microbial flocculation was observed. The oxygen transfer coefficients for both substrates followed a Riet-type equation. Four alternative processes were suggested and a preliminary economic evaluation was performed, for the implantation of industrial units with those (processes).

Continuous production with fructose ($S_0 = 8.5 \text{ g/l}$) was the alternative that presented the best profitability, followed by continuous process with glycerol ($G_0 = 5 \text{ g/l}$). Cellular productivity was the variable responsible for greatest impacts on production costs, followed by feedstocks prices.

SUMÁRIO
(VOLUME I)

RESUMO	f
ABSTRACT	ff
SUMÁRIO	fff
NOMENCLATURA.....	vii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
1 - INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	1.1
2 - FATORES IMPORTANTES PARA O DESENVOLVIMENTO DE UM PROCESSO DE CULTIVO DE MICROORGANISMOS	2.1
2.1 Meio de Cultura	2.1
2.1.1 Fontes de Carbono	2.4
2.1.1.1 Frutose	2.4
2.1.1.2 Glicerol	2.11
2.1.2 Fontes de Nitrogênio	2.16
2.1.2.1 Escolha das Fontes de Nitrogênio	2.16
2.1.2.2 Assimilação da Amônia e de Aminoácidos em <i>A. brasiliense</i>	2.19
2.1.3 Fontes de Fósforo	2.23
2.1.4 Fontes de Micronutrientes, Vitaminas e Fatores de Crescimento	2.25
2.1.4.1 Micronutrientes	2.25
2.1.4.2 Vitaminas	2.26
2.1.4.3 Fatores de Crescimento	2.27
2.2 Temperatura	2.30
2.2.1 Temperatura Ótima para Cultivo de <i>A. brasiliense</i>	2.30
2.2.2 Influência da Temperatura na Velocidade de Crescimento de Microrganismos	2.32
2.3 Potencial Hidrogeniônico (pH)	2.35

2.4 Agitação e Aeração 2.37

2.4.1 Agitação e Aeração em Cultivos de *A. brasiliense* 2.37

2.4.2 Influência do Oxigênio sobre *A. brasiliense* ... 2.39

2.4.3 Velocidades de Consumo de Oxigênio por *A. brasiliense* 2.43

2.4.4 Coeficientes de Transferência de Oxigênio 2.45

2.4.5 Correlações para k_{La} 2.46

2.5 Tipo de Processo 2.49

2.5.1 Modelagem e Otimização de Processos Microbianos 2.49

2.5.2 Influência do Tipo de Processo na Produtividade de *A. brasiliense* 2.54

2.6 Parâmetros para Controle do Processo 2.56

2.6.1 Parâmetros para Medida "em Linha" 2.56

2.6.2 Aborrbância 2.58

2.6.3 Concentração Celular Numérica (N) 2.59

2.6.4 Concentração Celular Mássica (X) 2.60

2.6.5 Concentração de Proteína Celular (P) 2.60

2.6.6 Oxigênio Dissolvido e Respiração Celular 2.61

2.6.7 pH e Produção de Ácidos e Bases 2.62

2.7 Outros Fatores 2.63

2.7.1 Floculação 2.63

2.7.2 Operações Posteriores ao Crescimento Microbiano 2.61

3 - MATERIAIS E METODOS 3.1

3.1 Microrganismo 3.1

3.2 Meios de Cultura 3.1

3.2.1 Soluções-Estoque 3.1

3.2.2 Solução Salina 3.2

3.2.3 Meio de Cultura para Conservação de Microorganismos 3.2

3.2.4 Meio de Cultura Sólido para Preparo do Inóculo. 3.3

3.2.5 Meios de Cultura Líquidos 3.4

3.3 Ensaios em Incubador Rotativo 3.6

3.3.1 Equipamentos 3.6

3.3.2 Preparo do Inóculo 3.6

3.3.3 Padronização do Inóculo 3.7

3.3.4 Inoculação os Frascos 3.7

3.3.5 Incubação e Amostragem 3.8

3.3.6 Determinações Efetuadas 3.8

3.4 Ensaios em Fermentador, Processo Descontínuo 3.8

3.4.1 Equipamentos 3.8

3.4.2 Preparo do Inóculo 3.9

3.4.3 Inoculação do Fermentador 3.11

3.4.4 Amostragem 3.11

3.4.5 Determinações Efetuadas 3.11

3.5 Ensaios em Fermentador, Processo Contínuo 3.12

3.5.1 Equipamentos 3.12

3.5.2 Preparo do Inóculo para o Processo Contínuo ... 3.12

3.5.3 Início do Processo Contínuo 3.13

3.5.4 Determinações Efetuadas 3.13

3.5.5 Caracterização do Regime Permanente 3.13

3.6 Métodos de Análises Físicas, Químicas e Microbiológi-
cas 3.14

3.6.1 Concentração Celular Mássica (X) 3.14

3.6.2 Concentração Celular Numérica (N) 3.14

3.6.3 Concentração de Frutose (S) 3.15

3.6.4 Concentração de Glicerol (G) 3.16

3.6.5 Absorbância Celular (A) 3.16

3.6.6 Concentração de Nitrogênio Inorgânico (Ni) 3.18

3.6.7 Concentração de Proteína Celular (P) 3.19

3.6.7.1	Preparo da Amostra	3.19
3.6.7.2	Dosagem de Proteínas	3.20
3.6.8	Massa de NaOH para Manutenção de pH Constante .	3.20
3.6.9	Concentração de Oxigênio Dissolvido	3.20
3.6.10	Pressão Interna do Fermentador	3.21
3.6.11	Vazão de Ar no Fermentador (Q_{ar})	3.21
3.6.12	Velocidade Específica de Respiração (QO_2) e Coeficiente Volumétrico de Transferência de Oxigênio (k_{La})	3.22
3.7	Métodos para Cálculo dos Fatores de Conversão, Produtividades e Velocidades Específicas de Crescimento ..	3.25
3.7.1	Processo Descontínuo	3.25
3.7.2	Processo Contínuo	3.27
3.8	Experimentos Realizados e Nomenclatura dos Ensaios ..	3.29

NOMENCLATURA

A	absorbância
C	concentração de oxigênio dissolvido (mmol/l)
D	vazão específica de alimentação (h^{-1})
Ea	energia de ativação para o crescimento (kcal/mol)
EO	energia necessária para o crescimento (kcal/mol)
G	concentração de glicérol (g/l)
Ki	constante de inibição pelo substrato
KiO ₂	constante de inibição pelo oxigênio
K _{La}	coeficiente de transferência de oxigênio (s^{-1}) ou (h^{-1})
KO ₂	constante de saturação em relação ao oxigênio
M	massa de NaOH adicionada (mg/l)
N	concentração celular ou concentração celular numérica (cel/l)
NI	concentração de nitrogênio inorgânico (g/l)
NR	freqüência do agitador (min^{-1}) ou (seg^{-1})
P	concentração de proteína celular (g/l)
P _G	potência aerada (W)
P _N	produtividade celular numérica (cel/l.h)
P _P	produtividade em proteína celular (g prot/l.h)
P _X	produtividade celular mássica (g/l.h)
Q _{ar}	vazão de ar no fermentador (l/min) ou (m ³ /s)
QO ₂	velocidade específica de respiração (mmol O ₂ /g.s)
R	constante universal dos gases perfeitos (kcal/mol °K)
S	concentração de frutose (g/l)
T	temperatura (°C)
t	tempo (h)
T _a	temperatura absoluta (°K)
T _{max}	temperatura máxima para crescimento (°C)
T _{min}	temperatura mínima para crescimento (°C)

t_{NI} ... tempo de início do consumo do nitrogênio inorgânico (h)

V ... volume do meio de cultura (l ou m^3)

V_s ... velocidade superficial do ar (m/s)

X ... concentração celular ou concentração de biomassa (g/l)

$Y_{A/B}$... fator de conversão da grandeza B (G, NI ou S) na grandeza

A (N, P ou X) (g/g)

$Y_{A/B}$... fator de conversão molar da grandeza B (G, NI, O_2 ou S) na

grandeza A (N ou X) (g/mol)

Letras gregas

α ... temperatura do "zero biológico" ($^{\circ}C$)

μ ... velocidade específica de crescimento (h^{-1})

μ_{max} ... velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1})

Índices

F ... final

J ... regime permanente

O ... inicial

Sobrescritos

~ ... molar

LISTA DE TABELAS
(VOLUME I)

TABELA Nº	TÍTULO	PÁGINA
-----------	--------	--------

1.1	Efeito da inoculação com várias estirpes de <i>Azospirillum</i> spp. em experimentos de campo no sul do Brasil	1.4
2.1	Fatores de conversão para alguns microrga- nismos com diferentes fontes de nitrogênio.	2.17
2.2	Variação da velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}) e da velocidade de cres- cimento linear (V) em função das concentra- ções de extrato e de água de levedura, no cultivo de <i>R. japonicum</i>	2.29
2.3	Velocidades específicas de consumo de oxigê- nio de <i>A. brasilense</i> sp 7 em diferentes substratos	2.44
2.4	Coefficientes de transferência de oxigênio (k_{La}) para sistemas de água-glicérol de di- ferentes viscosidades	2.49
2.5	Tipos de processo para o cultivo de micror- ganismos e formação de produtos microbianos	2.50
2.6	Produtividade celular (P_X) de cepas de <i>A. brasilense</i> em processo descontínuo, em di- versos substratos	2.55
2.7	Vazões específicas (D) e produtividades (P_X) para cultivo contínuo de <i>A. brasilense</i> a 30°C	2.55
2.8	Métodos de medida de crescimento que podem ser utilizados "em linha"	2.57

Nº TABELA	TÍTULO	PÁGINA
2.9	Fatores de afetam a floclulação de microrga- nismos	2.64
3.1	Massa aproximada da solução de glicérol se- gundo a concentração esperada	3.17
3.2	Experimentos realizados para o estudo do crescimento de <i>A. brasilense</i> sp 245 e en- saios componentes de cada experimento	3.30

LISTA DE FIGURAS
(VOLUME 1)

FIGURA Nº	TÍTULO	PÁGINA
-----------	--------	--------

2.1	Principais "entradas" do metabolismo de café	2.5
2.2	Integração entre a via glicolítica, o ciclo dos ácidos tricarboxílicos, o desvio do glicoxilato, a cadeia respiratória e a biosíntese, para o consumo de frutose por <i>A. brasiliense</i>	2.7
2.3	Etapas iniciais do metabolismo de glicérol em bactérias	2.12
2.4	Esquema da assimilação de amônia em bactérias	2.21
2.5	Velocidades específicas máximas de crescimento celular (μ_{max}), produtividade celular (P_X) e fatores de conversão de frutose em células, segundo a concentração de extrato de levedura e segundo a concentração de sólidos na água de levedura	2.29
2.6	Influência da concentração de oxigênio dissolvido sobre a velocidade específica de crescimento celular	2.41
2.7	Representação de modelos de crescimento microbiano com inibição pelo substrato	2.53
3.1	Representação da aplicação do método dinâmico para cálculo de QO_2 e k_{La}	3.23
3.2	Representação das curvas de concentração de	

FIGURA Nº	TÍTULO	PÁGINA
-----------	--------	--------

Inlar mássica (X), concentração celular nu-
mérica (N), proteína (P), fonte de carbono
(Q) e nitrogênio inorgânico (Ni) para o cál-
culo dos fatores de conversão e produtividã
des

3.26

1 - INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

O Homem vive em uma atmosfera dominada pelo nitrogênio gasoso, mas é incapaz de usar esse elemento em sua forma molecular para sustentar a vida.

O nitrogênio do ar precisa primeiro ser fixado, ou seja, incorporado em compostos que os animais e as plantas possam usar como alimento. A incorporação desse nitrogênio molecular se deve à existência de certos microrganismos que o reduzem e o convertem em formas biologicamente úteis (amônia) para si mesmo e para as plantas. A amônia formada reage com ácidos orgânicos presentes, levando à formação de aminoácidos.

O nitrogênio também pode ser fixado através de processos industriais (síntese de amônia, principalmente), e de descargas elétricas e processos de combustão (formando óxidos de nitrogênio). Estudos acerca da fixação de nitrogênio concluíram que em 1975 houve uma fixação total da ordem de $255 \cdot 10^6$ t N_2 , das quais $175 \cdot 10^6$ (69%) em processos biológicos, $30 \cdot 10^6$ (12%) em combustão e descargas elétricas e as restantes $50 \cdot 10^6$ (19%) em industriais químicas, sendo 80% para uso em fertilizantes. Do nitrogênio fixado biologicamente $35 \cdot 10^6$ t foram acumulados em leguminosas e $4 \cdot 10^6$ t em arroz |087|.

A reação de transformação de nitrogênio em amônia ($N_2 + 3H_2 \rightarrow 2NH_3$) requer grande quantidade de energia, estimando-se que cada tonelada de amônia produzida industrialmente gasta 6 barris de petróleo |184|. A produção de fertilizantes nitrogenados requer 9 vezes mais energia (por tonelada) do que os fosfáticos e 11 mais do que os potássicos |128|. Durante 1981/82 a produção de fertilizantes nitrogenados foi responsável por 90% da energia usada na fabricação de todos os fertilizantes consumidos no mundo |128|. Na fixa-

1.2

ção biológica de nitrogênio (FBN), a quantidade de energia externa (que não a solar) necessária é muito pequena, porque na desnitrificação intervem um complexo enzimático que reduz substancialmente a energia de ativação da reação. Esse complexo, denominado nitrôgenase, é o responsável em todos os microrganismos pela FBN. Deve-se considerar que há dois grandes grupos de fixadores: os simbiotes e os originalmente denominados "de vida livre", que atualmente são designados "associativos" |065|.

Dentre os primeiros, *Rhizobium japonicum* é particularmente importante para o Brasil, pois a sua simbiose com soja vem permitindo a eliminação gradual da utilização de fertilizantes nitrogenados, com uma economia estimada por J. DOBERREINER de 2,5 bilhões de dólares apenas na safra 1987/1988 |063|.

A lista de microrganismos "associativos" vem aumentando ano após ano, devido ao aprimoramento das técnicas microbiológicas e bioquímicas em geral, dos métodos de trabalho em anaerobiose e dos ensaios para medida da atividade da nitrôgenase |065|.

Muitos desses trabalhos vem sendo desenvolvidos no Brasil e, entre outros resultados |065| levaram, em 1973, à descoberta e caracterização de um novo gênero bacteriano, *Azospirillum*, com duas espécies *A. brasilense* e *A. lipoferum* |192|.

A descoberta dessas duas espécies foi de extrema importância para o lançamento de uma série de hipóteses inovadoras sobre as bactérias diazotróficas e sua associação com as plantas |064|. Entre elas a de que a fixação de N_2 com graminhas poderia alcançar níveis economicamente significativos |064|, motivou a realização de muitos trabalhos avaliando a resposta das plantas à inoculação com *Azospirillum*, a ponto de, já em 1982, VOSE |202| rever os resultados de inoculação em diversas graminhas e fazer uma rápida avaliação da importância econômica do potencial da fixação de nitrogênio

em cana-de-açúcar no Brasil.

Nessa mesma época um trabalho de BALDANI et alii | 012 | mostrava que a inoculação de trigo com *A. brasilense* sp 245 aumentara o teor de nitrogênio nas plantas em 89% (no lançamento da espiga) e em 30% (na média) em relação às plantas não inoculadas, trazendo a público uma estirpe que, passados mais de cinco anos ainda é a melhor e mais reprodutíveis resultados vem apresentando | 065 |. A

tabela 1.1, reproduzida de DOBERKHEINER & PEDROSA | 065 |, mostra resultados recentes | 011,026 | em que o nitrogênio acumulado nas espigas e a produção de grãos em plantas inoculadas com essa estirpe aumentaram de 41,3 a 137,9% e de 31,3 a 78,9% respectivamente, em relação às plantas sem inoculação, e de 21,7 a 65,4% e de 18,2 a 69% em relação às inoculadas com estirpes cujos resultados ficaram mais próximos aos da sp 245 (a sp 246 no Rio de Janeiro e a sp 245 NR no Paraná).

Tomando como exemplo os inoculantes para leguminosas, | 034,165, 195 |, em 1985, OKON | 139 | discutia o potencial de fabricação de inoculantes com *Azospirillum*, tendo sugerido que a melhor formulação para o mesmo seria misturar as bactérias com turfa finamente pulverizada, juntando o produto às sementes antes da semeadura ou espalhando-o em suspensão aquosa, no sulco, logo após o plantio ou em forma granular junto com as sementes. Nessa mesma revisão observou-se que os custos de produção, comercialização e aplicação de inoculantes para gramíneas deveriam ser da mesma ordem dos inoculantes para leguminosas.

Finalmente, diversos resultados apresentados no decorrer de 1987 | 013,014,092 | vieram confirmar a hipótese lançada em 1974 | 064 | de que a associação bactérias-leguminosas poderia ter importância econômica; num deles, por exemplo, concluiu-se que a produção de grãos de trigo inoculado com *A. brasilense* sp 245 em turfa igualou a de

1.4 plantas que receberam 60 kg de nitrogênio/ha | 014 | (ver item 2.7.2).

Tabela 1.1 Efeito da inoculação com várias estirpes de *Azospirillum* spp em experimentos de campo no sul do Brasil.

Produção de de grãos (g/parcela)	N total nas espigas (g/parcela) ^c	Espigas das plantas (g/parcela) ^c	% estirpe inoculada ^b	SR	IR
---	---	---	-------------------------------------	----	----

Estado do Rio de Janeiro					
23,2c	0,66c	32,4b	0	0	0
27,0c	0,87c	44,0b	0	50	0
35,1b	1,29b	61,4a	27	94	27
41,5a	1,57a	71,1a	67	100	67
25,6c	0,82c	42,4b	0	81	0
31,9b	1,26b	60,5a	11	56	11
Estado do Paraná					
27,8	6,37	278	-	-	-
36,5	9,00	365	-	-	-
33,8	5,44	338	-	-	-
21,6	7,60	326	-	-	-

a tabela reproduzida de DOBEREINER & PEDROSA | 065 |

b % de isolados da estirpe inoculada identificada pela marca de resistência a antibióticos. SR - superfície das raízes

IR - interior das raízes

c Na floração no Rio de Janeiro e no enchimento do grão no Paraná a procedência das estirpes de *A. brasilense*: sp7 isolada de solo da rizosfera de Capim-Digit; sp 245 de raízes de trigo após esterilização da superfície; sp 246 e *A. amazonense* Y_{Tr} de raízes de trigo lavadas.

Os resultados em cada coluna seguidos da mesma letra não são estatisticamente diferentes.

Não poderia ser mais oportuna a possibilidade de diminuir os custos de produção do trigo no Brasil, pela substituição total ou parcial dos fertilizantes nitrogenados por inoculantes específicos.

A recente retirada dos subsídios monetários à aquisição e comercialização do trigo |029| provocou aumentos imediatos de preços das farinhas e seus derivados, o que fará, na opinião de especialistas |069| cair a curto e médio prazo o consumo desses produtos. Evidentemente, uma tecnologia que possa reduzir os custos de produção (ver capítulo 7) será extremamente vantajosa para todos os setores envolvidos. Como um estímulo adicional para adoção da tecnologia pelos produtores agrícolas, pode-se antever que a diminuição dos custos de produção aumentará a competitividade do produto nacional em relação ao estrangeiro, com a decorrente economia de divisas escassas. Aliás, nesse último aspecto os países tropicais e subtropicais terão uma vantagem muito grande na utilização da nova tecnologia, pois a faixa de temperatura ótima para a fixação do nitrogênio por *Azospirillum* vai de 28 a 41°C |065|.

A produção industrial do inoculante com *A. brasilense* usando turfa como veículo, deverá ser, a princípio, bastante parecido com a de *Rhizobium* (ver figura 7.1): a turfa será extraída, passará por uma secagem, será moída, terá seu pH acertado para a faixa 6,0 a 7,0, será esterilizada por radiação γ e misturada com bactérias recém cultivadas.

Alguns dos aspectos desse processo já foram estudados, como tipos de veículo e sobrevivência do *Azospirillum* em função do tempo de estocagem |092,197|, mas muito pouco se conhece a respeito do processo de produção do próprio microrganismo. As formas utilizadas até ao momento para produzir o inoculante |011,013,014,026| são adequadas à escala de laboratório, mas não levaram em conta uma série de aspectos importantes para o desenvolvimento de um processo de produção de *A. brasilense* que reúna bons resultados microbiológicos a baixos custos de produção.

Assim, o objetivo geral desta tese de doutoramento é iniciar o es

tudo sistemático do processo de produção de *A. brasiliense*, visando utilizar o microrganismo na formulação de inoculantes agrícolas.

Os objetivos específicos são:

- estudar a influência da concentração inicial de duas fontes de carbono (frutose e glicérol) sobre o crescimento microbiano, determinando qual é mais adequada, do ponto de vista de processo e do ponto de vista econômico;
- determinar a temperatura mais apropriada ao crescimento bacteriano, para cada substrato utilizado;
- comparar os processos contínuo e descontínuo para a produção de *A. brasiliense*!

• determinar a velocidade específica de respiração da cultura e, em consequência, as condições de agitação e aeração necessárias ao processo.

A par desses objetivos, também se pretende efetuar uma avaliação econômica preliminar da viabilidade da produção de inoculantes, utilizando, quando possível, os resultados obtidos neste trabalho.

2 - FATORES IMPORTANTES PARA O DESENVOLVIMENTO DE
UM PROCESSO DE CULTIVO DE MICROORGANISMOS

Um processo de cultivo de microrganismos é caracterizado princí-
palmente por:

- microrganismo(s)
- meio de cultura
- condições de operação (pH, temperatura, agitação, aeração, neces-
sidade de assepsia)

- tipo de processo (descontínuo, contínuo, semi-contínuo, em um ou
vários estágios, com ou sem reciclo de células e/ou nutrientes).
Pelas razões já expostas no Capítulo 1, neste trabalho foi utilizá-
do *A. brasiliense* sp 245, em cultura pura. A seguir, neste capítulo
lo, são examinados alguns dos outros fatores mencionados procurando
ênfatizar os aspectos já conhecidos para o microrganismo em questão.

2.1 Meio de Cultura

A formulação de um meio de cultura para um processo industrial é
uma verdadeira arte, que deve compatibilizar, a um só tempo, distín-
tos objetivos como baixos custos, disponibilidade de matérias-prim-
as, altos fatores de conversão e facilidade de separação dos produ-
tos e subprodutos e disposição dos efluentes.
Segundo STANBURY & WHITAKER [180] em escala industrial deve-se
usar fontes baratas de nutrientes, que atendam, tanto quanto possí-
vel, os seguintes critérios:

- fornecem o máximo rendimento do produto ou biomassa por grama de
substrato utilizado;
- produzem altas concentrações de produtos ou de biomassa;
- permitem as maiores velocidades de formação de produtos ou biomassas

sa;

- tenham baixos rendimentos em produtos não-desejados;
- sejam baratas, de qualidade compatível e facilmente disponíveis durante todo o ano;
- causem poucos problemas em outros aspectos do processo de produção, particularmente aerção e agitação, extração, purificação e tratamento de resíduos.

CORBETT |047| salienta ainda que se evite incluir nos meios de cultura qualquer produto que tenha apenas um único fabricante ou fornecedor. Nesse sentido, DIMMLING |061| e RATLEDGE |159| vão mais além e alertam que em tempos de inflação, recessão, protecionismo comercial, barreiras alfandegárias e outros fatores que possam rapidamente desarticular a produção, é necessário contar com matérias-primas alternativas que contornem ou amenizem os problemas causados pela escassez de um produto ou pela súbita elevação de preços.

Por outro lado, pensando-se na facilidade de preparo do meio de cultura deve-se procurar trabalhar com o menor número possível de componentes, dando-se preferência àqueles que têm diversos nutrientes em sua composição. Também para facilitar o preparo deve-se preferir componentes que não exijam esterilização em separado ou por processos especiais (filtração, irradiação, exposição gasosa, por exemplo).

Em qualquer meio de cultura para o cultivo microbiano são necessárias fontes de carbono, nitrogênio, fósforo, macronutrientes (Na, K, Mg, Ca, Fe, S, Cl) e energia. Eventualmente, dependendo do microrganismo, dos produtos desejados e da velocidade com que se pretende conduzir o processo, podem ser necessários microelementos (Zn, Sn, Cu, Mn, Mo, B, I, F, Fe, Co, Si) , vitaminas e fatores de crescimento |113|. Para o isolamento e crescimento de *A. brasilense*, meios de cultura ra de diversas formulações vem sendo utilizados.

Quando da descrição do gênero e da espécie, TARRAND et alii [192] demonstraram que *A. brasiliense* não utilizava glicose nem sacarose como fontes de carbono, podendo usar entretanto, os seguintes compostos: frutose, malato, piruvato, fumarato, succinato, oxaloacetato, gluconato, β-hidroxi-butilato, glicerol e que algumas cepas também utilizam propionato, galactose, arabinose e citrato. A composição de sais nesse trabalho de isolamento e classificação incluiu: K_2HPO_4 , $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, Na_2MO_4 , $MnSO_4$, $NaCl$, $CaCl_2$, $(NH_4)_2SO_4$; biotina, extrato de levedura e azul de bromotimol também foram adicionados ao meio.

NELSON & KNOWLES [133] para o cultivo contínuo de *A. brasiliense* utilizaram meio de composição salina semelhante ao já mencionado, sem adição de azul de bromotimol e com ácido málico como fonte de carbono.

Em 1980, BALDANI & DOBEREINER [105] utilizaram meio NFB para o cultivo dependente da fixação de nitrogênio de *A. brasiliense* e *A. lipoferum*. Tal meio tinha a seguinte composição, por litro: 5g de ácido málico; 0,5g de K_2HPO_4 ; 0,2g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,1g de $NaCl$, 20mg de $CaCl_2$; 2 ml de solução de microelementos, 2 ml de solução alcoólica de azul de bromotimol a 5%, 4 ml de $FeEDTA$ a 1,64% e 1 ml de solução de vitaminas e 4g de KOH . A solução de micronutrientes era composta de 200mg de $Na_2MO_4 \cdot 2H_2O$, 235mg de $MnSO_4 \cdot H_2O$, 280mg H_3BO_3 , 8mg de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ e 24mg de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ em 200 ml de água. A solução de vitaminas continha 100mg biotina e 200mg de piridoxina por litro de água.

Para o cultivo não dependente da fixação de nitrogênio o meio NFB era suplementado com 0,53g de NH_4Cl/l [105].

Vários trabalhos foram realizados com o meio NFB [148,149] ou com meios bem parecidos [196].

Pensando-se em termos industriais, entretanto, devem-se procurar

2.4

rar alternativas ao meio NFB, pois a sua principal fonte de carbono (ácido málico) é uma substância de difícil obtenção |051| somente passível de utilização em trabalhos de laboratório. Também a formação incluindo micronutrientes e vitaminas talvez não seja adequada da pelo alto custo e dificuldade de preparo.

Assim, procurou-se a seguir efetuar um levantamento das fontes de carbono, nitrogênio, fósforo, micronutrientes e vitaminas potencialmente utilizáveis no processo de produção de *A. brasiliense* e uma discussão a respeito das implicações da utilização de algumas delas.

2.1.1 Fontes de Carbono

DOBEREINER & PEDROSA |065| efetuaram recentemente uma completa revisão sobre o metabolismo de carbono das espécies de *Azospirillum brasiliense* possui a via glicolítica completa (via EMP) e também o ciclo dos ácidos tricarbóxicos (ciclo de Krebs), mas apenas parte da via Futner Doudoroff (FD) |079,122|. Assim, para esta espécie, as principais fontes de carbono (externas aos ciclos metabólicos presentes) são: frutose, glicérol, gliconato e lactato, como esquematizado na Figura 2.1. Glicose não pode ser utilizado por *A. brasiliense*, porque as células desta espécie não possuem um sistema de transporte para este nutriente |053,085|. Nesta tese foram investigados alguns aspectos do crescimento microbiano e feitas avaliações econômicas da utilização de frutose ou de glicérol como principais fontes de carbono.

2.1.1.1 Frutose

Como já mencionado, uma completa revisão sobre o metabolismo de carbono das espécies de *Azospirillum* foi efetuada recentemente [65]. Assim, neste item serão apenas ressaltados os aspectos mais importantes da utilização de frutose por *A. brasilense*. Para esse assunto, as principais referências são: DAS & MISHRA [54,056], GOEBEL [078], GOEBEL & KRIEG [079], GUPTA & GHOSH [085], LOH et alii [116], MARTINEZ-DRETS et alii [122], OKON et alii [145], WESTBY et alii [207].

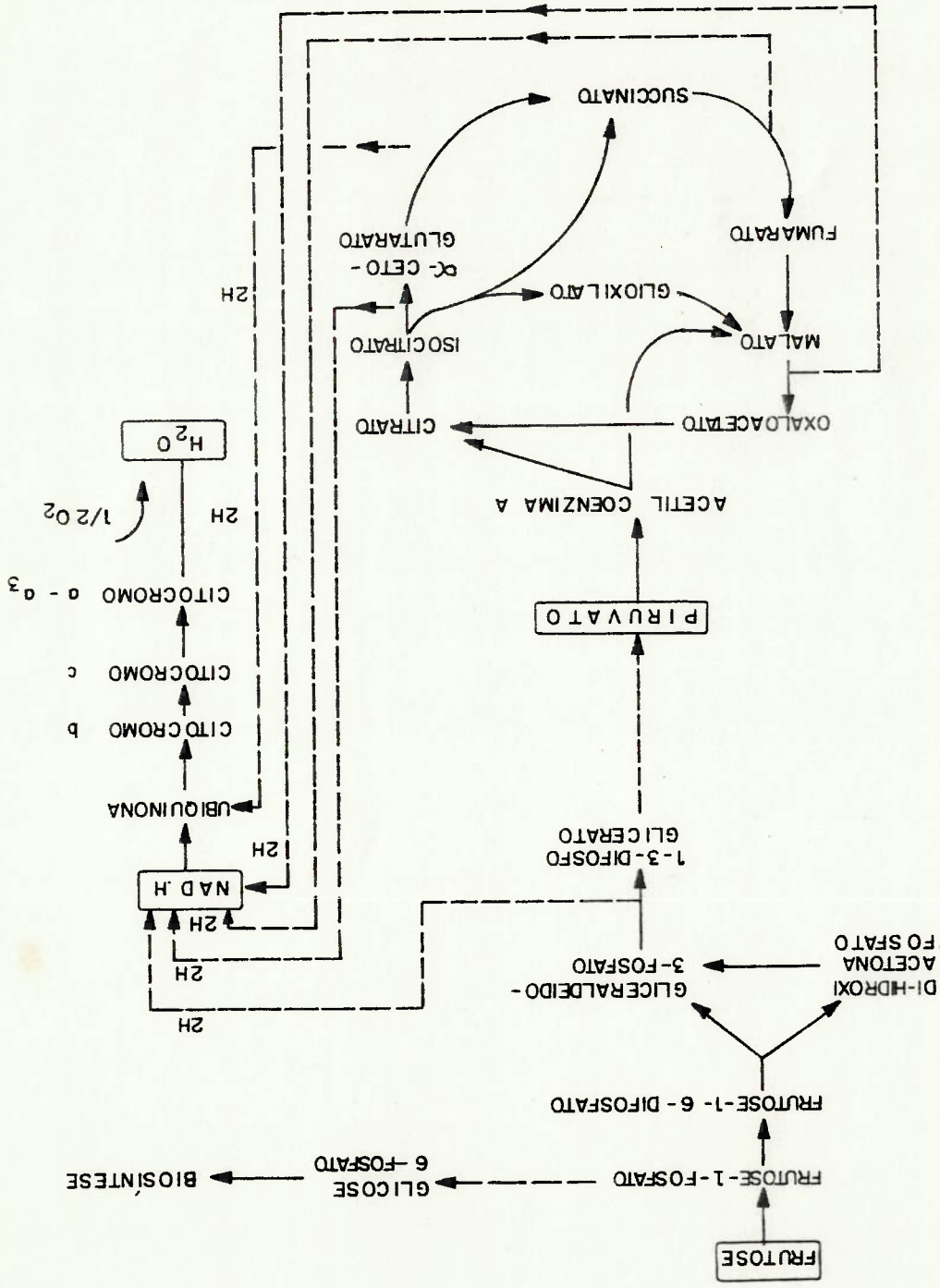
A Figura 2.2 apresenta um esquema bem resumido da integração entre as diferentes etapas do metabolismo de frutose em *A. brasilense*: via glicolítica, ciclo dos ácidos tricarbóxicos e cadeia respiratória. Para explicações gerais a respeito das etapas do metabolismo, consultar DOELLE [066], GOTTSCHALK [082], LEHNINGER [113], STANIER et alii [182].

A primeira etapa do consumo de frutose por *A. brasilense* é o seu transporte e fosforilação simultâneos através de um sistema de translocação de grupo designado PEP-PTS ("phosphoenolpyruvate-phosphotransferase system") [085] cujas principais características podem ser vistas em HUNTER [095] e POSTMA et alii [155].

O produto fosforilado desse transporte é frutose-1-fosfato, que em seguida é novamente fosforilado e o composto formado (1,6-frutose-difosfato) é clivado em dihidroxiacetona fosfato e gliceraldeído-3-fosfato. Das duas trioses fosforiladas apenas o gliceraldeído-3-fosfato é utilizado nas etapas subsequentes e por isso a dihidroxiacetona fosfato é nele convertida; em seguida, o gliceraldeído-3-fosfato é convertido em ácido pirúvico em cinco etapas comuns da via glicolítica [095,182].

O ácido pirúvico entra no ciclo dos ácidos tricarbóxicos (ci-

FIGURA 2.2 - INTEGRAÇÃO ENTRE A VIA GLICOLÍTICA, O CICLO DOS ÁCIDOS TRICARBOXÍLICOS, O DESVIO DO GLIOXILATO E A CADEIA RESPIRATÓRIA, PARA O CONSUMO DE FRUTOSE POR A. BRASILENSE. (ADAPTADO DE 079,116,122,176).



clo de Krebs) que produz a maior parte da energia para o crescimento de *A. brasiliense* e também produz intermediários necessários à biossíntese. Na verdade, a via glicolítica e o ciclo dos ácidos tricarbóxicos são os responsáveis pela formação dos oito precursores biossintéticos, a saber: glicose-6-fosfato gliceraldeído-3-fosfato, ac.-3-fosfoglicérico, ac. fosfoenolpirúvico, ac. pirúvico, acetil-coenzima A, ac. oxaloacético, ac. α -cetoglutarico | 057, 095, 182|. No caso de *A. brasiliense*, glicose-6-fosfato é produzida por isomerização da frutose-1-fosfato | 122| (cf. figura 2.3).

Para evitar que o ciclo de Krebs se interrompa devido ao consumo dos citados precursores biossintéticos, ocorre o desvio ("shunt") do glicolato, conforme já demonstrado também em *Azospirillum* | 079, 207|: o ácido succínico continua sendo produzido (apesar do consumo parcial do ac. α -cetoglutarico) em conjunto com o glicolato (ver figura 2.2), que subsequentemente vai ser transformado em malato e; finalmente ocorre também a formação do ac. oxaloacético a partir do ac. pirúvico.

Em cada "volta" do ciclo dos ácidos tricarbóxicos, quatro pares de átomos de hidrogênio são removidos (cf. figura 2.3). Um outro par de átomos de hidrogênio provem da fosforilação oxidativa do gliceraldeído-3-fosfato e um sexto par pode ser gerado pela oxidação do piruvato | 057|, embora este último ainda não tenha sido demonstrado em *Azospirillum*.

O par de elétrons proveniente do succinato é "recolhido" pela ubiquinona, enquanto todos os outros o são pelo NADH, no início da cadeia respiratória.

O transporte de elétrons subsequente se faz através dos citocromos b e c e, em certas condições, também através do citocromo aa₃ | 036, 110, 145| como será visto no item 2.1.4.

Por causa dessas possíveis diferenças na sequência do transporte-

te de elétrons na cadeia respiratória e, portanto, no rendimento, da fosforilação oxidativa, ainda não foi totalmente determinado o rendimento em ATP a partir da frutose, para *A. brasiliense*. Na via glicolítica há o ganho líquido de 2 moles de ATP por mol de frutose. E no ciclo de Krebs, em conjunto com a fosforilação oxidativa forma-se 12 moles ATP/mol piruvato quando há três citocromos (sí-tios de conservação de energia) ou 10 moles ATP/mol piruvato, quando ocorrem apenas dois citocromos. |057|

Então, dependendo da espécie bacteriana (e em muitos casos, das condições de cultivo também) pode-se obter um máximo de 26 moles de ATP por mol de frutose completamente oxidado a CO_2 e H_2O , contra, por exemplo, 38 moles formados em levedura pela mesma oxidação |082,130,185|.

Frutose como principal fonte de carbono para o meio de cultura para produção de *A. brasiliense* apresenta algumas das características citadas por STANBURY & WHITAKER |180|:

- embora ainda que não se conheçam os fatores de conversão de monô-

-sacarídeos em *Azospirillum* pode-se esperar que tais fatores es-

tejam entre 0,40 e 0,60 g cel/g substrato, a exemplo do que ocor-

re com outras bactérias crescidas em aerobiose. *E. coli*, por

exemplo, apresentou fatores de conversão entre 0,60 e 0,54g cel/g

glicose quando cultivada entre 15 e 34°C ao passo que *Aerobac-*

ter aerogenes apresentou fatores de conversão de 0,40 e 0,42

g cel/g substrato para o crescimento em glicose e em frutose, res-

pectivamente |006|. Um valor aproximado para o fator de conver-

são de frutose em *A. brasiliense* sp 7 foi por nós calculado a par-

tir dos resultados de DAS & MISHRA |056| (admitindo-se um conteú-

do de proteína celular de 50%), tendo-se obtido 0,50 g cel/g fru-

tose.

- As velocidades de crescimento não dependente de N_2 de *A. brasiliense*

em frutose são bastante expressivas. GOEBEL |078|, por exemplo, relatou que *A. brasiliense* sp 7 em meio de cultura com 10 g frutose/l cultivado em agitador rotativo atingiu a fase estacionária em 28 a 30h, à temperatura de 37°C.

- A formação de sub-produtos durante o crescimento de *A. brasiliense* não chega a preocupar. GOEBEL & KRIEG |079| demonstraram que os produtos finais do cultivo deste microrganismo além de CO₂ e H₂O são apenas alguns ácidos orgânicos, principalmente acético, láctico, glicoxálico, málico, 2-oxoglutárico e β-hidroxibutírico; estes ácidos eram formados em quantidade reduzida e não apresentavam efeito inibidor no metabolismo bacteriano.

- Frutose como componente de meio de cultura, não deverá apresentar problemas de suprimento, quer pela sazonalidade, quer pela exclusividade de fornecimento. Atualmente já existem diversas empresas que a comercializam, principalmente como produto dietético ou para elaboração de alimentos de alta digestibilidade.

- Quanto aos aspectos da influência da frutose nas outras etapas do processo que não o cultivo dos microrganismos, dois devem ser salientados: é necessário esterilizar este componente em separado do restante do meio de cultura, para evitar reações com sais de amônio e aminoácidos que produzem compostos potencialmente inibitórios para o metabolismo bacteriano; e as operações a jusante dos fermentadores (transferências, misturas, distribuição no suporte para preparo do inoculante, etc.) poderão ser prejudicadas pelo aparecimento de agregados ou flocos bacterianos |167|. Este último assunto, muito importante para a concepção do processo como um todo será tratado no item 2.7.1.

2.1.1.2 Glicérol

Glicérol (1,2,3-propan-triol) foi uma das fontes de carbono utilizadas por TARRAND et alii [55] para a caracterização do gênero *Azospirillum* com 100% de respostas positivas para o crescimento nesta substância, para todas as cepas de ambas as espécies, *A. brasilense* e *A. lipoferum*. Posteriormente, foi determinado que o tempo de geração de *A. brasilense* sp 7 a 30°C em aerobiose, era de 11,2 h ($\mu = 0,06 \text{ h}^{-1}$) [207].

Já para a fixação de nitrogênio, foram encontradas baixíssimas velocidades de redução de acetileno quando a mesma cepa foi cultivada com glicérol em condições microaerófilas [122]; este fato não párece restritivo para a produção do microrganismo, uma vez que os genes responsáveis pela fixação de nitrogênio em *A. brasilense* são cromossômicos [065,131] e na associação com as plantas, outras substâncias que podem suportar o crescimento dependente de N_2 estarão disponíveis.

O tempo de geração determinado para *A. brasilense* em glicérol é bem superior aos já encontrados para *Klebsiella pneumoniae* (50 a 100 min), *Bacillus subtilis* (100 min), *Escherichia coli* (130 min) e *Glucanobacter oxydans* (180 min) [114] mas da mesma ordem de grandeza de *Rhizobium japonicum* [027].

Glicérol, em *A. brasilense*, é catabolizado através da segunda etapa da via glicolítica (após transformação em gliceraldeído-3-fosfato (GAP) (cf. figura 2.3) com a subsequente ativação do ciclo dos ácidos tricarbóxicos [207]. Não se conhece ainda como os estágios iniciais dessa transformação acontecem em *Azospirillum*. Pode-se afirmar, com certeza, que a entrada da substância nas células ocorre por difusão facilitada, pois esse é o mecanismo universal de transporte do glicérol por microrganismos [095,114].

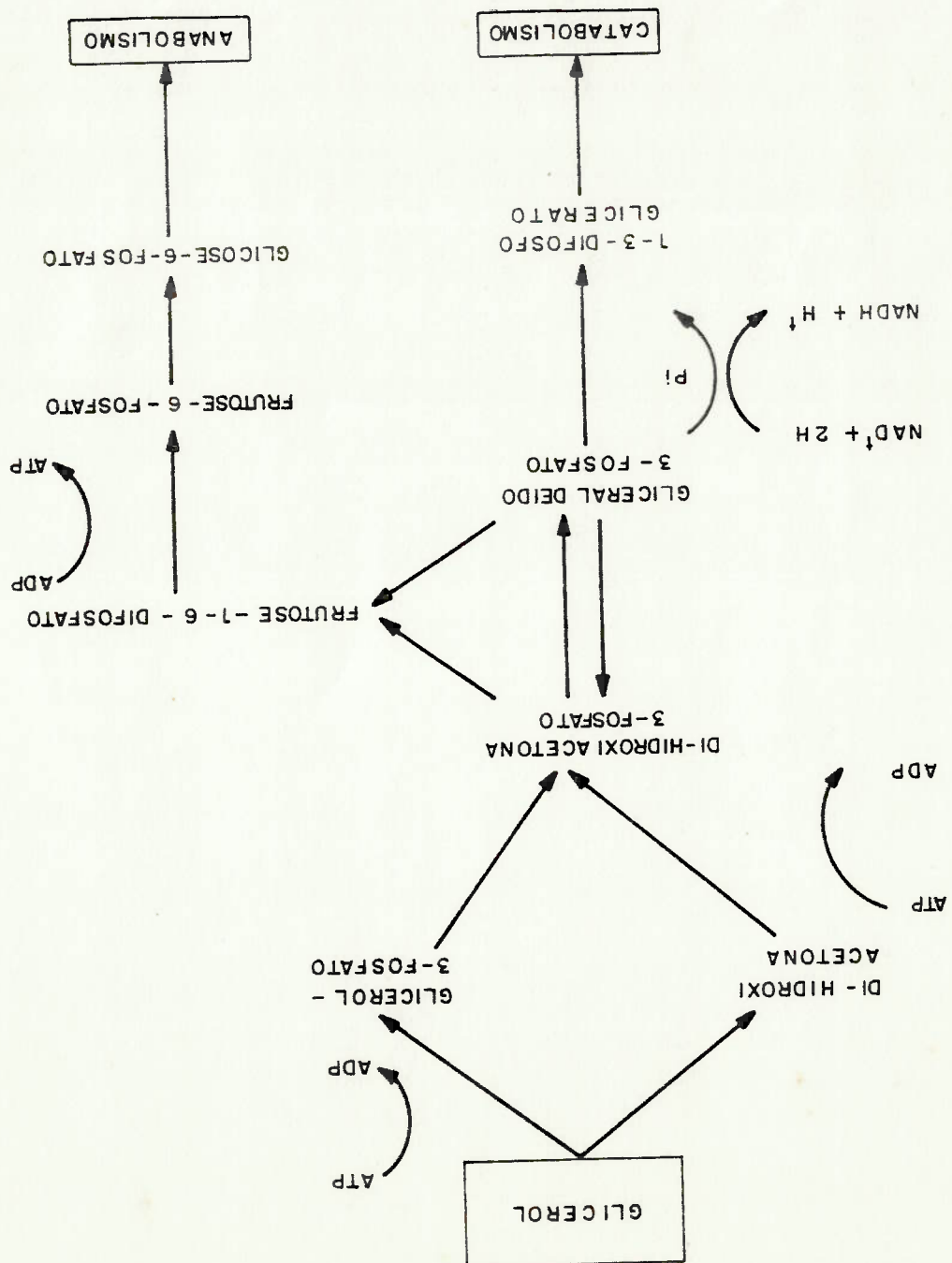


FIGURA 2.3 - ETAPAS INICIAIS DO METABOLISMO DE GLICEROL EM BACTÉRIAS. ADAPTADO DE (114)

O transporte facilitado é, geralmente, muito rápido, com tempo característico de 5 a 20 segundos para obtenção de concentrações de equilíbrio quando as bactérias são imersas em meio de cultura com glicerol. Resultados desse tipo foram obtidos para *E. coli* e para *Shigella flexneri* e *Klebsiella pneumoniae*. |093,161|

Após a entrada do glicerol no citoplasma microbiano há apenas duas maneiras de transformá-lo em GAP: "uma começa com a desidrogenação e subsequente fosforilação e outra inverte a ordem, com a fosforilação seguida pela desidrogenação". |114| (cf. figura 2.3).

Embora estas sequências pareçam óbvias, a diferença dos sistemas enzimáticos envolvidos, a sua ativação, modulação e repressão em função da concentração do próprio glicerol e de outras substâncias faz com que possam ocorrer comportamentos bastante distintos entre as espécies que usam essa substância como fonte de carbono;

para quinze dessas espécies (incluindo os fixadores de nitrogênio *Bacillus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*) |LIN|114| publicou extensa revisão, que embora um pouco antiga, ainda não se encontra por demais desatualizada, pois não houve muitos trabalhos posteriores a esse.

Na maior parte dos microrganismos, apenas uma das rotas de transformação de glicerol em gliceraldeído-3-fosfato atua, de cada vez. Em *Klebsiella pneumoniae*, determinou-se a existência da glicerol desidrogenase em conjunto com a glicerol desidrogenase, como representado na figura 2.3 |166|. Nesse microrganismo, verificou-se que a atividade da glicerol desidrogenase era fortemente influenciada pelo oxigênio dissolvido no meio de cultura: quanto maior a pressão parcial de O_2 , menor a atividade específica da enzima. Em função disso, e de outras indicações foi postulado que a glicerol desidrogenase opera principal-

palmente para a dissimilação oxidativa do glicérol, enquanto a glicérol desidrogenase é mais importante no crescimento anaeróbio. [114] Como salientado por esse último autor, a possibilidade da ocorrência simultânea das duas enzimas aumenta quando o cultivo, embora aeróbio, vai se tornando limitado em oxigênio, conforme aumenta a concentração celular, caso bastante comum em culturas em incubador rotativo.

O crescimento de bactérias a partir do glicérol, (bem como a partir de outros compostos de 3 ou 4 átomos de carbono, como os ácidos láctico, pirúvico, málico e succínico) depende da produção de frutose-1-6-difosfato, e sua transformação em glicose-6-fosfato (G6P), como representado na figura 2.3 [057,182] e em A. brasileira todas as etapas da glicogênese já foram demonstradas [207].

Deve-se observar que em termos de gasto de energia para a produção de G6P, os processos a partir de glicérol ou de frutose são equivalentes. No caso da frutose (cf. figura 2.2) a produção de 1 mol de frutose-1-fosfato através do sistema PFP-PTS representa um dispêndio de 1 mol de ATP; as isomerizações subsequentes não requerem energia.

Para o glicérol não há gasto de energia no transporte (difusão facilitada) [095] mas a formação da dihidroxiacetona 3-fosfato requer um mol de ATP qualquer que seja o caminho (cf. figura 2.3). Para a formação da frutose-1-6-difosfato 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 ATP gasto por mol G6P formado.

O rendimento energético a partir do glicérol pode ser calculado, lembrando-se que na via glicolítica há um ganho líquido de 1 mol de ATP (um mol é gasto na fosforilação do glicérol, um é recuperado na formação do ac. fosfoglicérico e outro é armazenado na

Formação do ácido pirúvico a partir do ácido fosfoenolpirúvico [082] e no ciclo de Krebs em conjunto com a fosforilação oxidativa pode-se obter de 10 a 12 ATP/mol piruvato [185]. Assim, no total, deve-se esperar de 11 a 13 ATP/mol glicérol.

Esse rendimento é equivalente ao obtido da frutose, raciocinando-se em termos do número de átomos de carbono de cada substrato. Em relação aos critérios de STANBURY & WHITAKER [180] para escolha de substâncias para composição de meios de cultura, glicérol apresenta as seguintes características:

- Barato: enquanto frutose custa Cz\$4.800,00/kg, glicérol custa Cz\$1.000,00/kg. (preço de abril de 1988. ver capítulo 7).

- A exemplo do encontrado para outras bactérias (*E. coli*, *Klebsiella*, dentre elas) o fator de conversão de glicérol em *A. brasiliense* deve estar entre 0,45 e 0,50 g cel/g glicérol [006].

- A velocidade de crescimento de *A. brasiliense* em glicérol não é tão elevada quanto em frutose: praticamente o único valor disponível é de tempo de geração de 11,2 h [207].

- É produzido em grande quantidade, no Brasil; em 1985 havia 30 unidades produtoras distribuídas em 9 estados da Federação, com produção total de 21.700 t [004]. Esse perfil atende muito bem à necessidade de suprimento contínuo e descentralizado.

- As operações que envolvem o manuseio do glicérol não são muito complicadas, nem perigosas: ele não é tóxico à inalação, nem inflamável. Sua elevada viscosidade (1500 cp) não chega a causar problemas numa unidade industrial e uma vantagem expressiva é que ele pode ser esterilizado em conjunto com o restante do meio de cultura.

- A presença de glicérol faz aumentar a viscosidade do meio de cultura (cf. tabela 2.4), mas como não se pretende utilizar concentrações de glicérol superiores a 20 g/L, a viscosidade do meio

em condições de fixação de nitrogênio atmosférico [142].
cultivo em meio líquido eram de 1 a 2 h com amônia, e de 5,5 a 7 h
Para *S. lipoferum*, foi determinado que os tempos de geração para
as custas da fixação de nitrogênio (ver, por exemplo, a Tabela 2.1).
proteínas) são bem maiores do que para culturas que se desenvolvem
que utilizam nitrogênio combinado (amônia, nitrato, aminoácidos,
tores de conversão e as velocidades de crescimento para culturas
já foi demonstrado para muitas espécies bacterianas que os fa-
do processo.

patibilização da etapa de crescimento celular com as demais etapas
dade da produção, aos fatores de conversão, e à facilidade de com-
térios já citados [180], principalmente os que se referem à veloci-
ser industrialmente viáveis, deve-se levar em consideração os cri-
Para iniciar a discussão a respeito de quais fontes poderiam
elemento para o crescimento microbiano.

ácidos, proteínas e até mesmo nitrogênio gasoso como fontes desse
Assim, a princípio, poder-se-ia empregar amônia, nitrato, amino-
ciclo do nitrogênio, excluindo a nitrificação [065].
As bactérias do gênero *Azospirillum* efetuam todas as etapas do

2.1.2.1 Escolha das Fontes de Nitrogênio

2.1.2 Fontes de Nitrogênio

utilizá-la na produção de inoculantes à base de *Azospirillum*.
bium [027], que ingavelmente terá grande interesse em continuar a
por algumas indústrias produtoras de inoculantes à base de *Rhizo-*
Finalmente, deve-se lembrar que essa substância já é utilizada
culo aproximado pela equação de IRVING [151])
de cultura, no início do processo não ultrapassará 1,20 cp. (ca)

Tabela 2.1 Fatores de conversão para alguns microrganismos com diferentes fontes de nitrogênio.

Microrganismo	Fonte de Carbono	Velocidade específica de Crescimento (h ⁻¹)	Fator de Conversão Molar segundo Fonte de N ₂ (g/mol fonte de carbono)	
			Amônia	Nitrato

Crescimento aeróbio				
<i>Aerobacter aerogenes</i>	glicose	0,67	48,2	
<i>A. Aerogenes</i>	glicose	0,39	24,5	
<i>A. aerogenes</i>	glicose	-	72,7	52,0
<i>Azotobacter chroococcum</i>	manitol	0,05	58,3	8,5
<i>Az chroococcum</i>	manitol	0,14	60,0	38,2
<i>Az chroococcum</i>	manitol	0,25	55,8	45,3
<i>Azobacter vinelandii</i>	sacarose (3 g/l)	0,15	150,0	30,0
<i>Az vinelandii</i>	sacarose (15 g/l)	0,15	80,0	22,0
Crescimento anaeróbio				
<i>Clostridium pasteurianum</i>	sacarose	0,22	70,2	39,4
<i>C. pasteurianum</i>	sacarose	0,39	69,5	43,3
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	lactato	0,05	9,2	3,9
<i>D. desulfuricans</i>	lactato	0,10	9,2	5,6
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	glicose	0,13	29,3	11,7
<i>K. pneumoniae</i>	glicose	0,20	32,7	12,1

FONTE: STOUTHAMER |185| , POST et alii |154| .

Outro inconveniente para o uso do nitrogênio gasoso na produção de microrganismos seria a necessidade de obtenção de baixas pressões parciais de oxigênio |133,144201|, o que obrigaria a trabalhar com nitrogênio e oxigênio puros, em mistura, ou, à reciclagem dos gases efluentes do fermentador com o ajuste da concentração através de sensores e controladores automáticos. Qualquer dos dois

sistemas é bastante complexo (e caro) e pode, evidentemente, ser evitado no caso de se utilizar nitrogênio combinado, em cultivo aeróbico, cuja tecnologia é muito melhor conhecida e bem mais barata. Algumas fontes de nitrogênio combinado foram estudadas para o

crescimento de *Azospirillum*. DAS & MISHRA [052] demonstraram que *A. brasilense* sp 7 pode desenvolver-se adequadamente com NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ou uréia, mas com KNO_3 houve um crescimento limitado, o que levou os autores citados a lançar a hipótese de que o nitrato proveniente da assimilação do nitrato poderia acumular-se nas células, causando inibição; esta hipótese, entretanto, discorda dos resultados de muitos outros autores (ver p.35 de DOBEREINER & PEDROSA [065]) para quem *A. lipoferum* e *A. brasilense* não acumulam nitrato, nem no crescimento aeróbico nem no anaeróbico.

Outro efeito importante da utilização do nitrato para as cepas *A. brasilense* sp 7 e *A. lipoferum* sp 59 b foi o aparecimento de intensa flocculação, particularmente quando se usou frutose (de 1,5 a 18 g/l) como fonte de carbono [167]. Dos nitratos testados KNO_3 foi o que induziu maior flocculação, em ambas as cepas. Nesse mesmo caso verificou-se que NH_4Cl e glutamato também levaram à formação de flocos, quando frutose era usada a 1,5 g/l, mas com intensidade bem menor que a obtida com os nitratos.

Fontes de nitrogênio orgânico também foram estudadas [053]: aminoácidos, ácidos casamínicos, peptona e extrato de levedura. Diferentes comportamentos foram obtidos no tocante ao estímulo e repressão da nitrogênase e ao crescimento de *A. brasilense*. Para diversos aminoácidos (glutamina, asparagina, leucina, lisina, alanina, ácido aspártico, ácido glutâmico, tirosina, treonina, valina, prolina, serina, histidina), a velocidade de crescimento aumentou com o aumento da concentração do aminoácido entre 2 e 8 mM (que foi a faixa estudada): glicina e cistina, entretanto, causaram efe-

to inibitório ao crescimento na concentração de 8 mM; glutamina foi o aminoácido individualmente consumido com maior rapidez, seguido por asparagina, lisina, alanina, ácido aspártico e ácido glutâmico. Essa maior velocidade no consumo de glutamina como fonte de nitrogênio está de acordo com o que se conhece acerca da assimilação de NH_4^+ e de aminoácidos por *A. brasilense*, como será visto no item seguinte, e está de acordo também com os resultados apresentados recentemente [208].

As outras fontes de nitrogênio orgânico (ácidos casamínicos, peptona e extrato de levedura, testadas em concentrações entre 0,05 e 5 g/l mostraram-se estimulantes para o crescimento, devendo-se salientar também que concentrações dessas fontes entre 0,05 e 0,50 g/l não reprimiram a atividade da nitrogenase [053].

Com as informações expostas, pode-se concluir que para o processo de produção de *A. brasilense* deve-se preferir amônio (evitando o nitrato) como fonte de nitrogênio, uma vez que essa substância conduz a maiores fatores de conversão e velocidades específicas de crescimento do que o nitrogênio gasoso e apresenta sobre as fontes orgânicas, a vantagem de ser mais abundante e barata.

2.1.2.2 Assimilação da Amônia e de Aminoácidos em *A.*

brasilense

Para facilitar alguns aspectos da discussão dos resultados, principalmente no tocante aos efeitos do nitrogênio presente no extrato de levedura sobre o crescimento de *A. brasilense* é importante descrever as formas de assimilação de amônia e aminoácidos em bactérias. [030,182,196]

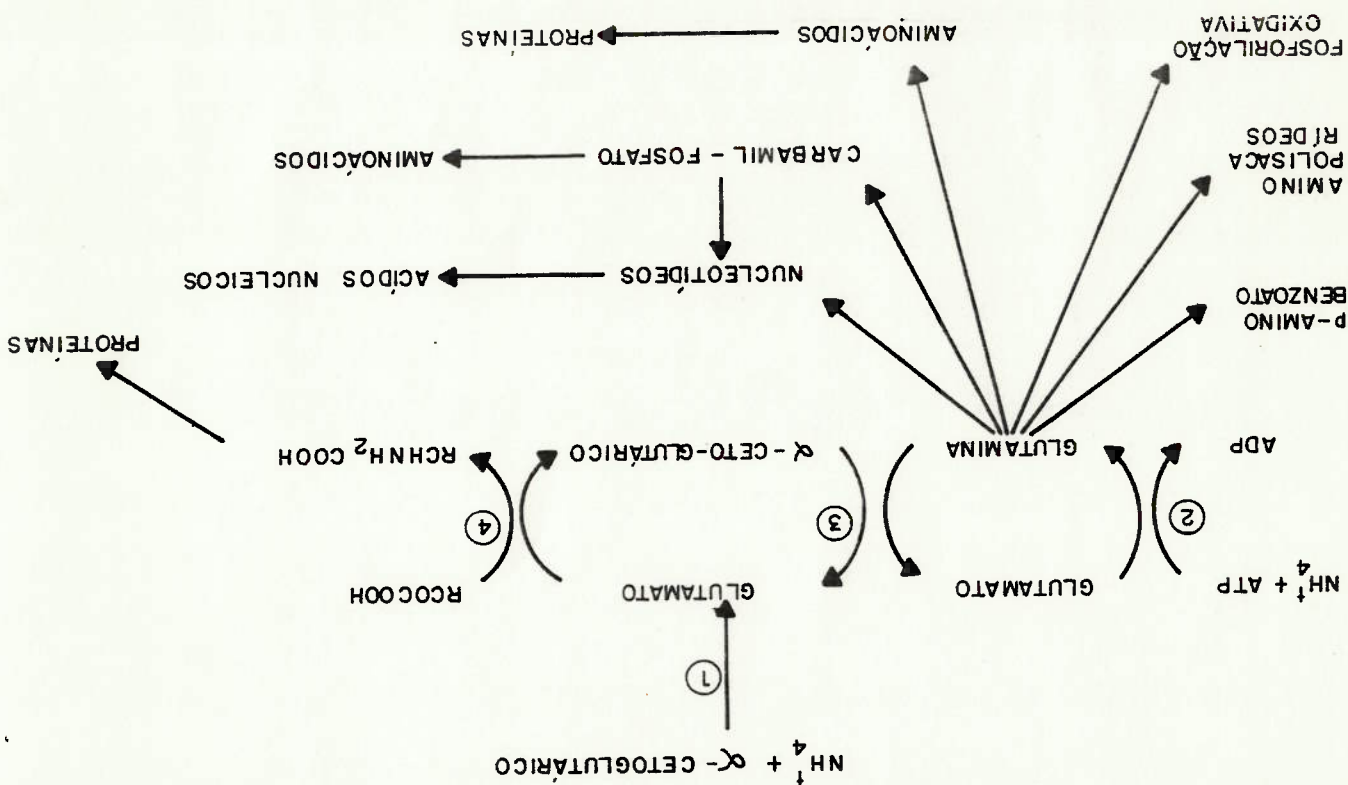
A primeira etapa para assimilação de amônia (e de aminoácidos) é o seu transporte ativo através da membrana celular. Embora

ainda não se conhecem exatamente os mecanismos e o gasto energético desse transporte sabe-se que a concentração interna de amônia quando ela mesma é usada como única fonte de nitrogênio varia, para diferentes microrganismos, de 1,4 a 10,8 mM |048,081,172|; quando glutamato foi usado em lugar da amônia, as concentrações intracelulares desta caíram para 67 a 78% daquelas observadas quando amônia era usada |048,172|; as concentrações intracelulares de amônia são mantidas contra gradientes bastante elevadas, que podem chegar de 58 a 100 vezes |081,103|. Também para *A. brasilense* já foi demonstrada a existência de um sistema ativo de transporte de amônia, repressível e dependente de energia |090|, sem entretanto se determinar as concentrações internas ou os gradientes máximos.

Após o transporte, amônia entra no metabolismo bacteriano através de três reações, para formar glutamato e glutamina, como esquematizado na figura 2.4, com o envolvimento de três enzimas: glutamato desidrogenase (GDH), glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase (GOGAT).

As propriedades e a fisiologia da produção das três enzimas em diversos microrganismos foram revistos por TYLER |199| e trabalhos específicos para *A. brasilense* também foram publicados |016,160,208|. Não se conhece ainda exatamente qual sistema enzimático (GDH ou GS-GOGAT) seria o predominante em *A. brasilense* para a produção do glutamato, e essa questão é relevante do ponto de vista bioenergético e de processo, pois quando GDH atua não há gasto de ATP e \bar{pO}_2 de-se obter, no máximo, 28,8 g cel/mol ATP gerado pela fonte de carbono e quando GS-GOGAT é o sistema atuante há um gasto de 1 mol de ATP por mol NH_4^+ incorporado e o valor máximo de Y_{ATP} que se pode esperar é 23,1 g cel por mol ATP |186|.

A maior parte dos estudos acerca da importância relativa dos sistemas para assimilação de amônia por *A. brasilense* indicava que



- ENZIMAS ENVOLVIDAS
- (1) GLUTAMATO DESIDROGENASE (GDH)
 - (2) GLUTAMINA SINTETASE (GS)
 - (3) GLUTAMATO SINTASE (GOGAT)
 - (4) TRANSAMINASES

FIGURA 2.4 - ESQUEMA DA ASSIMILAÇÃO DE AMÔNIA EM BACTÉRIAS (199)

que são usados diretamente dispensam a ativação dos sistemas enzimáticos para formação de glutamato (e glutamina). Os aminoácidos te pelo anabolismo, enquanto outros entrarão nas reações de transmisturas de aminoácidos, alguns deles poderão ser usados diretamente. Deve-se mencionar ainda que no caso de ocorrer suprimento de

mo, introduzindo "lags" no crescimento celular. açúcares ou ácidos orgânicos [199] e isto pode atrasar o anabolismo, sempre estão presentes quando as fontes de carbono e energia são formação ou ativação de sistemas enzimáticos específicos que nem não, mas também como fonte de carbono e energia, há necessidade de Quando os aminoácidos são usados não só como fonte de nitrogênio, co, numa reação exatamente inversa à de nº 4 da figura 2.4.

transaminação, pela adição de grupo amino ao ácido α -cetoglutárico através das rotas bioquímicas já conhecidas [113] ou por reações de formação de glutamato, quer pela degradação direta do aminoácido as etapas iniciais são melhor conhecidas: o metabolismo passa pela Em relação ao consumo de aminoácidos como fontes de nitrogênio, celular.

diferentes condições de pH, temperatura e fases do desenvolvimento realiza-las para outros substratos (que não malato e aminoácidos) e as conclusões parecem bem fundamentadas, embora seja preciso generalização seletiva das enzimas e amônia marcada) desse último trabalho, Devido aos objetivos específicos e à metodologia cuidadosa (inibitqu岸o o outro exerceria atividade preponderantemente catabólica, se que o sistema predominante seria sempre o primeiro citado, em hipótese, entretanto foi recentemente contestada [208] estabelecendo da, passaria a predominar a catalise pela GDH [016,141,160]. Essa hipótese sistema principal em atuação seria o GS-GOGAT e quanto mais elevada (NH_4^+) disponível: quando baixa (como na fixação de nitrogênio) o a rota de formação de glutamato variaria com a concentração de

de mente se o crescimento era aeróbio com amônia ou em condições superiores a 3,3, e que essa relação era praticamente independente- xava de ser limitante quando a relação molar glicose/fosfato de concentração de fosfato de 0,25 mM (0,044 g K_2HPO_4/L), ele de- *pneumoniae* em processo contínuo, foi estabelecido que para a faixa No primeiro deles [023], que trata do cultivo de *Klebsiella* de bactérias fixadoras de nitrogênio podem ser destacados.

ótimos de fosfato para o crescimento bacteriano, três que tratam tenham sido efetuados muitos trabalhos de determinação de níveis para atender às necessidades dos microrganismos [068]. Embora não De forma geral, foi proposta uma faixa muito ampla (0,3 a 300mM) trientes de características ácidas ou básicas [068,113].

para evitar ou diminuir a variação de pH devido ao consumo de nu- tos como fontes de fósforo é que eles podem atuar como "tampões" Outra característica extremamente importante e útil dos fosta- N_2 incluem HPO_4^- ou $H_2PO_4^-$ ou ambos.

Todos esses meios, quer para o crescimento, quer para fixação de RAND et alii [192] e mais recentemente por BALDANI & DOBEREINER [015]. dos formulados por DOBEREINER & DAY [064], OKON et alii [142], TAR- Para *Azospirillum*, os meios básicos que são utilizados derivam por exemplo) também podem ser utilizados [068].

são os fosfatos, embora alguns compostos orgânicos (glicerofosfato, As fontes usuais de fósforo para o crescimento do microrganismo

2.1.3 Fontes de Fósforo

levedura e outros suplementos protéicos (cf. 2.1.4.3). que torna potencialmente interessante a utilização de extrato de aumenta o aproveitamento dos compostos e da energia disponível, o máticos específicos e isto, além de apressar o metabolismo, ainda

fixação de nitrogênio.

Em outro trabalho |086| foi estabelecido uma concentração crítica de fosfato, acima da qual a velocidade específica de crescimento de *Azotobacter vinelandii* não mais aumentava. Essa concentração era de 250 mg PO_4^{3-}/l , para uma concentração inicial de glicose de 40 g/l, o que representa uma relação molar de aproximadamente 1 mol de fosfato para 85 moles de glicose.

Também para *Az. vinelandii*, foi efetuado um trabalho bastante completo, comparando parâmetros fisiológicos e bioquímicos de culturas crescidas em cultivos descontínuos em diferentes concentrações iniciais de fosfato. A condição em que fosfato tornou-se limitante foi a de concentração 37 $\mu M HPO_4^{2-} + 12 \mu M H_2PO_4^-$ para 3 g glicose/l, o que corresponde a uma relação de 1 mol de fosfato para 340 moles de glicose. Os efeitos da limitação do fosfato sobre o metabolismo ocorreriam principalmente na diminuição ou inibição da fosforilação oxidativa, que era acompanhada por um expressivo acúmulo de PHB (chegando a 30% em relação à massa celular no final do cultivo) e decréscimos na relação entre ATP e ADP, nas taxas de respiração e na viabilidade celular, além de alterações profundas na estrutura da parede celular e falta de condições para a formação de cistos. |198|

Os três trabalhos citados realmente comprovam que as necessidades bacterianas por fosfato podem variar em faixas bastante amplas. Para um mesmo microrganismo (*Az. vinelandii*), como se viu, a limitação de fosfato segundo autores diferentes ocorreu para relação de 1 mol de fosfato para 85 moles de glicose |086| ou para 340 moles de glicose |198|.

Para *Azospirillum* a concentração de íons fosfato que deve ser adicionada ao meio de cultura não está muito bem definida. Há referências a utilização, dentre outras, de: 35mm $K_2HPO_4 + 30mm KH_2PO_4$

2.25 |201|, 23 mM K_2HPO_4 |079|, 5 mM K_2HPO_4 + 3 mM KH_2PO_4 |201| e 3,0 mM K_2HPO_4 (meio NFB |015|).

OKON et alii |201|, por outro lado, asseguraram que concentrações de fosfato maiores que 10 g/l (105 mM) eram inibitórias para *A. brasilense* e resultados posteriores |055| mostraram que isso ocorria apenas quando a concentração de nitrogênio combinado era muito baixa (inferior a 0.15 g/l). Segundo esses últimos autores, para o crescimento aeróbico de *A. brasilense* sp 7 seriam necessários apenas 25 mg fosfato/l, partindo da concentração de 5g frutose, o que equivale a 1 mol de fosfato por 105 moles de frutose.

Podese então concluir que as fontes de fósforo a utilizar no processo de produção de *A. brasilense* são os fosfatos, e a concentração mínima dos mesmos, deverá ser regulada pela concentração da fonte de carbono, enquanto a máxima não deverá exceder 10 g/l, quando houver a possibilidade de limitação de nitrogênio.

2.1.4 Fontes de Micronutrientes, Vitaminas e Fatores de Cres-

cimento

2.1.4.1 Micronutrientes

Uma das mais interessantes características das bactérias como um grupo de microrganismos é a sua extrema diversidade em relação às necessidades por micronutrientes, vitaminas e fatores de crescimento. Para revisões sobre o assunto, consultar DUNN |068|, GURARD & SNELL |084| e KRIEG |108|. Para *Azospirillum brasilense*, as necessidades nutricionais não

2.26
foram ainda completamente esclarecidas. Praticamente todos os trã
balhos realizados com esta espécie têm usado meios de cultura com
os seguintes macronutrientes: Na, K, Mg, Ca, Cl, S e também Fe e
Mo como micronutrientes. Todos eles são adicionados como sais, sen
do que o enxofre é normalmente usado na forma de sulfatos e para o
ferro recomenda-se mantê-lo quelado, quer através de EDTA [015,122],
ácido nitrilotriacético [133] ou solução sequestrante Na-Fe [196].
Estudo recente [008] mostrou que para concentrações de $FeCl_3$ no
meio de cultura inferiores a $10 \mu M$, *A. brasilense* RG produziu um
sideróforo extracelular (chamado "spirillobactin") muito especiali
zado na captação e transporte de $Ion Fe^{+3}$

Quanto aos outros micronutrientes, BALDANI & DOBEREINER [015], reco
mendaram também a adição de Mn, B, Cu e Zn, embora trabalho recen
te de DIAS et alii [059] tenha demonstrado que os citados microele
mentos não alteram em nada o crescimento aeróbico de *A. brasilense*,
na ausência do extrato de levedura. Na presença do extrato de le
vedura ($1,0 g/l$) os micronutrientes influíram positivamente na di
minuição da fase "lag", no aumento da velocidade específica de cres
cimento e do fator de conversão de frutose em células (cf. figura
2.5).

2.1.4.2 Vitaminas

No tocante a vitaminas, a situação está bem definida, pois uma
das características diferenciadoras de *A. brasilense* em relação a
A. lipoferum e *A. haloprae erans* é que o primeiro não precisa de
biotina para crescimento, enquanto os outros dois precisam. A di
ferenciação de *A. brasilense* em relação a *A. amazonense*, que tam
bém não precisa de biotina, é feita através da capacidade especifi
ca do segundo de consumir sacarose, maltose, triose e lactose. [065]

glutâmico (5,6 a 11,6% do peso seco), ácido aspártico (4,7 a 7,1%), 72% sobre o peso seco, com altos teores principalmente de ácido contendo em seis produtos comerciais mostrou variação entre 50 e seu alto conteúdo de proteínas solúveis. Uma investigação desse A importância nutricional do extrato de levedura está ligado ao

trouxe efeitos positivos para o processo industrial |051|. outros suplementos como extrato de carne, peptona, farelo de soja, Também para outras bactérias, a adição de extrato de levedura e cultivos em que a principal fonte de carbono era glicérol (10g/l). exemplo; como bem demonstram os resultados da tabela 2.2 |027| em Esses efeitos foram observados para *Rhizobium japonicum*, por cimento e dos fatores de conversão.

nução da fase "lag" e no aumento da velocidade específica de cres- do processo de produção do microrganismo, principalmente na dimi- cimento") pode ter efeitos altamente desejáveis, do ponto de vista- nesse caso não podem ser formalmente chamados de "fatores de cres- púricas e pirimidícas, fosfolípidos, ácidos graxos, e outros (que compostos orgânicos como amíniácidos, proteínas, vitaminas, bases Entretanto, embora não seja realmente necessária a presença de

cessitam de outros compostos orgânicos já prontos e disponíveis. cessidades já citadas em biotina (de duas das espécies) não ne- rias do gênero *Azospirillum* são muito pouco exigentes. Além das ne- sintetizar a partir de fontes simples de carbono" |82|), as bacté- de constituinte de seu material celular e que não tem capacidade de posto orgânico que um organismo necessita como um precursor ou um Quanto a fatores de crescimento (definidos como "qualquer com-

2.1.4.3 Fatores de Crescimento

2.28 Lisina (3,8 a 5,2%), alanina (3,5 a 5,2%+ e leucina (3,4 a 5,1%) |150|.

O fato de extrato de levedura apresentar altos teores de ácido glutâmico explícita, em grande parte, o efeito acelerador observado, pois como já mencionado, os aminoácidos que DAS & MISHRA |053| demonstraram ser mais rapidamente consumidos por *A. brasiliense* foram glutamina, asparagina, lisina, alanina, ácido aspártico e ácido glutâmico. Todos eles se encontram em boa quantidade no extrato de levedura (ácido glutâmico, ácido aspártico, lisina, alanina) ou podem ser sintetizados rapidamente a partir do próprio ácido glutâmico (cf. figura 2.4).

Para *S. lipoferum*, a diminuição da fase "lag" pela adição de extrato de levedura já foi observada: com 0,05 g de extrato de levedura/l, em conjunto com NH_4Cl e diferentes fontes de carbono (malato, succinato, lactato ou piruvato) houve uma redução de aproximadamente 5 h, quando o tempo total de cultivo sem adição de extrato de levedura era de 25 h. Ou seja, a adição de pequena quantidade de suplemento levou a um aumento de produtividade da ordem de 20% |140|.

Em estudo recentemente publicado usando a mesma linhagem e a metodologia empregadas nesta tese, demonstrou-se que o uso de extrato de levedura na concentração de 1 g/l fez diminuir em 32% o tempo de crescimento e em 50% a fase "lag", com aumentos de 45% na velocidade específica de crescimento, 28% no fator de conversão de frutose em células e 106% na produtividade, em relação ao cultivo sem extrato de levedura. O efeito de concentrações crescentes de extrato de levedura sobre o comportamento bacteriano pode ser visto na figura 2.5 |059|. Nesta mesma figura estão colocados resultados da utilização de um outro suplemento que apresenta interesse industrial, a água de levedura ("yeast water"), um autolizado de

Tabela 2.2 Variação da velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}) e da velocidade de crescimento linear (V) em função das concentrações de extrato e de água de levedura no cultivo de *R. japonicum*. (BONOMI|027|).

Conc. de Extrato de Levedura (g/l)	μ_{max} (h^{-1})	V ($g/l \cdot h$)
8,0	0,061	0,087
4,0	0,059	0,059
0,5	0,035	-

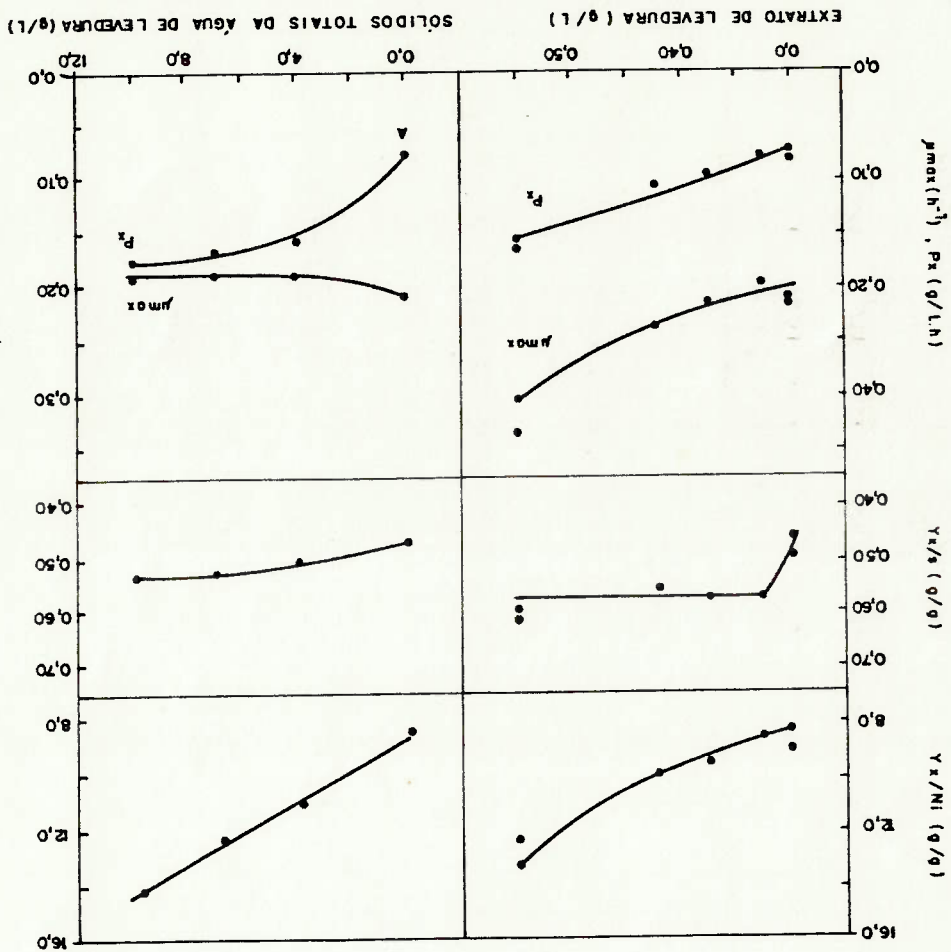


FIGURA 2.5 - VELOCIDADE ESPECÍFICA MÁXIMA DE CRESCIMENTO CELULAR (μ_{max}), PRODUTIVIDADE CELULAR (P_x) E FATORES DE CONVERSÃO DE FRUTOSE (Y_{x/S}) E DE NITROGÊNIO INORGÂNICO (Y_{x/Ni}), EM CÉLULAS SE- GUNDO A CONCENTRAÇÃO DE EXTRATO DE LEVEDURA E SEGUNDO A CONCENTRAÇÃO DE SÓLIDOS NA ÁGUA DE LEVEDURA. (• SEM MICRONUTRIENTES, ◦ COM MICRONUTRIENTES) FONTE: DMS ET ALII (59).

Já nas instituições norte-americanas a diversidade tem sido bem grande: 30°C na Universidade McGill (Canadá) |076,061,133,196|, na Un̄ versidade de South Dakota (EUA) |207,203| e na Universidade de Wisconsin (EUA) |089,140,141,142,144| se bem que nesta última também se tenha realizado um importante trabalho a 33°C |122| ; 34°C na Univer̄

e a 37°C |085|. se mesmo Instituto, outros trabalhos foram feitos a 32°C |008,129| 136,137,191| e no Instituto Bose de Calcutá (Índia) |052,053,054,056|. Nes̄ pregado 30°C como na Universidade de Jerusalém (Israel) |017,018,135, Por exemplo, nas universidades e institutos asiáticos tem-se em raturas para o cultivo de *A. brasiliense*.

com essas bactérias demonstram "preferências" por diferentes temp̄ Observa-se entretanto, que os grupos de pesquisa que trabalhavam estava entre 36 e 38°C.

A. lipoferrum determinaram que a temperatura ótima para crescimento TARRANO et alii |192| ao descrever as espécies *A. brasiliense* e

2.2.1 Temperatura Ótima para Cultivo de *A. brasiliense*

2.2. Temperatura

que eles proporcionam |059|. são, uma vez avaliados os custos para sua utilização e os retornos veis efeitos de aumento de produtividade e de fatores de conver- trato ou água de levedura, pode ser interessante, devido aos possí- do necessária ao desenvolvimento de *A. brasiliense* a adição de ex- Em conclusão a este item pode-se estabelecer que mesmo não sen- a 25% do conteúdo celular. |150|

dimentação para separação dos resíduos sólidos e que contêm de 20 etanol), submetido a operações de clarificação ou filtração ou se fermento comercial (ou levedura seca, subproduto de destilarias de

2.31

sidade Rutgers |167| e 37°C no Instituto Politécnico e Universidade de Virgínia |079| e na Universidade de Ohio |116|.

Nas universidades européias tem-se usado quase sempre 37°C para os estudos com *Azospirillum*, tendo-se como exemplo trabalhos na Alemanha |096,097,104|, Inglaterra |149| e Polónia |040|. Mesmo assim as "preferências" dos grupos de pesquisa ainda prevalecem pois na Alemanha foram também realizados trabalhos a 30°C |090| e a 34°C |028|, enquanto na Itália foi utilizada 30°C |160| e 35°C |016|.

Nas instituições brasileiras em que se pesquisa *Azospirillum* (EMBRAPA e Universidade Federal do Paraná) tem-se utilizado para quase todos os trabalhos a temperatura de 37°C, embora VOLPON et alii |201| tenham cultivado *A. lipoferum* a 35°C.

Os trabalhos mencionados neste item, em que diferentes temperaturas foram usadas, tratam de assuntos diversos: crescimento com ou sem fixação de nitrogênio, fontes de carbono e nitrogênio para o crescimento e fixação, fisiologia dos microrganismos, produção de carotenoides e poli-β-hidroxi-butarato, aspectos enzimáticos do crescimento e da fixação, e outros, sem que haja qualquer critério para orientar as "preferências" citadas (p.ex: fixação em temperaturas baixas, crescimento em temperaturas altas ou vice-versa).

Aparentemente os autores supra citados não se incomodam com o fato de que a própria temperatura possa motivar as variações do comportamento microbiano, como por exemplo, foram observadas no câ tabolismo de frutose, estudado a 30°C |054,056,141,207|, a 33°C |122| e a 37°C |079| ou nas atividades das enzimas de assimilação de amônia que foram estudadas a 30°C |141,160,208| e a 35°C |016|. Faz-se necessário então um certo rigor na análise e comparação dos resultados, principalmente nos seus aspectos quantitativos.

2.2.2 Influência da Temperatura na Velocidade de Crescimento de Microrganismos

O crescimento microbiano e a formação de produtos são os resultados macroscópicos de uma série de reações químicas e enzimáticas. Como todas as reações são influenciadas pela temperatura, pode-se afirmar que esta é a condição ambiental que, isoladamente, mais influencia o comportamento microbiano.

Conforme assinalado por FORAGE et alii (1974) a temperatura de cultivo, pode levar a diferenças na composição celular (em termos de proporções de polissacarídeos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos) na estabilidade genética da cepa, na estrutura e espessura da parede/membrana celular, nas reações metabólicas e na capacidade e eficiência de utilização de substratos.

Assim, quando se pensa no desenvolvimento de um processo industrial é bastante importante conhecer as respostas do microrganismo à variação de temperatura, não apenas para determinar o valor (ou faixa) que conduz ao ótimo do processo, mas até mesmo, para poder especificar com que velocidade e precisão deve ser feito o controle dessa grandeza nos tanques de processamento e nas câmaras de maturação (se houver).

A resposta da velocidade de crescimento à variação de temperatura tem sido representada pela equação de Arrhenius (006,074,206).

$$\mu = \mu_0 \cdot \exp(-E_a/RT_a) \quad (2.1)$$

onde μ é a velocidade específica de crescimento, μ_0 é o fator "pre-exponencial" ou "fator de frequência", E_a é a energia de ativação, R é a constante dos gases perfeitos e T_a a temperatura absoluta.

Para determinação das constantes μ_0 e E_a é comum linearizar a equação (2.1) fazendo um "gráfico tipo-Arrhenius" de $\ln \mu$ contra $(T_a)^{-1}$ onde se obtém $-E_a/R$ como coeficiente angular e $\ln \mu_0$ como coe-

ficiente linear da reta obtida.

Valores típicos para a energia de ativação são da ordem de 10 a 60 kcal/mol segundo MOHR & KRAWIECK [25] ou de 15 a 20 kcal/mol se-

gundo WANG et alii [206].

Estes últimos autores afirmam que ao se calcular valores infe-

riores a 10 kcal/mol para a energia de ativação da velocidade de

crescimento ou de formação de produtos, deve-se suspeitar de que a

etapa controladora do processo (de crescimento ou de produção) es-

tá ligada a fenômenos de difusão dos nutrientes ou dos metabóli-

tos. Um valor que confirma a assertiva de WANG et alii [206] foi

calculada por DIAS [058] ao analisar os resultados de fermentações

alcoólicas efetuadas em diferentes temperaturas [132]; nesse caso,

a energia de ativação para o transporte do etanol para fora das cé-

lulas era de 8,5 kcal/mol.

Uma modificação da equação de Arrhenius, baseada na frequência

de colisões intermoleculares e na distribuição de Maxwell foi pro-

posta por CASOLARI [035] e pode ser expressa por:

$$\mu = \frac{N_0}{18} \exp(-E_0/RT_a^2) \quad (2.2)$$

onde N_0 é o número de Avogadro e E_0 é a "energia necessária ao cres-

cimento". No citado trabalho foram calculados valores de 29,9

, 33,0 e 36,1 kcal/mol para *E_0* de *Vibrio marinus*, *Escherichia coli* e

Bacillus stearothermophilus, respectivamente.

Deve-se observar que tanto E_a da equação de Arrhenius quanto

E_0 da equação de Casolari são indicadores da sensibilidade da ati-

vidade microbiana em relação à temperatura, pois quanto maiores os

seus valores (de E_a e E_0) tanto menores serão as variações da velocidade específica de crescimento para uma dada variação de temperatura.

Levando em consideração que, frequentemente, os gráficos tipo-Arrhenius para intervalos de temperaturas maiores que 20°C apresentam duas ou mais retas (com distintos valores de energia de ativação), RATKOWSKY, et alii [158] propuseram uma equação empírica que aproximou bastante bem a variação de μ com a temperatura para 42 culturas bacterianas. A equação é dada por

$$\sqrt{\mu} = b(T - T_{\min}) \quad (2.3)$$

onde b é uma constante e T_{\min} é a temperatura onde não há mais crescimento ($\mu = 0$).

Posteriormente, foi efetuada uma extensão da equação 2.3 para abranger toda a faixa de crescimento, através da equação 2.4.

$$\sqrt{\mu} = b(T - T_{\min}) \left[1 - \exp\left(-\frac{C(T - T_{\max})}{T_{\max}}\right) \right] \quad (2.4)$$

onde C é uma constante empírica e T_{\max} seria a temperatura máxima para crescimento [157].

Em 1987, MCMEEKIN et alii [123] notaram que a equação 2.3 é um caso particular da equação de Belehrádek, expressa por

$$\mu = a(T - \alpha)^d \quad (2.5)$$

onde a e d são constantes empíricas sem sentido físico e α representa o "zero biológico". O expoente d varia conforme o organismo, mas para muitos ele está próximo de 2 [123]. Sendo assim, a equação 2.3 torna-se semelhante à 2.5, se $T_{\min} \equiv \alpha$.

Para *Azospirillum* não se conhecem trabalhos que procurem relacionar $\mu = \mu(T)$, com a consequente determinação das constantes de cada modelo. Na verdade, para *Azospirillum* não se encontram com muita facilidade valores das velocidades específicas de crescimento em diferentes temperaturas, que possam ser comparados, quer por causa de métodos diferentes de avaliação do crescimento celular, quer pelo uso de meios de cultura de composição (tipo de nutrientes e concentrações) diferentes e mesmo pelas condições de cultivo (meio semi-sólido ou líquido, incubação em agitador rotativo ou em fermentador, pH controlado ou não, etc.).

Será então bastante proveitosa a determinação de uma função $\mu = \mu(T)$, que poderá auxiliar no controle do processo de produção.

2.3 Potencial Hidrogeniônico (pH)

Em relação ao valor ótimo de pH para cultivo de *Azospirillum* a situação está bem melhor definida do que em relação à temperatura (cf. 2.2.1). *A. brasilense* tem uma faixa ótima de cultivo sem fixação de nitrogênio para valores de pH entre 6,0 e 7,8 |065|.

Em condições de fixação de nitrogênio, a atividade máxima da nitrogênase em *A. lipoternum* e *A. brasilense* ocorreu entre 7,0 e 7,5 e decaiu rapidamente quando o pH ultrapassou 7,9 |054,140|.

Para outras cepas, entretanto, principalmente as isoladas de raízes, a atividade da nitrogênase foi maior em pH 6,3 do que a $\text{pH} = 7,0$ |062|.

Quando se usam ácidos orgânicos como fontes de carbono a tendência do pH é aumentar em decorrência do desaparecimento dos radicais carboxílicos que são metabolizados pelas bactérias |054,140|. Em compensação, quando se usa frutose como fonte de carbono a tendência é diminuir o pH devido à formação e secreção para o meio de

2.36 cultura de alguns ácidos orgânicos. GOEBEL & KRIEG |078| estabeleceram que 25% da acidez titulável de uma cultura de *A. brasiliense* era proveniente da formação dos ácidos acético, láctico, glicoxálico, β -hidroxibutírico, málico e α -cetoglutárico. O restante da acidez titulável era proveniente do consumo da amônia pelos microrganismos, pois quando este cátion desaparece da solução ocorre a ionização de moléculas de água para repor as cargas positivas, na forma de H^+ .

Quando se usam fontes orgânicas de nitrogênio (uréia, glutamato, extrato de levedura) a tendência é de que o pH se mantenha em seus níveis iniciais, ou aumenta muito pouco |053|.

Para evitar grandes variações de pH devido ao crescimento microbiano, usam-se meios de cultura tamponados principalmente com fosfatos (ver item 2.1.3) |068,113,176| e para manutenção do pH em um válor preestabelecido utilizam-se sistemas de controle automático que a partir do sinal de um eletrodo acionam equipamentos para adição de soluções ácidas ou alcalinas, conforme o caso.

De uma maneira geral, variações de pH podem causar: alterações nas funções das membranas, modificações no consumo de substrato e no perfil de produtos metabólicos, alterações na morfologia e estruturas celulares e na floculação e/ou adesão a superfícies |005,074|. Não se conhece muito a respeito da influência do pH sobre os aspectos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos em *Azospirillum*. Dentre as poucas informações disponíveis pode-se salientar que BECKING |021| mostrou que não ocorria pleomorfismo em duas cepas de *A. brasiliense* para cultivos em meios semi-sólidos com pH entre 6,0 e 10,0.

Importantes questões para o estabelecimento de um processo de produção de *A. brasiliense* ainda estão sem resposta, como por exemplo:

nas velocidades de crescimento e de respiração, na formação de sub-
centração de oxigênio dissolvido) influem no metabolismo celular,
lagão, formação de espuma, etc. Os indiretos (motivados pela con-
mogeneidade do sistema, ruptura de células por cisalhamento, flocu-
Os efeitos diretos podem se fazer sentir através da falta de ho-
cesso e aos aspectos energéticos e econômicos decorrentes.

cia devido aos efeitos diretos ou indiretos que ele causa no pro-
croganismos, o binômio agitação-aeração é de fundamental importân-
Para o desenvolvimento de um processo aeróbio de produção de m̄

2.4.1 Agitação e Aeração em Cultivos de *A. brasiliense*

2.4 Agitação e Aeração

- ro do inoculante ?
- ra desenvolvida em um certo valor de pH para um suporte (sólido
ou líquido) que tem outro pH bem diferente, no processo de prepa-
- Qual o efeito sobre a viabilidade celular de adicionar uma cultu-
apresentam mecanismos internos de tamponamento ?
- localidade de resposta ? Até que valores do "choque" as células
submetida a um valor de pH diferente (choque de pH) ? Qual a ve-
- o que acontece quando uma cultura em crescimento exponencial é
- a variação de pH influencia a floculação da cultura ?
- blemas ao metabolismo bacteriano ?
- trole do pH (NaOH, KOH, Ca(OH)₂, H₂SO₄, HCl) causam menores pro-
- quais substâncias, dentre as que se usam normalmente para o con-
- qual a concentração de solução-tampão que deve ser usada ?
- fica de crescimento celular ?
- a variação do pH proveniente do consumo de substratos ou de for-
mação de ácidos orgânicos chega a modificar a velocidade especí-

produtos e de materiais de reserva e na eficiência energética, como será visto nos itens 2.4.2 e 2.4.3.

Grande atenção tem sido dada à agitação e aeração de cultivos microbianos e processos fermentativos, como o demonstram a grande quantidade de revisões recentemente publicadas. |009,037,038,039,080,091,108,112,115,127,146,173,178,194,205|.

Também sobre o assunto, um excelente capítulo denominado "Transport phenomena in bioprocess systems" faz parte da segunda edição do livro de BAILEY & OLLIS |010|.

Para o cultivo de *Azospirillum brasilense* sem fixação de nitrogênio, dois sistemas básicos tem sido utilizados: agitadores (rotã tivo ou recíproco) e fermentadores com insuflação de ar. Entretanto, poucos estudos sistemáticos acerca da influência da agitação e aeração sobre os diversos aspectos do desenvolvimento celular, foram realizados e menos ainda sobre os aspectos de engenharia do processo.

Esta última lacuna é, de certa forma, compreensível, uma vez que os parâmetros de engenharia (coeficientes de transferência, potência dissipada, tensões de cisalhamento) tornam-se necessários quando se pretende efetuar a ampliação de escala ("scale-up") do processo, e, ao que saiba, esta tese é o primeiro trabalho efetivado com vistas ao desenvolvimento de um processo industrial de produção de *A. brasilense*.

Assim, tendo essas considerações em mente, pretende-se no próximo capítulo rever o que se conhece a respeito da influência do oxigênio sobre o crescimento de *A. brasilense*, para determinar se é necessário (ou vantajoso) trabalhar com altas ou baixas concentrações de oxigênio dissolvido; uma vez que a agitação e aeração devem suprir o oxigênio necessário à cultura, é necessário quantificar essa necessidade e as informações disponíveis estão reunidas

no item 2.4.3; pensando, então, nos aspectos de engenharia serão apresentados no item 2.4.4 algumas informações sobre os coeficientes de transferência de oxigênio (k_{La}) e no item 2.4.5 serão apresentadas correlações de k_{La} com as variáveis de processo, correlações essas que se tentará aplicar aos resultados obtidos nesta tese.

2.4.2 Influência do Oxigênio sobre *A. brasiliense*

O efeito do oxigênio sobre *Azospirillum* deve ser analisado segundo dois prismas, uma vez que estas bactérias em condições de fixação de nitrogênio são microaerófilas, enquanto em presença de fontes de nitrogênio combinado são aeróbicas (ver p. 24 a 26 e 29 a 32 de DOBEREINER & PEDROSA |065|, para revisão a respeito).

Os microrganismos microaerófilos, no conceito de KRIEG & HOFFMAN |109| são aqueles para os quais o oxigênio é, ao mesmo tempo, benéfico (pois é usado na respiração) e nocivo (pois causa danos "estruturais ou metabólicos"). No caso dos fixadores de nitrogênio, a microaerofilia advém da inibição que o oxigênio causa à nitrogênase |024,065,163|. Para proteger a nitrogênase, os microrganismos desenvolveram diferentes mecanismos |065|: proteção respiratória conformacional, enzimática, química e também através da compartimentalização, agregação e aerotaxia.

Destes mecanismos, foram encontrados em *A. brasiliense* apenas a proteção enzimática e a aerotaxia |018,041,192|. A formação de carotenóides |135,136,137|, que poderia servir como proteção química da nitrogênase, ocorreu em altas concentrações de oxigênio, em condições tais que, o complexo enzimático não deveria estar sendo produzido ou ativado |065|.

Por outro lado, HARTMANN & BURRIS |088| demonstraram recentemente

te que em condições microaeróbias *A. brasilense* não apresenta proteção conformacional (mudança de estrutura) da nitrogenase [089] , concordando com resultados anteriores [33] . Estes últimos autores também haviam demonstrado que *A. brasilense* não apresentava proteção respiratória. Outro tipo de proteção respiratória, através da utilização do PHB acumulado foi sugerido [91] mas não foi confirmado.

Quantos à agregação bacteriana que BERGENSEN [024] e DOBEREINER & PEDROSA [065] sugerem ser muito importante para a criação e manutenção de um ambiente microaerófilo, ainda não foi demonstrada que é utilizada por *A. brasilense* com essa finalidade.

Assim, devido aos mecanismos relativamente pouco eficientes para a proteção da nitrogenase, *A. brasilense* fixa nitrogênio em concentrações bem baixas de oxigênio dissolvido (0,60 a 8µM, conforme compilado em [065]).

Na presença de nitrogênio combinado, que é a situação de maior interesse para a produção de inoculantes, como se concluiu no item 2.1.3, as bactérias do gênero *Azospirillum* desenvolvem-se em uma ampla faixa de oxigênio dissolvido. NUR et al [136,137] e TAL & OKON [191] cultivaram *A. brasilense* Cd em processo contínuo a 30°C em meio com malato, NH_4Cl e sais e obtiveram regimes permanentes para pressões parciais de oxigênio dissolvido (pO_2) entre 0,007 e 0,21 atm. Com outra cepa (*A. brasilense* BS 52), com as mesmas fontes de carbono e nitrogênio foram obtidos regimes permanentes em pO_2 entre 0,0013 e 0,181 atm [096] .

A influência da concentração de oxigênio dissolvido sobre o crescimento microbiano apresenta um comportamento típico observado para muitos outros nutrientes, sendo representada pela figura 2.6 [080] . Em muitos casos tem-se observado que a concentração crítica de oxigênio (cf. figura 2.6) é normalmente duas a três vezes o va-

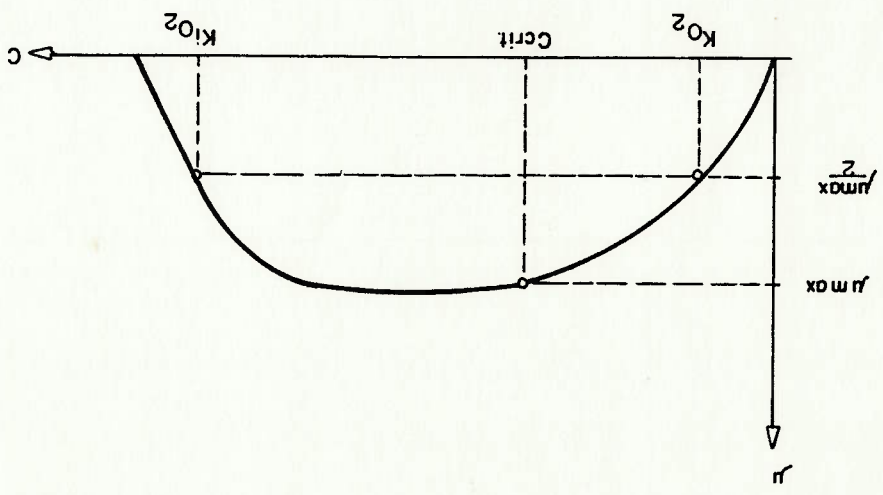
Alia's, as cepas de *A. brasiliense* tem também apresentado outras características diferenciadoras, como a produção de caratenóides |135,136,137|, pleomorfismo |021,072| e agregação celular |135|. Vale a pena ressaltar que cepas diferentes em condições pareci-

Também respostas diferentes tiveram as cepas para a concentra-
ção celular e de proteína, para a formação de PHB e para os fato-
res de conversão de substrato em células |096,136,137|.

turação |096|.

As duas cepas anteriormente citadas apresentaram diferentes C_{crit} : para Cd ocorreu limitação de oxigênio quanto a concentra-
ção era menor do que 3% da saturação |137| e para BS 52 tal limita-
ção não foi sentida mesmo para concentrações próximas a 0,6% da sa-

FIGURA 2.6 - INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE OXIGÊNIO DISSOLVIDO (C) SOBRE A VELOCIDADE DE CRESCIMENTO CELULAR (μ)
 $C_{crit} \approx 2 \text{ a } 3 \cdot K_{O_2}$ (010, 153).



lor de K_{O_2} |010|.

2.42

das apresentaram fatores de conversão muito diferentes, sendo o da cepa Cd quase o dobro do da cepa BS 52 |096,136|. A presença de ca-rotenóides, que foram encontrados na Cd na proporção de 1 a 10% |136,137| e não na BS 52 poderia explicar, em parte, o aumento da massa celular por unidade de substrato consumido.

Outra importante influência da concentração de oxigênio sobre a cultura e que também está relacionada com a eficiência energética |099,188| é a variação do conteúdo e localização dos citocromos.

Como já mencionado no item 2.1.1.1, *A. brasilense* apresenta a cadeia respiratória composta por citocromos b, c e aa_3 quer para culturas com fixação de nitrogênio, quer para culturas com nitrogênio combinado (NH_4^+ , NO_3^-). A composição relativa desses citocromos e a sua localização (membrana ou solúveis) dependem das condições de cultivo e do receptor final de elétrons. Além dos resultados já apresentados e discutidos em |065|, trabalho muito recente foi publicado |110| onde se demonstrou claramente que a diminuição na concentração de oxigênio levava à maior produção de citocromos c (solúveis e particulados), à mudança dos citocromos b-560 para b-556 e ao decréscimo e/ou desaparecimento dos citocromos aa_3 , com cluindo-se que a diminuição da disponibilidade de oxigênio levava a uma eficiência energética maior |036,188|.

Cumprre ainda salientar que no trabalho supra citado |110| foram registrados pela primeira vez para *A. brasilense* em NH_4^+ , resultados dos que estão de acordo com a figura 2.6, no tocante à variação da velocidade específica de crescimento com a concentração de oxigênio dissolvido: para alta aerção, o tempo de geração em cultivo descontínuo com malato era de 1,86 h ($\mu = 0,37 h^{-1}$) enquanto em baixa aerção era de 2,98 h ($\mu = 0,23 h^{-1}$) e quando as pressões parciais de oxigênio na mistura de alimentação passaram a 0,15, 0,10, 0,05 e 0 atm, as velocidades de crescimento foram respectiva-

Comparando os diversos resultados da tabela 2.4 nota-se que a temperatura de 37°C as velocidades de respiração eram aproximadamente o dobro das obtidas a 30°C, o que está de acordo com as observações feitas no item 2.2.1 a respeito da faixa ótima de tempo

30% da saturação [154]. Quando a concentração de oxigênio dissolvido era superior a ratura, em condições de assimilação de NH_4^+ ou de fixação de nitrogênio, quando a concentração de oxigênio dissolvido era superior a *tobacter vineandii*, cultivado em 40 mM de sacarose, a mesma temperatura cerca de 35 a 65 vezes menores de que os observados para azo- Os valores encontrados nesta tabela para a temperatura de 30°C as transformações que se encontram no rodapé da tabela 2.3.

Para a comparação, os mesmos foram reduzidos a uma base comum, com de consumo de oxigênio encontrados na literatura. Para possibilitar a tabela 2.3 apresenta os valores das velocidades específicas rantes condições.

rio conhecer a velocidade de respiração de *A. brasilense* em diferentes condições de cultura microbiana (cf. equação 2.6, item 2.4.4) faz-se necessário priorizar um fluxo de oxigênio suficiente para atender às necessidades Tendo em vista que o intuito principal da agitação-aeração é su-

2.4.3 Velocidades de Consumo de Oxigênio por *A. brasilense*

o controle de sua operação. influência para possibilitar o projeto de uma unidade industrial e, fisiológicas e bioquímicas será de grande interesse avaliar esta dependência da cepa e que para a sp 245 há muito poucas informações não em algumas características celulares de *A. brasilense* parece Em conclusão, levando em consideração que a influência do oxigênio

aceptor de elétrons era NO_3^-)

mente 0,21, 0,21, 0,19 e 0,11 h^{-1} (neste último caso, $PO_2 = 0$, o

ratura para o crescimento celular.

Quanto à velocidade de respiração em função do substrato, nota-se que os ácidos orgânicos intermediários do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (cf. figura 2.2) foram oxidados com maior velocidade. Frutose foi oxidada com velocidade um pouco menor, cerca de 8 |054| a 34% |122| inferior à do malato.

Tabela 2.3 Velocidades específicas de consumo de oxigênio de *A. brasiliense* sp 7 em diferentes substratos.

Referência	Consumo de O_2 * ($10^{-4} \text{ mmO}_2/\text{g prot.s.}$)	Substrato (mm)	Temperatura (°C)
------------	--	----------------	------------------

141	15,3	malato (40)	30
	15,8	succinato(40)	
	12,0	lactato (40)	
	9,3	piruvato (40)	

54	16,1	malato (40)	30
	16,1	succinato(40)	
	14,5	piruvato (40)	
	14,0	lactato (40)	
	15,0	frutose (40)	

122	13,7	malato (40)	30
	9,0	frutose (40)	
	15,8	gluconato(40)	

104	25,5**	malato (40)	37
116	23,3	succinato(20)	37

* Transformações utilizadas para redução a unidade comum: mg proteína = 6,25 x mg N^{total} ; 1 μM de O_2 = 24,86 μg O_2 a 30°C e 1 atm.
 ** Células desenvolvidas sob fixação de N_2 .

2.4.4 Coeficientes de Transferência de Oxigênio

No processo de transferência de oxigênio das bolhas de ar até ao interior de uma célula bacteriana, passando pelo líquido em que ambas (bolhas e células) estão suspensas, podem ser identificadas diversas resistências à passagem das moléculas de oxigênio. Dentre essas resistências podem ser citadas a proveniente da interface, gás-líquido, as dos filmes líquidos aderidos à bolha e à célula, a da membrana celular e, às vezes, também a dos agregados microbianos (ver figura 8.1, p. 460 de BAILEY & OLLIS [10]).

Inúmeras determinações efetuadas mostraram que as principais resistências a transferência do oxigênio em sistemas biológicos aeróbios, estão na sua dissolução e transporte na fase líquida [10,102]. Assim, o equacionamento é feito com base na resistência controladora, adotando-se um coeficiente k_L .

O fluxo de oxigênio pode ser representado por:

$$NA = k_L a(C^* - C) \quad (2.6)$$

onde: NA - fluxo de oxigênio (mmol/l.h)

a - área interfacial específica (m^{-2})

C* - concentração de saturação gás-líquido (mmol/l)

C - concentração de oxigênio na fase líquida (mmol/l)

k_L - coeficiente de transferência de oxigênio da fase líquida da

da (m/h)

Como é bastante difícil medir separadamente os valores de k_L e

a é comum agrupá-los num único coeficiente $k_L a$, com dimensão de

tempo⁻¹.

Existem diversos métodos para a medida de $k_L a$. SOBOKTA et alii

[82] apresentaram uma completa revisão a respeito.

Nos dois principais métodos (o "dinâmico" e o "balanço gasoso")

a equação fundamental é:

$$\frac{dC}{dt} = k_{La}(C^* - C) - Q_{O_2} \cdot X \quad (2.7)$$

que estabelece que a variação da concentração de oxigênio (dC/dt) é o resultado de um balanço entre o suprimento de oxigênio, $(k_{La}(C^* - C))$ e o consumo (ou demanda) total do mesmo, dado pelo produto da velocidade específica de respiração (Q_{O_2}) pela concentração celular (X).

Outro método para medida de k_{La} sem a presença dos microrganismos ("degasagem") foi recentemente revisado e criticado [115].

BAI-LEY & OLLIS [10], GOMA [80], KARGI & MOO-YOUNG [102] e LEF & LUK [114] discutiram a influência de diversos fatores físicos-químicos e microbiológicos no coeficiente de transferência de oxigênio e ATKINSON & MAVITUNA [106] apresentaram muitos resultados para diferentes processos microbianos e sistemas de agitação-aeração.

Para A. brasiliense foi encontrado apenas um trabalho em que se mediram os valores de k_{La} [104] usando o método dinâmico (cf. item 3.6.12), em um fermentador BIOSPAR V de 2 l com 1,25 % de meio de cultura, tendo-se determinado k_{La} entre 1,5 e 10 h⁻¹, quando a aeração específica era de 0,1 min⁻¹ e a agitação variava de 50 a 600 rpm; nesse trabalho, entretanto, não se procurou relacionar os valores de k_{La} com as demais grandezas.

2.4.5 Correlações para k_{La}

Quando se usa o valor de k_{La} para estudos de ampliação de escala é importante correlacioná-lo com parâmetros operacionais e propriedades da suspensão microbiana.

Há, basicamente, dois tipos de correlações para k_{La} |112| : um é baseado na potência aerada absorvida por unidade de volume (P_G/V) e o outro em análise dimensional.

Entre as do primeiro tipo, vem sendo usada há muitos anos a de COOPER et alii |046|, com relativo sucesso |001,010,206|.

$$k_{La} = K \left(\frac{P_G}{V} \right)^{0,95} \cdot V_s^{0,67} \quad (2.8)$$

onde V_s é a velocidade superficial do ar.

Mais recentemente RIEF |162| após exame de muitos dados de litê

ratura apresentou uma correlação para a transferência de oxigênio

em água e sistemas coalescentes, dada por:

$$k_{La} = 2,6 \cdot 10^{-2} \left(\frac{P_G}{V} \right)^{0,4} \cdot V_s^{0,5} \quad (2.9)$$

com k_{La} em s^{-1} , P_G/V em W/m^3 e V_s em m/s .

WANG et alii |206| apresentaram uma outra correlação atribuída a Richards onde a frequência de agitação (N_r) é explícita:

$$k_{La} = K \left(\frac{P_G}{V} \right)^{0,4} \cdot V_s^{0,5} \cdot N_r^{0,5} \quad (2.10)$$

O cálculo da potência com aerção (P_G) pode ser feito seguindo-se os passos apresentados por diversos autores |176,194,206|.

As correlações originadas da análise dimensional também são de dois tipos diferentes $|112|$: as que procuram relacionar o número de Sherwood do agitador (Sh) com o número de Reynolds (Re), o número de Schmidt (Sc) o de Peclet (Pe) e outros:

$$Sh = f(Re, Sc, Pe, \dots) \quad (2.11)$$

e aqueles que correlacionam os coeficientes volumétricos adimensionais $(k_{La} \cdot V / \bar{Q}_{ar})$ com a potência por unidade de volume modificada $(P/\bar{Q})^*$ e o número de Schmidt

$$k_{La}(V/\bar{Q}) = A(P/\bar{Q}_{ar})^* P^q (Sc)^p \quad (2.12)$$

onde

$$\left(\frac{P}{\bar{Q}}\right)^* = \left(\frac{P}{\bar{Q}_{ar}}\right) (p(vg))^{2/3} - 1 \quad (2.13)$$

e

$$Sc = v/D_{O_2} \quad (2.14)$$

Nestas equações \bar{Q}_{ar} é a vazão volumétrica de gás, ρ é a densidade do líquido, v é a viscosidade cinemática do líquido, g é a aceleração da gravidade e D_{O_2} é a difusividade do oxigênio no líquido.

A proposta da potência por unidade de volume modificada foi feita em 1978 por ZLOKARNIK $|210|$, usando como variáveis para a análise dimensional P/\bar{Q}_{ar} (potência por vazão de gás) e $\bar{Q}_{ar} \sqrt{V}$ (vazão específica de aerção), que é muito utilizada na prática, mas nunca havia sido usada com essa finalidade.

Já foi observado, mesmo para fluidos que não chegam a perder a sua característica newtoniana que a variação da viscosidade, pode

afetar os valores de k_{La} . Exemplo importante para a presente tese são os resultados de YOSHIDA et alii [205] apresentados na tabela 2.4. Para uma variação de 3,6 vezes na viscosidade, houve um decréscimo de 47% no valor de k_{La} para baixa velocidade de agitação e de 57% para alta velocidade.

Tabela 2.4 Coeficientes de transferência de oxigênio (k_{La}) para sistemas de água-glicerol de diferentes viscosidades. Adaptado de [205].

Solução	Concentração de glicose (% massa)*	Viscosidade (cp)	k_{La} (h^{-1})
água	0	1,0	30
água-glicerol	8,78	1,9	22
água-glicerol	17,50	3,6	16

* Calculada pela equação de IRVING (p. 3.282, FERRY & GREEN) [151]

No item 6.6 procurar-se-á aplicar as equações supra mencionadas para correlacionar os resultados de k_{La} para o cultivo de *A. brasiliense*.

2.5 Tipo de Processo

2.5.1 Modelagem e Otimização de Processos Microbianos

Uma das mais difíceis decisões a respeito da implantação ou otimização de processos microbianos é escolher o tipo de processo que deve ser utilizado.

De forma geral, um processo microbiano, a exemplo do que ocorre com qualquer processo químico pode ser conduzido de forma contí-

nua, descontínua ou semi-contínua. Levando-se em conta que os nutrientes, o(s) microorganismo(s) e o(s) produto(s) podem ter diferentes tempos de retenção no reator, pode-se chegar a uma diversidade de "processos" diferentes, sumarizados na tabela 2.5. Ali não é ressaltado o aspecto de que células e/ou enzimas podem estar livres ou imobilizadas, nem o fato de que os processos contínuos e semi-contínuos podem ter três tipos básicos de escoamento (fluxo pistonado, fluxo completamente misturado ou um fluxo intermediário entre os dois).

Então, como se observa, as possibilidades para escolha de um processo são múltiplas e é, certamente, um árduo trabalho realizar experimentos em todos os tipos de "processo" que potencialmente teriam interesse para o microorganismo e/ou produto em questão.

Tabela 2.5 Tipos de processo para o cultivo de microorganismos e formação de produtos microbianos.

Recirculação	Inóculo e No. de tanques	Tipo de processo
com ou sem recirculação de microorganismos e/ou nutrientes	com 1 tanque por cortes	Descontínuo
	com 1 tanque	Contínuo
	tanques em série	Semi-contínuo
	separação do produto durante o processo	Semi-contínuo

O que se tem feito, com muito mais frequência, é utilizar uma abordagem teórico-prática que, conforme salientado por SCHUGERT |175|, envolve as seguintes etapas no desenvolvimento de um processo biotecnológico: " - balanços de massa e energia

- levantamento de dados termodinâmicos

- cinética do processo e modelagem

- modelos de reatores

- acoplamento do modelo cinético com os modelos dos reatores

- estudo da dinâmica combinada dos dois modelos

- mensurabilidade e controlabilidade do reator

- otimização de operação

- otimização do controle do processo

- avaliação da aplicação prática dos resultados teóricos obti-

dos."

Fica bastante clara, dentro dessa concepção, a importância que

a Engenharia Bioquímica tem dedicado ao levantamento dos fatores

de conversão (que são os valores que traduzem os balanços mate-

riais e energéticos) e à elaboração dos modelos matemá-

ticos para descrição do crescimento microbiano e formação do produ-

to.

Dentre os livros, textos e manuais que abordam o assunto podem

ser destacados: AIBA et alii |001|, ATKINSON & MAVITTUNA |006|, BAILEY

& OLLIS |010|, PIRT |153|, SCRIBAN |176|, STANBURY & WHITAKER |180|,

WANG et alii |206|. Diversas obras específicas sobre o assunto fo-

ram recentemente editadas como a de BAZIN |019| e a de ROELS |164|;

e em 1988 está prevista a publicação de outra denominada Physiolo-

gical Models in Microbiology |020|.

Para revisões recentes quatro artigos devem ser consultados:

|100,101,174,175|. Em particular, para o cultivo em batelada alimentã

da ("fedbatch") uma revisão |204| é bastante completa e apresenta a

estratégia para otimização desse tipo de processo. Uma outra revê

ção foca também os aspectos energéticos dos modelos de crescimen

to |071|.

Para o cultivo aeróbio de microrganismos (como é o caso do pro-

cesso de produção de *A. brasiliense*) onde não se espera a formação de produtos, potencialmente inibitórios, é comum procurar descrever o comportamento microbiano através de funções $\mu = \mu(s)$, do tipo das que estão representadas na figura 2.7. As equações representativas de cada tipo de comportamento encontram-se na legenda desta própria figura.

Para efetuar o projeto do processo do cultivo de microrganismos um dos critérios é a maximização da produtividade. De modo geral SCHUGERTL [175] expôs que neste caso deve-se maximizar a "função objetivo J":

$$J = \int_{\text{top}}^0 V(t)\mu(t)X(t)dt \quad (2.21)$$

onde top é o tempo de operação, $V(t)$ é a função "enchimento do tanque", (t) é a velocidade específica de reprodução, $X(t)$ é a concentração celular. Nesse mesmo artigo e no de KAFAROV et alii [100] e também no de YAMANE & SHIMIZU [204] foram apresentadas as soluções otimizadas para diferentes processos.

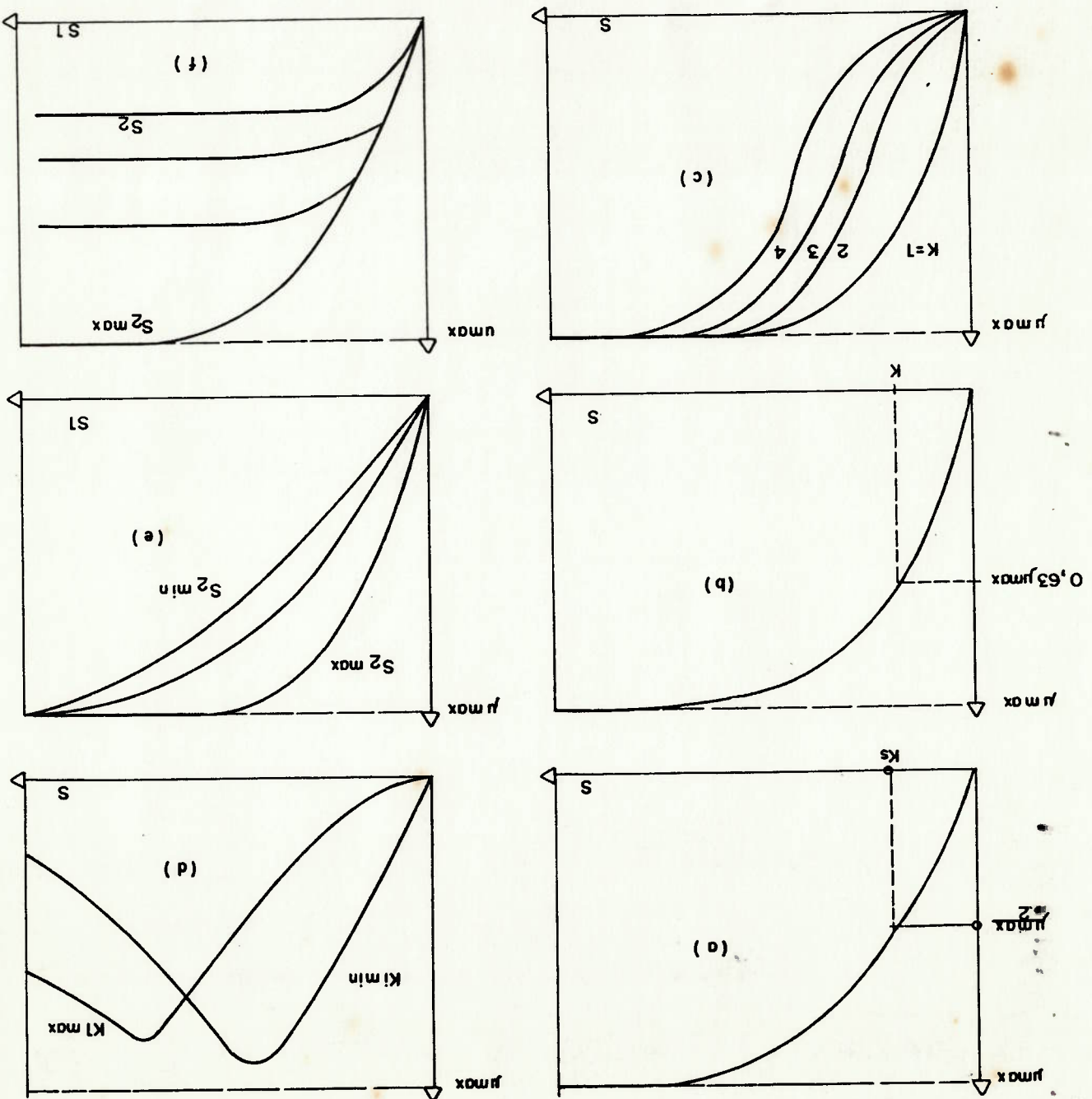
Para *A. brasiliense* encontrou-se na literatura apenas uma tentativa de modelagem do crescimento microbiano [104] em condições de fixação de nitrogênio, através de uma equação do tipo de Monod com uma parcela de energia de manutenção (ver equação 7.22 de BAILEY & OLLIS [101]).

FIGURA 2.7 - REPRESENTAÇÃO DE MODELOS DE CRESCIMENTO MICROBIANO COM INIBIÇÃO PELO SUBSTRATO. ADAPTADO DE (100).
 EQUAÇÕES REPRESENTATIVAS DAS CURVAS :

(a) $\mu = \frac{\mu_{max} \cdot S}{K_s + S}$ (eq. 2.15) (d) $\mu = \frac{\mu_{max} \cdot S}{K_s + S + S^2/K_i}$ (eq. 2.18)

(b) $\mu = \mu_{max}(1 - e^{-s/k})$ (eq. 2.16) (e) $\mu = \frac{\mu_{max} \cdot S_1 \cdot S_2}{K + S_1 \cdot S_2}$ (eq. 2.19)

(c) $\mu = \frac{\mu_{max}(S_k)}{K_s + S_k}$ (eq. 2.17) (f) $\mu = \frac{\mu_{max} \cdot S_1 \cdot S_2}{K_s + K_s^2 + S_1^2 + S_2^2}$ (eq. 2.20)



brasiliense

Para o cultivo de *A. brasiliense* em meios com nitrogênio combinado tem sido utilizado o processo descontínuo com um inóculo por tanque, e o contínuo, em condições de concentração de oxigênio dissolvido controlado (oxistato).

No cultivo descontínuo tem-se empregado, com frequência, os frascos agitados. Poucos cultivos descontínuos foram realizados em fermentadores, tendo-se como exemplos: LALANDE & KNOWLES [110], OKON et alii [142] e SADASIVAN & NEYRA [167]. Deve-se salientar que no trabalho de OKON et alii [142] foram realizados cultivos em tanques de 3, 10, 20 e 180 litros de capacidade.

Dentre os trabalhos de cultivo contínuo de *A. brasiliense* sem fixação de nitrogênio podem ser arrolados: HURK et alii [096], NUR et alii [136,137] e TAL & OKON [191].

É muito importante observar que nenhum dos trabalhos acima citados apresentava os mesmos objetivos da presente tese (cf. cap. 1), de encontrar condições para otimizar a produção de *A. brasiliense* com vistas ao desenvolvimento de um processo industrial. Sendo assim, em muitos casos não foi publicada a produtividade celular, ou os resultados que permitissem calculá-la. A tabela 2.6 reúne os valores que foram encontrados ou calculados para os processos descontínuos, enquanto a tabela 2.7 reúne os valores para os contínuos.

Tabela 2.6 Produtividade celular (Px) de cepas de *A. brasiliense* em processo descontínuo, em diversos substratos.

Cepa	Substrato	Temperatura (°C)	Px (g/l.h)	Referência
sp7	malato, succinato, lactato, piruvato, sem ext. levedura	30	0,023	140
	mesmos substratos com ext. levedura	30	0,028	
RG	succinato	32	0,034	129
	frutose	32	0,018	
RG	frutose com FeCl ₃	32	0,140	008
	frutose sem FeCl ₃	32	0,054	

Tabela 2.7 Vazões específicas (D) e produtividades (Px) para cultivos contínuos de *A. brasiliense* a 30°C.

Cepa	D (h ⁻¹)	Px (g/l.h)	Referência
Cd	0,200	0,170*	136
BS 52	0,083	0,020	096

* valor máximo obtido

No caso do controle do processo de inoculantes deve-se utilizar um método de medida da concentração de células viáveis, como o método de contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) [105]. Entretanto, como pode ser visto na tabela 2.8, ainda não se dispõe desse tipo de método "em linha", e o que se procura então é associar outros que possam, indiretamente, fornecer as indicações necessárias ao controle do processo, com a justificativa adicional de que durante ou logo após a fase exponencial de crescimento, a viabilidade celular é bastante elevada, mais a mais em se tratando de processos destinados especificamente ao crescimento celular, em

de, relativamente, poucas grandezas. tais informações importantes podem ser obtidas através da fonte de carbono e um único produto além dos microrganismos, mostrado que, em se tratando de processos simples, com uma única ra a "identificação do estado" do processo e o seu controle, e da extensa análise acerca da utilização de diversos parâmetros pã tabela 2.8. Em uma série de artigos [083,168,169,183] foi efetuada bianos, um conjunto adequado de variáveis, dentre as listadas na ("line") [003,010,032,033,124], usando, no caso de processos micro-aquisição de dados quanto controle podem ser feitas em linha ("on-Com o crescente interesse pela automação de processos, tanto a dos parâmetros essenciais" [124].

do reator. Para isso, são necessárias medidas "rápidas e precisas (cf. 2.5.1) é a definição da "mensurabilidade e controlabilidade" uma das importantes etapas, conforme apontado por SCHUGERT [174] No desenvolvimento de qualquer processo químico ou microbiano,

2.6.1 Controle do Processo "Em Linha"

2.6 Parâmetros para Controle do Processo

que se procura fornecer à cultura as melhores condições para sobre-
vivência e reprodução.

Para A. *brasilense* alguns métodos dentre os arrolados na tabela 2.8 vem sendo usados para quantificação da concentração e do crescimento celulares e poderiam, desde que convenientemente acoplados ao reator, servir para controlar o processo. Os principais são a absorvância, a concentração celular (massica ou numérica), a concentração de proteínas. Além desses também o pH, a concentração de oxigênio e as concentrações de fontes de carbono e de nitrogênio poderiam ser usados, principalmente para assinalar as fases do desenvolvimento bacteriano no processo descontínuo.

A seguir, algumas considerações são feitas a respeito dos métodos acima citados, procurando-se evidenciar as suas interrelações.

Tabela 2.8 Métodos de medida de crescimento que pode ser utilizada dos "em-linha" | 124 |

Informação	Sensor ou Instrumento
Densidade celular (absorvância)	Fotocélula
Número de células	Contador de células; citofluorímetro de fluxo, a laser
Concentração celular (biomassa)	Ultrassom, eletrodo de filtração
ADN, ARN, proteína (intracelular)	Microfluorímetro de fluxo a laser
NADH (intracelular)	Fluorímetro em-linha
ATP (intracelular)	Luminescência
Concentração de O ₂ e CO ₂	Análise gasosa, espectrometria de massa
Pressão parcial de O ₂ e CO ₂	Eletrodos específicos
Gases, alcoóis, ésteres, Cetonas, ácidos	Cromatografia gasosa
Produção de ácidos/bases	Espectrometria de massa
Proteínas, enzimas, Glicose, penicilina,	Eletrodo de pH
Potencial redox	Biosensores
Pressão	Eletrodo de RH
Liberação de calor	Manômetro
Viscosidade	Micro orímetro de fluxo
	Viscosímetro

Obs.: Em alguns casos é necessária uma interface (membrana para diálise, amostrador automático) para acoplar o reator com o aparelho analítico.

2.6.2 Absorbância

A absorbância vem sendo amplamente utilizada como indicação para a concentração celular de *A. brasiliense*, embora as limitações desse método sejam bem conhecidas |045,105,153|.

Somadas às limitações ao método deve-se comentar que a falta de padronização na condução da análise dificulta a comparação entre resultados do mesmo tipo. A principal diferença reside no comprimento de onda usado na leitura espectrofotométrica. Para meios de cultura incolores, esbranquiçados ou amarelados foram usados comprimentos de onda que variaram de 420 |017,018,136| a 660 nm |021,167| com maior frequência com valores entre 520 e 560 nm |008,028,140,141,142,144,148,207,208|.

Apesar dessas diferenças metodológicas, chegou-se, em alguns casos a resultados que traduzem idênticas ordens de grandeza. Assim, para o valor 1,0 de absorbância, os seguintes valores foram estimados para a concentração celular (em 10^{11} UFC/l) em culturas crescentes do com nitrogênio combinado: 3,0 |123|; 5,0 |167,207|; 6,7 |142|; 7,5 a 10^7 |017,018|.

Na estimativa da concentração celular mássica também foi usada a absorbância: para $A = 1,0$ foi encontrado $X = 0,47$ g/l |129|, enquanto a equação X (g/l) = $1,18 \cdot A^{420}$ foi estabelecida para uma faixa bem ampla da concentração celular |136|.

A absorbância tem sido também utilizada para a determinação do tempo de geração das culturas de *A. brasiliense* |008,021,078,110,116,129,142,207|, mas com essa finalidade deve-se tomar um pouco mais de cuidado na expressão e análise dos resultados. BECKING |021| efetuou algumas medidas comparativas e mostrou que o tempo de geração medido por contagem celular era de 50 a 170% inferior ao obtido pela medida da absorbância.

Para *Azospirillum* há pelo menos dois complicadores para usar a absorvância como métodos de medida de concentração e/ou de crescimento celulares: a possibilidade de formação de PHB e de ca-
 rotenóides. Ambas as substâncias (que segundo a discussão de item
 2.4.2 parecem ser características de cada cepa) tendem a modificar
 as propriedades óticas das células (refringência, coloração), in-
 fluindo, portanto, de modo desproporcional na absorvância da sus-
 pensão.

De qualquer modo, se for demonstrado que a relação entre absor-
 vância e concentração celular mantém-se constante ao longo do cul-
 tivo de *A. brasilense* sp 245 em frutose ou em glicérol, pode-se
 utilizar o primeiro indicador para controle do processo, dada a fi-
 cildade de medida e a rapidez de resposta.

2.6.3 Concentração Celular Numérica (N)

Para efetuar a contagem automática e a diferenciação entre tamã-
 nhos de células de *Azospirillum*, já foi utilizado um contador tipo
 Coulter |021| a despeito das restrições ao uso desse equipamento
 em bacteriologia |105|.

Uma das principais restrições, a agregação microbiana, dificult-
 ta muito e talvez inviabilize a utilização desse tipo de contador
 para os objetivos já especificados. O mesmo tipo de restrição va-
 le, também para outros métodos de avaliação desse parâmetro e a so-
 lução parece se adotar procedimentos para desagregação celular (uñ-
 tra-som, agitação, mudança de salinidade) ou escolher condições de
 cultivo que evitam a formação de agregados celulares.

Como nem sempre será possível adotar alguma das "soluções" apor-
 tadas, deve-se procurar outro meio que possibilite a avaliação do
 número de células.

2.6.4 Concentração Celular Mássica (X)

A concentração celular mássica ou concentração de biomassa tem sido amplamente utilizada devido à sua precisão e reprodutibilidade. Entretanto, cuidados devem ser tomados quando se usam meios de cultura com sólidos em suspensão e quando as culturas apresentam a característica de adsorção em superfícies de vidro ou plástico, cas | 105 |.

Segundo STANIER et alii | 182 | "o único meio direto de medir a

massa celular é determinar o peso seco do material celular em um determinado volume de meio de cultura, removendo as células do meio, secando-as e pesando-as". De acordo com esta conceituação, tal parâmetro não poderá ser usado para o controle do processo "em-linha", dada a demora na resposta.

A despeito disso, levando-se em conta a reprodutibilidade da determinação, em muitos casos (também nesta tese) a concentração de biomassa tem sido utilizada como método de referência para os estudos cinéticos.

2.6.5 Concentração de Proteína Celular (P)

Praticamente desde o início dos trabalhos com *A. brasiliense*, a proteína celular vem sendo utilizada como padrão para normalização dos demais parâmetros, sendo comuns expressões de fixação de nitrogênio em mmol de acetileno reduzido/mg proteína/h | 144, 201 | de velocidade de respiração em $\text{mmol O}_2/\text{mg proteína}\cdot\text{h}$ | 133, 201 |.

Embora a porcentagem de proteína celular seja variável, dependendo da velocidade de crescimento | 136, 137, 201 | e da cepa utilizada (cf. 2.4.2) este parâmetro poderá ser um bom indicador para o controle do processo, desde que convenientemente padronizado.

2.61

Dificuldades existem, entretanto, para a sua utilização "em-linha". Para usar diretamente o método indicado na tabela 2.8 necessita-se de equipamento (microfluorímetro de fluxo a laser) completo e muito caro, cuja precisão, reprodutibilidade e adequação ao processo não foram ainda convenientemente estudadas; e para usar um analisador contínuo que execute de forma automatizada os métodos convencionais de determinação de proteína (LOWRY, biureto, por exemplo), a dificuldade maior é a ruptura das células e separação das frações de membrana celular. Embora se possa imaginar esquemas para efetuar essas rotinas, elas não serão rápidas o suficiente para que se possa ter a resposta "em-linha".

2.6.6 Oxigênio Dissolvido e Respiração Celular

A medida da concentração de oxigênio dissolvido tornou-se rotineira após o advento dos eletrodos específicos [112,124,178].

Entretanto, apesar desta grandeza ser de fundamental importância para o conhecimento do estado fisiológico da cultura, ela é insuficiente para controlar completamente o processo de produção, uma vez que a concentração de oxigênio dissolvido, como já exposto em 2.4.4, é a resultante de dois processos distintos (a dissolução do oxigênio no meio de cultura e o consumo do mesmo pela cultura microbiana) e muitos fatores [010] influem em cada um desses processos.

A respiração celular por sua vez, pode ser determinada "em-linha", medindo-se as pressões parciais de oxigênio e gás carbônico nos gases efluentes do fermentador [033,045,124,178,206] e utilizando-se o controle do processo, com uma confiabilidade bem maior do que a oferecida pela medida do oxigênio dissolvido [083]. As maiores dificuldades para a medida da respiração celular, entretanto,

estão ligadas ao custo dos equipamentos (analisador paramagnético para O₂ e de radiação infra-vermelha para CO₂ ou cromatógrafo de fase gasosa para ambos), à sua calibração e principalmente à sua manutenção.

Para *Azospirillum brasilense* foram realizadas diversas determinações da "respiração celular" (cf. tabela 2.3) em pontos isolados do crescimento. Não se conhece o padrão de variação da velocidade específica de consumo de oxigênio ao longo de um cultivo descontínuo, e, portanto, não foi possível, ainda, estabelecer uma estratégia de controle do processo, baseada nessa grandeza.

2.6.7 Produção de Ácidos ou Bases

A produção de ácidos ou bases associada ao crescimento celular (cf. 2.3) pode ser usada como indicador para o controle da produção, de microrganismos ou, de forma alternativa, o parâmetro pode ser a massa (ou o número de equivalentes) da substância utilizada para manutenção do pH constante |169|.

Essa segunda forma é mais simples, por depender apenas de um eletrodo e controlador de pH e de uma balança ou de um medidor-talizador de vazão e pode ser usada "em-linha" |010,033,124|.

Em *A. brasilense* sp 7 foi quantificada a produção de ácidos em um cultivo aeróbio em frutose, e amônia |079|, mas essa produção não foi associada nem à concentração nem ao crescimento celulares. Tendo em vista a simplicidade da instrumentação requerida e a rapidez na resposta que se pode obter, esse método de controle do processo deveria ser melhor estudado.

2.7.1 Floculação

O entendimento do que é floculação varia muito com a especialidade em que o assunto esteja sendo tratado.

ATKINSON & DAUD | 005 |, em um trabalho voltado para a engenharia dos processos, asseguram que o fenômeno da formação de colônias multicelulares tem sido tratado como agregação, floculação, peletização e "clumping", sendo que o termo agregação tem sido mais usado para células animais, floculação em lados ativadas e cervejaria, peletização em fungos miceliais e "clumping" em bactérias | 005 |.

SADASIVAN & NEYRA | 167 |, por sua vez, em um trabalho específico sobre *A. brasiliense* diferenciam "formação de flocos" (agregação de células durante o crescimento, segundo esses autores) de "floculação" ("clumping" de células em uma suspensão turbida).

Nesta tese usar-se-á indistintamente "formação de flocos" e "floculação" para indicar a formação de agregados bacterianos perceptíveis a olho nu.

A formação de flocos microbianos pode ser motivada por vários fatores como apontado na tabela 2.9. ATKINSON & DAUD | 005 | discutem-nos e apresentam muitos exemplos.

A agregação celular é importante, e às vezes imprescindível, em muitos processos microbianos, como na produção de cerveja em fermentador tipo torre, tratamento de efluentes por lados ativados ou por digestores anaeróbios de fluxo ascendente, a produção de biomassa fúngica, a produção de antibióticos e enzimas e mais recentemente a produção de etanol por leveduras flocoantes | 005, 138 |.

Na produção de inoculantes agrícolas, entretanto, a floculação

não é desejável, pois ao se misturar a suspensão bacteriana ao su-
 porte |013,014| deve-se obter um produto de composição relativamente
 te uniforme.

Tabela 2.9 Fatores que afetam a flocculação de microrganismos*.

Ambientais		Físicos		Químicos		Microbiológicos	
Genética	Presença de	Prop. hidrodinã	Presença de	Tipos e qua			
Parede celular	quelantes	micas	relações	idade do			
Velocidade de cresci-	relação C/N	aeração	inóculo	idade do			
mento	enzimas	vazão específica	Presença	de outros			
Nutrição	ferrocianeto	tamanho do fer-	de outros	microorga-			
Idade (estado) físico-	substâncias	mentador	microorga-	nismos ou			
Lógico da cultura	nitrogenadas	intensidade de	nismos ou	cepas			
	óleos	agitação					
	açúcares	viscosidade					
	metais	Fenômenos Inter-					
		faciais					
		bolhas de gás					
		agentes tensoati-					
		vos					
		sólidos em sus-					
		pensão					
		Propriedades iô-					
		nicas					
		solventes organi-					
		cos					
		pH					
		Ions cálcio					
		Temperatura					

* FONTE: ATKINSON & DAUD |065|.

A. brasiliense foi apontado como não flocculante |065| mas em pe-
 lo menos duas situações distintas foi comprovada a flocculação |165,
 167|.

NUR et alii |135| associaram a formação de agregados durante o
 crescimento aeróbio de *A. brasiliense* Cd a de carotenóides. A máxi-
 ma flocculação ocorreu em cultivos com malato (5 g/l) e NH₄Cl
 (0,27 g/l) e os agregados chegaram a ter diâmetros maiores do que
 0,1 mm. Em culturas com o dobro de NH₄Cl não se notou a formação

de agregados, o que motivou a sugestão de que os carotenóides e os agregados poderiam estar sendo formados para manter um ambiente microaerófilo e possibilitar a atuação da nitrogênase. Entretanto, como já discutido no item 2.4 nas condições de cultivo empregadas não se esperaria a formação da nitrogênase, e, portanto, não haveria necessidade de proteção química ou compartimental |024,065|.

Num trabalho específico para estudar as condições de floculação, SADISAVAN & NEYRA |167| mostraram que, em muitos casos *a. brasiliense* sp 7 se comporta, em relação à agregação, como *A. lipoferum* sp 59b, cepa esta considerada como flocculante |065|. Nitrato de potássio em conjunto com frutose (cf. 2.1.2.1) eram os melhores indutores da agregação. Os flocos continham uma quantidade apreciável de polímeros exocelulares, formando uma espécie de matriz que prendia as células. Para os autores citados |167| a capacidade de agregação e de produção de tais polímeros poderia ser muito útil na fixação das bactérias na rizosfera e no interior das plantas, sugerindo então que espécies com essas características deveriam ser melhor estudadas. Assim, ao mesmo tempo em que a floculação não é desejável para a manutenção da uniformidade do inoculante, ela talvez seja desejável para a interação planta-bactéria. O desenvolvimento de novos estudos poderá esclarecer qual aspecto é mais vantajoso e, se for o caso, que condições devem ser usadas no crescimento para evitar a floculação e quais devem ser recomendadas no campo para facilitá-la.

2.7.2 Operações Posteriores ao Crescimento Microbiano

A definição das operações a que os microrganismos e/ou seus produtos serão submetidos é muito importante para o desenvolvimento do

processo |182|.

No caso da produção de inoculantes com *A. brasiliense* (cf. figura

7.1) a única operação a que o microrganismo estará sujeito é a

centrifugação, caso a concentração bacteriana seja inferior à mín

ma recomendada, que será calculada logo a seguir. A centrifugação

bacteriana é uma operação tecnicamente dominada, já efetuada em

muitos processos (produção de biomassa, de enzimas, de antibióti-

cos) mas encarece o produto |007| e deve ser evitada, se possível.

Para determinar a necessidade da centrifugação é necessário co-

nhecer a concentração celular mínima que se deve usar para que o

inoculante seja eficiente. Resultados muito recentes (J. Mandel,

informação pessoal, 1987) demonstraram que se deve utilizar um mí-

nimo de 10^7 células de *A. brasiliense* sp 245 por grama de semen-

te de trigo e que para inocular um hectare é necessário um quilo

de inoculante, misturado nas sementes ou aplicado nos sulcos logo

após o plantio. A mesma concentração de bactérias também foi reco-

mandada recentemente para a inoculação de milho |143|.

Com base nessas informações e baseando-se na necessidade média

de 100 kg de semente de trigo para plantar um hectare |170|, na

proporção de mistura de 30% da suspensão bacteriana sobre o total

do inoculante |165,195,170| e admitindo uma viabilidade mínima de 10%

dos microrganismos após 6 meses de armazenamento |197|, pode-se cal-

cular a concentração celular mínima que se deve obter na suspensão

bacteriana que sai do fermentador para que não seja necessária a

centrifugação.

Tem-se:

número total de bactérias por hectare $N_t' = \frac{10^7 \text{ células}}{\text{g semente}} \times 100.10^3 \text{ g} =$

$$= \frac{10^{12} \text{ células}}{\text{ha}}$$

número total, considerando a viabilidade: $N_t = \frac{10^{12}}{10^{-1}} = \frac{10^{13} \text{ células}}{\text{ha}}$

$$\begin{aligned}
 \text{número total necessário no inoculante, } N_0 &= \frac{10^{13} \text{ células}}{\text{ha}} \times \frac{1 \text{ ha}}{\text{kg}} = \\
 &= \frac{10^{13} \text{ células}}{\text{kg}} \\
 \text{concentração da suspensão bacteriana, } N &= \frac{10^{13} \text{ células}}{3,3 \cdot 10^{13} \text{ células}} = \frac{\text{kg}}{0,3 \text{ l}} \\
 \text{considerando 50\% sobre o total do inoculante}
 \end{aligned}$$

Assim, com base nessa estimativa, a suspensão bacteriana deverá ser concentrada por centrifugação caso contenha menos de $3,3 \cdot 10^{13}$ células/l. Valores próximos a estes ($1,4 \cdot 10^{13}$ células/l) já foram utilizados em experimentos de inoculação |015|.

Deve-se observar que a viabilidade considerada (10%) introduz um razoável coeficiente de segurança na estimativa efetuada, uma vez que é possível até mesmo que a população microbiana aumente durante o armazenamento, a exemplo do que já foi observado para inoculantes com *Rhizobium* |017|.

3.1 Microrganismo

Em todos os ensaios foi utilizado *Azospirillum brasilense* sp 245

fornecido pela Dr^a Johanna Doberiner da Unidade de Apoio ao Programa Nacional de Pesquisa em Biologia de Solo da EMBRAPA. Essa cepa foi isolada de raízes de trigo cultivado em Passo Fundo (RS) (BALDANI et alii | 012|).

O microrganismo foi conservado em meio sólido que continha frutose e fosfato monobásico de amônio como principais fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente, sem extrato de levedura (cf. item 3.2.1).

3.2 Meios de Cultura

3.2.1 Soluções-Estoque

Para o preparo de diferentes meios de cultura eram utilizadas as soluções-estoque relacionadas a seguir (todas as porcentagens são em peso/volume):

- I - solução de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ a 10%
- II - solução de NaCl a 10%
- III - solução de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ a 1%
- IV - solução de Fe EDTA a 1,64%
- V - solução de micronutrientes.

A solução de Fe EDTA foi preparada misturando-se 16,0 g Na_2 EDTA (sal di-sódico do ácido etileno diaminotetra-acético) com 11,95 g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ e 950 ml de água, aquecendo-se até dissolução e, após resfriamento, completando-se o volume até 1,0 litro.

A solução de micronutrientes continha, por litro: |015|

1,00 g de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
 1,17 g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
 1,40 g de H_3BO_3
 0,04 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
 0,12 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

3.2.2 Solução Salina

Para transferência do microrganismo e diluição do inóculo foi utilizada solução salina com a seguinte composição, por litro: |012|

3,4 g K_2HPO_4

2 ml da solução de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

1 ml da solução de NaCl

2 ml da solução de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

2 ml da solução de micronutrientes

4 ml da solução Fe EDTA .

O pH desta solução salina foi acertado em 7,0 com NaOH .

3.2.3 Meio de Cultura para Conservação do Microrganismo

O microrganismo foi conservado em meio de cultura sólido contem

do:

5,0 g de frutose

1,32 g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$

2,64 g K_2HPO_4

2,0 ml da solução de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

1,0 ml da solução de NaCl

2,0 ml da solução de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

4,0 ml da solução de Fe EDTA

18,0 g agar-agar

água filtrada ... qsp 1,0 litro.

Para o preparo do meio, juntavam-se os componentes, com exceção da frutose e do agar-agar e acertava-se o pH em 7,1. Em seguida, adicionava-se o agar-agar e o meio era aquecido, com agitação, até fervura.

Após distribuição em tubos de ensaio (5,0 ml por tubo) o meio era mantido à pressão de 1 atm efetiva durante 30 minutos.

A frutose foi sempre utilizada em solução de 100 g/l com pH entre 4,0 e 4,5 (para evitar caramelização durante o aquecimento). Após autoclavagem semelhante aos tubos com meio de cultura, fazia-se a adição de quantidade adequada de solução de frutose para obter a concentração de 5 g/l. Deve-se observar que este procedimento de autoclavar a frutose em separado foi utilizado em todos os ensaios em que foi utilizada como fonte de carbono (ensaios FS, FD e FC).

Após a adição de frutose, com o meio de cultura ainda quente, inclinavam-se aos tubos.

O répique do microrganismo era feito quinzenalmente. Na primeira semana após o répique os tubos eram mantidos na estufa a 30°C e na segunda semana ficavam à temperatura ambiente.

3.2.4 Meio de Cultura Sólido para Preparo do Inóculo

Como será visto no item 3.3.2 o início do preparo do inóculo de todos os ensaios era a transferência do microrganismo para 100 ml de meio de cultura sólido inclinado contido em um erlenmeyer de 250 ml.

O meio de cultura desse erlenmeyer era sempre idêntico ao meio de cultura utilizado no respectivo ensaio, acrescido de 18 g de

agar-agar por litro. As condições de autoclavagem desta suspensão eram as mesmas já descritas no item precedente.

Esse meio sólido inclinado era utilizado com dois objetivos: aumentar a quantidade de microrganismos para a inoculação e evitar a ocorrência de "choques" de nutrientes que poderiam ocorrer caso se passasse o microrganismo desenvolvido em frutose para meios de cultura com glicérol.

3.2.5 Meios de Cultura Líquidos

Os meios de cultura líquidos com frutose ou glicérol como principais fontes de carbono tinham a seguinte composição básica (DIAS et alii | 059|):

5,0 g de frutose (ou 2,5 g de glicérol)
1,32 g de $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$

2,64 g de $\text{K}_2 \text{HPO}_4$

2 ml da solução de $\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

1 ml da solução de NaCl

2 ml da solução $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

4 ml da solução de Fe EDTA

1,0 g de extrato de levedura

água filtrada ... qsp 1000 ml

Os reagentes usados no preparo dos meios de cultura líquidos eram

das seguintes marcas:

frutose : Reagen ou Vetec ou Eclibra

$(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$: Usina Columbina (grau purificado)

$\text{K}_2 \text{HPO}_4$: Merck ou Reagen

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: Reagen

NaCl : Reagen

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: Eclibra

Deve-se observar que na composição dos meios de cultura procurou-se manter concentrações molares aproximadas das fontes de carbono (27,8 mM frutose e 27,2 mM glicérol).

No preparo dos meios de cultura com frutose foi mantido o procedimento de autoclavar esse componente em separado, como já foi observado no item 3.2.3. Da mesma forma, a parte do meio que continha frutose teve seu pH ajustado para 7,1, enquanto a solução de frutose teve pH acertado para 4,5.

Nos ensaios em que foram utilizadas concentrações de frutose ou de glicérol diferentes das indicadas, as concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ e K_2HPO_4 foram proporcionalmente alteradas.

Em alguns ensaios dos experimentos 1,2,5 e 6 os meios de cultura foram preparados sem extrato de levedura para efetuar o levantamento de alguns parâmetros cinéticos e estequiométricos para uso no cálculo do custo do produto sem a adição desse suplemento.

Em outros ensaios do experimento 5 a única fonte de carbono utilizada foi exatamente o extrato de levedura. Estes ensaios (os de nºs ES1 a ES6, item 5.1.2) tinham como objetivo verificar se o apêndice de crescimento de duas fases de crescimento nos ensaios em que se usava glicérol e extrato de levedura (cf. item 5.1.2) podia ser explicada do por um fenômeno de diauxia, com consumo preferencial de algum componente do extrato de levedura (ver discussão no item 5.1.3).

Finalmente, nos ensaios em fermentador (experimentos 3,4,7 e 8) adicionou-se ao meio de cultura 0,05 ml de anti-espumante Q2-3255, fabricado pela Dow Corning do Brasil, por litro de meio de cultura. Esse produto foi escolhido após a realização de alguns ensaios preliminares, onde ele foi comparado com outros seis anti-espumantes.

Fe SO_4 : Reagen
 Na₂ EDTA : Reagen

ção salina. O rodilhão de algodão era substituído por uma rolha a cada erlenmeyer assim preparado eram adicionados 30 ml de solução. Para preparar o inóculo para os ensaios de incubador rotativo, por uma camada esbranquiçada de microrganismos.

Decorrido esse período o meio de cultura apresentava-se coberto a 30°C por 4 a 5 dias.

superfície do meio de cultura e incubava-se o erlenmeyer inclinado movimentos rotativos fazia-se a suspensão espalhar-se por toda a riana e vertendo-se esta última na superfície do meio sólido. Com nismos, agitando-se vigorosamente para obter uma suspensão bacteriana (cf. 3.2.2) previamente autoclavada ao tubo com os microrganismos. Essa transferência era feita adicionando-se 2,0 ml de solução sólida inclinado.

(cf. 3.2.3) para um erlenmeyer de 250 ml contendo 100 ml de meio transferência de *Azospirillum brasilense* sp 245 de um tubo-estoque o primeiro passo para a realização de um ensaio era efetuar a

3.3.2 Preparo do Inóculo

do e frequência de agitação ajustável. Brunswick, com controle de temperatura por circulação de ar aquecido. Foram utilizados incubadores rotativos modelo G-25, marca New

3.3.1 Equipamento

3.3 Ensaios em Incubador Rotativo

trias Químicas). COSPERSE CA, NOP COSPERSE 558A e LI 3255, todos do ATLAS Industes (UCON, da Union Carbide, FOAMASTER TRA, FOAMASTER TRC, NOP

3.7 de borracha previamente submetida a autoclavagem e procedia-se a uma vigorosa agitação para desprender os microrganismos do meio de cultura sólido.

No caso de se utilizar mais de um erlenmeyer para a inoculação, as suspensões obtidas em todos eles eram reunidas em um outro erlenmeyer vazio e seco, devidamente autoclavado.

3.3.3 Padronização do Inóculo

Com o intuito de padronizar o inóculo, uma alíquota de 1 ml da suspensão era retirada com pipeta, e diluída 100 vezes, tendo-se, em seguida, a absorvância dessa suspensão a 540 nm, usando-se solução salina como "branco".

O padrão usado para o inóculo era que a absorvância dessa suspensão devia estar entre 0,02 e 0,03. Quando a absorvância era superior ao limite adicionava-se solução salina para obter a diluição adequada; quando a suspensão se apresentava mais diluída que o necessário, ela era transferida para um erlenmeyer contendo meio sólido inclinado com microrganismos, de modo a aumentar a sua concentração.

3.3.4 Inoculação dos Frascos

Todos os ensaios em incubador rotativo foram feitos com frascos erlenmeyer de 1,0 litro contendo 200 ml de meio de cultura.

A inoculação de cada um dos frascos era feita com 2 ml (1% em volume) da suspensão bacteriana preparada e padronizada como anteriormente descrito.

Foi utilizado fermentador marca New Brunswick Scientific Co., mo-
dolo Microferm, que permitiu a fixação da frequência do agitador,
da vazão de ar e possuía controle automático da temperatura com
precisão de $\pm 0,5^\circ\text{C}$ e de pH por adição de ácido ou alcali e medida
da concentração de oxigênio dissolvido.

3.4.1 Equipamento

3.4 Ensaios em Fermentador, Processo Descontínuo

Em alguns ensaios foi também determinada a concentração celular
em termos de nº de células/l (N):

- absorvância celular
- concentração celular (massa seca)
- fonte de carbono (frutose, glicérol) remanescente
- nitrogênio inorgânico remanescente.

nados:

Em cada amostra dos ensaios de incubador rotativo foram determi-

3.3.6 Determinações Efetuadas

sado e não mais voltava ao incubador.

Frasco do incubador; cada frasco retirado tinha seu conteúdo anali-
sado. A amostragem era feita, retirando-se de tempos em tempos, um
rpm).

Os frascos eram incubados à temperatura constante (variável de
ensayo para ensayo), com velocidade de agitação de $3,33 \text{ s}^{-1}$ (200

3.3.5 Incubação e Amostragem

Para efeito de padronização do inóculo, independentemente da concentração de fonte de carbono utilizada no ensaio em fermentador, usava-se sempre, para o cultivo em agitador rotativo, meios com 1,0 g de extrato de levedura/l e concentrações iniciais de 5,0g frutose ou 3,0 g glicérol (nas condições dos ensaios FS14 e GS11, respectivamente, cf. itens 4.1.2 e 5.1.2.).

O inóculo de um ensaio descontinuo constituía-se de microrganismos cultivados em incubador rotativo, segundo a seqüência descrita no item 3.3.

3.4.2 Preparo do Inóculo

A esterilização do meio de cultura, do fermentador, da solução de NaOH e dos filtros de ar era efetuada por autoclavagem a 121°C por 30 min. Nos ensaios em que se usou frutose como fonte de carbono, a solução desse açúcar a 100 g/litro foi esterilizada em separado e adicionada antes da inoculação.

No ensaio FD1 (cf. 4.3.2) foi utilizado uma única turbina de agitação colocada a 12 cm do fundo do tanque, e volume de líquido de 7,5 litros. Nos demais ensaios, para aumentar os coeficientes de transferência de oxigênio, foram utilizadas duas turbinas (com distâncias de 4 e 16 cm em relação ao fundo) e volume de líquido de 10 litros.

As turbinas usadas para agitação eram do tipo lâmina-plana ("flat-blade" |206|) com diâmetro total de 12 cm e 4 lâminas de 2,5 cm de comprimento por 2 cm de altura.

Para os ensaios descontinuos foi utilizado tanque de vidro com 21 cm de diâmetro por 40 cm de altura, com capacidade nominal de 14 litros.

3.4.3 Inoculação do Fermentador

A inoculação do fermentador era feita quando o cultivo descontínuo no incubador rotativo estava entre a metade e o final da fase exponencial de crescimento. Esse instante era de 12 h e 18 h para ensaios com frutose e glicerol, respectivamente (ver figuras 4.10 e 5.11). O volume do inóculo era cerca de 10% do volume total no fermentador.

3.4.4 Amostragem

Para possibilitar a coleta de amostras de forma asséptica e sem necessidade de abrir ou depressurizar o tanque, adaptou-se um amostrador que foi originalmente proposto por COONEY |044|.

3.4.5 Determinações Efetuadas

Durante os ensaios de crescimento descontínuo em fermentador eram efetuadas as seguintes medidas, a cada 30 minutos:

- vazão de ar
- massa solução NaOH 2N para manutenção de pH constante
- concentração de oxigênio dissolvido
- pressão interna do fermentador

Nas amostras retiradas, a cada hora ou a cada duas horas, eram efetuadas determinações de:

- concentração celular (massa seca)
- absorvância celular
- concentração de proteína celular
- concentração de fonte de carbono remanescente

A inoculação do processo contínuo era feita seguindo a metodologia descrita em 3.4.2 e 3.4.3; neste caso, como o volume total era de 2,0 litros, usava-se apenas o conteúdo de um erlenmeyer (200ml) para a inoculação.

3.5.2 Preparo do Inóculo para o Processo Contínuo

Foi utilizado fermentador marca New Brunswick Scientific modelo Microferm, que permitia as mesmas medidas e controles já apontadas no item 3.4.1. Para os ensaios contínuos foi utilizado um tanque de vidro de capacidade nominal 5,0 litros, com diâmetro de 14,5 cm, com 2,0 l \bar{t} ros de meio de cultura. Foram usadas duas turbinas para agitação, com diâmetro 7,40 cm e 4 pás de 1,5 cm de comprimento por 1,5 cm de altura. As pás ficavam a 4 e 8 cm em relação ao fundo do tanque. Para adição do meio de cultura ao fermentador usava-se uma bomba dosadora, marca Biolatite, modelo DIA-PLUS (Dijon, França).

3.5.1 Equipamentos

3.5 Ensaios em Fermentador, Processo Contínuo

- concentração de nitrogênio inorgânico remanescente. Em alguns ensaios, nas amostras finais, foram determinadas as concentrações celulares em termos de número de células/l. Em alguns ensaios, foi aplicado, em diferentes instantes do processo, o método dinâmico de medida da velocidade específica de respiração (O_2) e do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}) (ver item 3.6.12).

A idade dos inóculos também foi mantida (12 e 18 h para ensaios com frutose ou com glicérol como fonte de carbono).

3.5.3 Início do Processo Contínuo

O início da alimentação de meio de cultura ao tanque (início do processo contínuo) foi feito quando se estimava que a cultura estava próxima do consumo total da fonte de carbono. Essas estimativas foram feitas com base nas curvas de crescimento e consumo determinadas nos ensaios em processo descontínuo levando-se em conta as mesmas condições de cultivo (temperatura, composição de meio) que o ensaio contínuo correspondente.

3.5.4 Determinações Efetuadas

- volume de mosto retirado do fermentador
 - massa NaOH para manutenção de pH
 - vazão de ar
 - concentração de oxigênio dissolvido
 - concentração celular (X) (no efluente do fermentador)
 - absorvância celular
 - fonte de carbono remanescente
 - nitrogênio inorgânico remanescente
 - proteína celular
- Em algumas amostras foi determinada também a concentração celular em número de células/l (N).

3.5.5 Caracterização do Regime Permanente

No cultivo contínuo de *A. brasiliense* sp 245 estabeleceu-se que o sistema se encontrava em regime permanente quando a concentração

celular (X), a concentração de fonte de carbono e a concentração de nitrogênio inorgânico, mantinham-se praticamente constantes por um período superior a duas vezes o tempo de residência do mosto, nas condições estudadas.

Foi escolhido esse critério por tratar-se do cultivo aeróbio de bactéria que possui velocidades específicas de crescimento bastante elevadas ($0,20$ a $0,35 \text{ h}^{-1}$) e que, portanto, apresenta velocidades de resposta bastante rápidas a perturbações impostas ao sistema.

3.6 Métodos de Análises Físicas, Químicas e Microbiológicas

3.6.1 Concentração Celular Mássica (X)

Para efetuar a determinação da concentração celular centrífuga va-se a 4°C um volume adequado do caldo a 15.000 rpm (41.000 g) durante 15 minutos.

Separava-se o sobrenadante, ressuspendia-se o centrífugado em pequeno volume de água destilada e filtrava-se a suspensão através de membrana Millipore (de diâmetro de poro $0,45\mu\text{m}$), previamente pesada.

O resíduo em conjunto com o filtro era colocado em estufa a 85°C por 4 h . Decorrido esse período, colocava-se o conjunto em dessecador e, quando frio, procedia-se à sua pesagem.

3.6.2 Concentração Celular Numérica (N)

A concentração celular (em termos de nº de células totais/L) foi determinada através da contagem direta em câmara de Petroff-Hausser

3.15 área $4 \times 10^{-2} \text{mm}^2$ e profundidade 0,1 mm, com volume unitário de $4 \times 10^{-3} \text{mm}^3$.

Para imobilizar as bactérias usou-se solução a 50% de formaldeído do |105|. A amostra era diluída 20, 50 ou 100 vezes e nessa diluição era adicionada 1 a 2 ml de solução de formaldeído.

Em cada amostra eram sempre contadas 2 gotas e de cada gota contavam-se 8 dos 16 quadrados da câmara. Das contagens efetuadas extraiam-se a média (\bar{n}); conhecendo-se o volume (V) de cada quadrado contado, determinava-se a concentração N através da equação.

$$N = \frac{\bar{n}}{V} \cdot \text{diluição (cel/l)} \quad (3.1)$$

3.6.3 Concentração de Frutose (S)

Para a determinação da concentração de frutose, utilizou-se o método do ácido dinitrossalicílico (DNS), conforme descrito por BERNFELD |022|.

O reagente DNS foi preparado adicionando-se 1 g de ácido dinitrossalicílico lentamente a 20 ml de solução NaOH 2N; em seguida, quando o DNS estava totalmente dissolvido adicionava-se 30 g de sal de Rochelle (tartarato duplo de sódio e potássio). Completava-se o volume a 100 ml com água destilada.

Para efetuar a dosagem, adicionava-se a 1,0 ml da solução de açúcares redutores (AR), 2 ml de solução de DNS em um tubo de Fol-lin-Wu. O tubo era tapado com rolha fendida (para minimizar evaporação), e aquecido por cinco minutos em banho de água em ebulição e a seguir, resfriado em água corrente; completava-se o volume do tubo de Fol-lin-Wu a 25 ml com água destilada, tapava-se com rolha de borracha, homogeneizava-se; determinava-se a transmitância da solução em espectrofotômetro (marca Colleman Jr II) no comprimento

de onda 540 nm.

Para efetuar a leitura era necessário calibrar o espectrofotômetro

com uma prova "em branco" onde a solução de açúcares redutores

era substituída por água destilada.

A cada partida de reagente DNS que se preparava era construída

uma curva de calibração, usando-se como amostras, soluções de frutose

de concentrações conhecidas, na faixa de 0,1 a 1,0 g/l.

3.6.4 Concentração de Glicerol (G)

O método utilizado determinava glicerol e outros polialcoóis que

contêm três ou mais grupos hidroxila adjacentes. O glicerol reagia

com periodato de sódio em solução ácida, formando aldeído acético

e ácido fórmico. O último, uma medida do glicerol na amostra, era

titulado com hidróxido de sódio |098|.

A solução de periodato de sódio era preparada dissolvendo 60 g

de NaIO_4 em água destilada que continha 120 ml de solução 0,1 N de

H_2SO_4 e completando o volume a 1,0 litro com água destilada.

A solução de etileno glicol era preparada adicionando-se um vo-

lume dessa substância a um volume de água destilada.

A determinação da concentração de glicerol era sempre feita no

filtrado ou no sobrenadante da centrifugação provenientes da deter-

minação da concentração celular (cf. 3.6.1). Pesava-se uma amo-

stra de massa indicada pela tabela 3.1 em um béquer de 300 ml.

Em seguida, adicionava-se cerca de 50 ml de água destilada, aci-

do sulfúrico 0,2 N até que o pH se tornasse igual ou inferior a

3,0 e solução de hidróxido de sódio 0,2 N até que o pH atingisse

8,1 ± 0,1. Preparava-se um "branco" com 50 ml de água destilada,

procedendo-se ao mesmo ajuste de pH.

Tabela 3.1 Massa aproximada de solução de glicérol segundo a concentração esperada.

Concentração esperada de glicérol (g/l)	Massa aproximada da amostra (g)
8 a 10	5
5 a 8	10
2 a 5	15
menos de 2	20

Adicionava-se à solução alcalina, 10 ml da solução de periodato de sódio, homogeneizava-se, cobria-se o béquer com um vidro de relógio e deixava-se o recipiente em repouso por 30 minutos, no escuro, em temperatura inferior a 35°C. Adicionava-se 2,0 ml da solução de etilenoglicol 50% e deixava-se em repouso por mais 20 minutos.

Decorrido esse período fazia-se uma titulação potenciométrica com solução 0,05 N de NaOH devidamente fatorada, até pH 8,1 ± 0,1 para amostras e 6,5 ± 0,1 para a prova em branco.

O cálculo da concentração de glicérol (g) (dada em g/l) é feito pela equação:

$$G = \frac{m_a}{(V_a - V_b) N_{NaOH} \cdot 92,095} \quad (3.2)$$

onde: V_a = volume NaOH 0,05 N para titular amostra (ml)
 V_b = volume NaOH 0,05 N para titular branco (ml)
 N_{NaOH} = normalidade exata da solução titulante
 m_a = massa da amostra (g)

3.6.5 Absorbância Celular (A)

A absorbância era determinada na suspensão bacteriana retirada do incubador rotativo ou do fermentador.

Efetua-se a determinação, fazendo a leitura da absorbância da suspensão em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 540 m μ . Como "branco" para a leitura utilizava-se meio de cultura não inoculado.

A leitura era aceita quando na faixa de 0,01 a 0,70 de absorbância. Quando era superior, efetuava-se uma diluição de 10 vezes, tomando-se o cuidado de diluir o "branco" na mesma proporção. Os resultados que constam das tabelas já são as leituras multiplicadas pelas respectivas diluições.

3.6.6 Concentração de Nitrogênio Inorgânico (NI)

Para efetuar a dosagem do nitrogênio inorgânico (ou mais precisamente, amoniacal) procedia-se à destilação por arraste de vapor, recolhimento em ácido bórico e titulação com ácido clorídrico. co.

A destilação era feita em um microdestilador marca Büchi, de procedência suíça. Quando o aparelho estava em ponto de produção de vapor, introduzia-se a amostra (2 ou 5 ml do sobrenadante da centrifugação ou do filtrado) junto com 2 ml de solução 2 N de NaOH e deixava-se destilar por 5 minutos.

O hidróxido de sódio tem a finalidade de evitar que ácidos voláteis eventualmente presentes na amostra sejam arrastados e venham a interferir na titulação posterior.

Recolhia-se o destilado em erlenmeyer de 250 ml que continha 2 ml de solução de ácido bórico a 40 g/l e titulava-se a amônia

presente com ácido clorídrico 0,02 N, usando-se indicador misto de vermelho de metila e verde de bromocresol.

A concentração de nitrogênio (Ni) é dada por:

$$Ni = \frac{N_{HCl} V_{HCl} E_N}{V_a} \quad (\text{em g/l}) \quad (3.3)$$

onde: N_{HCl} = normalidade do HCl

V_{HCl} = volume HCl usado na titulação (ml)

E_N = equivalente-grama do nitrogênio (= 14,035 g)

V_a = volume da amostra destilada (ml)

3.6.7 Concentração de Proteína Celular

A dosagem da proteína celular foi feita pelo método de Lowry [18]

no material seco utilizado para a determinação da concentração celular (cf. 3.6.1), usando metodologia desenvolvida por SCHMIDT

et alii [17].

3.6.7.1 Preparo da Amostra

A membrana Millipore com o material celular seco era colocada

num tubo de ensaio, adicionava-se 25 ml de NaOH 1N e levava-se a

um banho de água fervente por 10 min. Após resfriamento a suspen-

são era transferida quantitativamente para um balão volumétrico de

volume adequado para que a concentração protéica ficasse na faixa

especificada para o método (100 a 400 mg proteína/l) e completava-

se o volume com NaOH 1N.

Homogeneizava-se a suspensão e procedia-se a uma filtração em

A concentração de oxigênio dissolvido era medida através de um eletrodo tipo galvânico, de marca New Brunswick. A calibração do eletrodo, antes da inoculação, era feita, passando-se ar atmosférico pelo meio de cultura por, no mínimo, 2h e admitindo-se que o mesmo estava, dessa forma, saturado em oxigênio. Ajustava-se, então, o medidor em 100%.

3.6.9 Concentração de Oxigênio Dissolvido

Usava-se solução de NaOH 2N para manutenção do pH constante. A adição dessa solução era feita automaticamente a partir do comando do controlador de pH. Para efetuar a medida da massa, colocava-se o recipiente que continha a solução de NaOH em uma balança e media-se a diferença de massa em relação à leitura inicial. Terminado o ensaio fazia-se a titulação da solução o que permitia calcular a massa de NaOH adicionada por litro de cultura.

3.6.8 Massa de NaOH para Manutenção de pH Constante

Utilizou-se para a dosagem das proteínas um analisador contínuo marca Technicon modelo Auto-Analyser II, empregando-se em linhas gerais, o método industrial nº 285-73P do mesmo fabricante [193]. A descrição detalhada dos reagentes e do procedimento foi feita por MACEDO [119] e da forma de efetuar os cálculos da concentração de proteínas descontando o efeito da "proteína-equivalente" da membrana Millipore por SCHMIDTLE et alii [171]:

3.6.7.2 Dosagem de Proteínas

Para transformar as leituras obtidas durante os ensaios (porcentagens de oxigênio dissolvido em relação à saturação) multiplicavam-se as mesmas pela concentração de saturação de oxigênio em água, na temperatura do processo, conforme tabela apresentada por STANDARD METHODS OF WATER AND WASTEWATER ANALYSIS [81].

3.6.10 Pressão Interna do Fermentador

A medida da pressão interna do fermentador era feita através de um manômetro diferencial de tubo em U, vertical, que utilizava água como fluido manométrico.

Conhecendo-se a pressão atmosférica em São Paulo e o diferencial de pressão medido nos gases efluentes, calculava-se a pressão absoluta no interior do fermentador, desprezando-se a variação de vida à altura da coluna de líquido.

3.6.11 Vazão de Ar no Fermentador (\bar{Q}_{ar})

A vazão de ar insuflado no fermentador era medida através de rotâmetros marca Brooks Instruments (Halfield, Pennsylvania, EUA), acoplados aos fermentadores.

Estes rotâmetros foram periodicamente calibrados através de um outro rotâmetro modelo Tri-Flat Variable Area da Fischer & Porter (Warmminster, Pennsylvania, EUA).

A indicação dos rotâmetros dos fermentadores era a vazão de ar a 1 atm e 70°F (21,1°C). Para transformá-la para as condições de processo foi utilizada a equação dos gases perfeitos.

3.6.12 Velocidade Específica de Respiração (O_2) e Coeficiente

Volumétrico de Transferência de Oxigênio (k_{La})

Para a medida de O_2 e k_{La} foi empregado o "método dinâmico", originalmente proposto por TAGUCHI & HUMPHREY [190], e, atualmente, desenvolvido segundo metodologia descrita por WANG et alii [206] e SOBOTKA et alii [178].

Utilizou-se um eletrodo galvânico para medida da concentração de oxigênio dissolvido (marca New Brunswick, modelo FA-180-7665) com tempo de resposta inferior a 30 segundos. (Tempo de resposta e o tempo decorrido para que o eletrodo, submetido a uma perturbação tipo degrau, atinja 63% do valor final [178]).

Para determinar O_2 e k_{La} procedia-se da seguinte forma:

- em um certo instante do cultivo bacteriano no fermentador, interrompia-se o fornecimento de ar e diminuía-se a velocidade de agitação, de 500 para 300 rpm (para diminuir aeração superficial) e acompanhava-se o decaimento da concentração de oxigênio dissolvido fazendo-se leituras de 20 em 20 ou de 30 em 30 segundos;

- antes que a concentração de oxigênio dissolvido atingisse 15% da saturação, restabeleciam-se os valores de aeração e de agitação vigentes antes da perturbação imposta;

- acompanhava-se o aumento da concentração de oxigênio através de leituras de 10 em 10 ou de 20 em 20 segundos.

As curvas obtidas em todas as determinações tinham o aspecto geral mostrado na figura 3.1. Nas equações seguintes, os símbolos são os mesmos da figura 3.1.

Os cálculos de O_2 e k_{La} foram efetuados usando-se a equação:

$$\frac{dC}{dt} = k_{La}(C^* - C) - \text{O}_2 \times \quad (2.7)$$

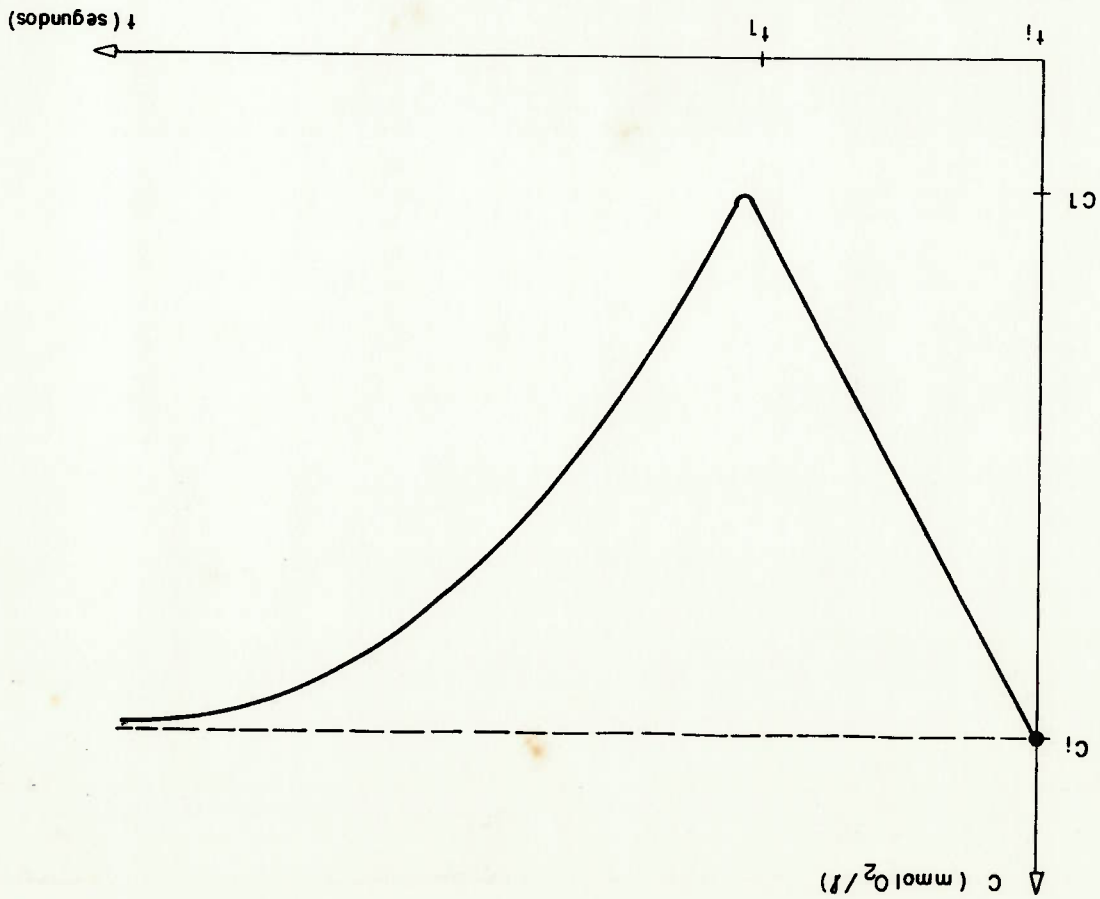


Figura 3.1 Representação da aplicação do método dinâmico para o cálculo de O_2 e k_{La} .

Na primeira etapa, quando a aeragem era suprimida a equação

(2.7) reduzia-se a:

$$(3.4) \quad \frac{dc}{dt} = -k_{La}c$$

Levando-se em conta que a perturbação do sistema era bastante rápida (3 a 5 minutos) podia-se considerar que os valores de O_2 e X eram constantes para cada determinação, obtendo-se, após integração:

$$(3.5) \quad c_1 - c_2 = -k_{La}X(t_1 - t_2)$$

A equação (3.5) representa a equação de uma reta de coeficiente angular $-Q_2X$; desta forma, procurava-se encontrar os trechos lineares nas curvas de decaimento da concentração de oxigênio no período sem aeração. Em algumas determinações foram encontrados dois trechos lineares e quando isso ocorreu, considerou-se o segundo trecho para o cálculo de Q_2 , devido ao atraso na resposta do eletrodo e, principalmente, pela possibilidade de entrada de oxigênio no sistema a partir do ar presente no espaço livre acima do líquido. Uma vez determinado o trecho linear calculava-se a equação da reta e determinava-se Q_2X , que era a demanda global de oxigênio da cultura.

Para determinar Q_2 dividia-se o valor de Q_2X pela concentração celular (X) determinada no momento da aplicação do método dinâmico ou, mais frequentemente, pelo valor de X interpolado da curva de crescimento celular para o instante desejado.

O cálculo de k_{La} é feito com base num rearranjo da equação (2.7), |031| que leva a:

$$\ln \frac{C_1 - C}{C_1 - C_1} = k_{La}(t - t_1) \quad (3.6)$$

Assim, o procedimento para o cálculo de k_{La} a partir dos resultados de reeração obtidos era:

- determinava-se os valores de C_1 e C_1
- calculava-se, para todos os pontos $R = (C_1 - C_1) / (C_1 - C)$
- lançava-se em gráfico nomo-log os valores de R contra $(t - t_1)$ e determinava-se, visualmente, o trecho linear
- calculava-se a regressão linear ($\ln R$ vs $(t - t_1)$) para o trecho selecionado
- o coeficiente angular da regressão era o próprio k_{La} , em unidades

des de $(t-t_1)^{-1}$.

3.7 Métodos para Cálculo dos Fatores de Conversão, Produtividades

e Velocidades Específicas de Crescimento

3.7.1 Processo Descontínuo

Tomando-se como base as curvas genéricas da figura 3.2, determinou-se um tempo "final" (t_F) em que a concentração celular massiva era máxima ou que a fonte de carbono estava esgotada, e em relação a esse tempo calcularam-se os fatores de conversão e produtividade, pelas equações a seguir; onde Q indica o substrato principal (frutose ou glicérol):

fator de conversão de

substrato em células (X)

(3.7)

$$Y_{X/Q} = \frac{X_F - X_0}{Q_F - Q_0}$$

fator de conversão de

substrato em células (N)

(3.8)

$$Y_{N/Q} = \frac{N_F - N_0}{Q_F - Q_0}$$

fator de conversão de

substrato em proteína

celular

(3.9)

$$Y_{P/Q} = \frac{P_F - P_0}{Q_F - Q_0}$$

fator de conversão de

nitrogênio inorgânico

em células (X)

(3.10)

$$Y_{X/N_i} = \frac{X_F - X_0}{N_{iF} - N_{i0}}$$

fator de conversão de

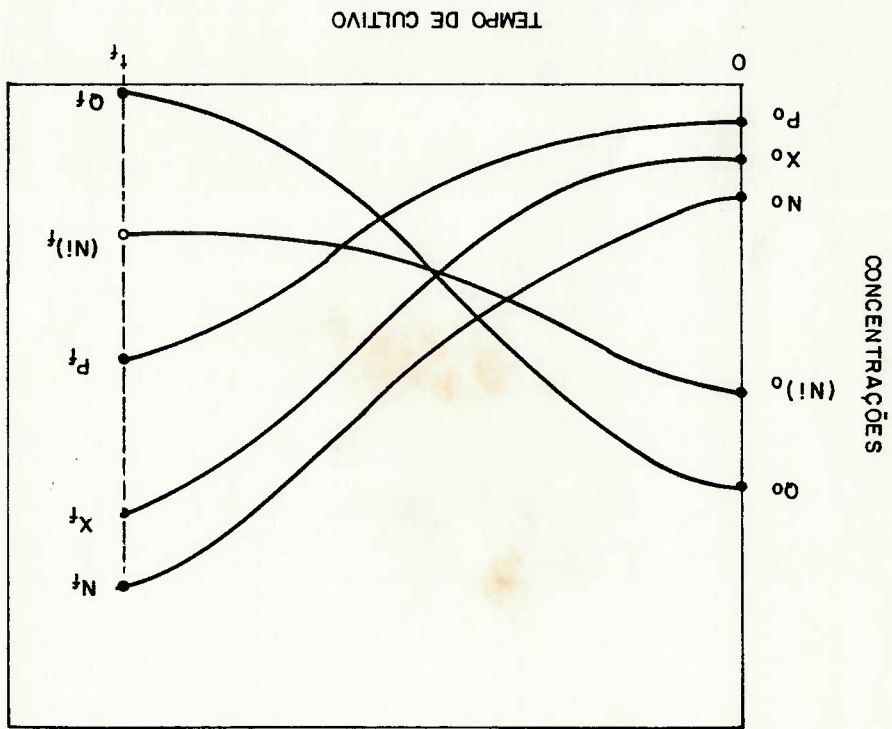
nitrogênio inorgânico

em células (N)

(3.11)

$$Y_{N/N_i} = \frac{N_F - N_0}{N_{iF} - N_{i0}}$$

FIGURA 3.2 - REPRESENTAÇÃO DAS CURVAS DE CONCENTRAÇÃO CELULAR MASSICA (X),
 CONCENTRAÇÃO CELULAR NUMÉRICA (N), PROTEÍNA (P), FONTE DE
 CARBONO (Q) E NITROGÊNIO INORGÂNICO (NI) PARA O CÁLCULO DOS
 FATORES DE CONVERSÃO E PRODUTIVIDADES.



fator de conversão de
nitrogênio inorgânico
em proteína celular

$$Y_{P/N_i} = \frac{P_F - P_0}{(N_i)_0 - (N_i)_F} \quad (3.12)$$

produtividade celular
mássica

$$P_X = \frac{X_F - X_0}{t_F} \quad (3.13)$$

produtividade celular
numérica

$$P_N = \frac{N_F - N_0}{t_F} \quad (3.14)$$

produtividade de proteína
celular

$$P_P = \frac{P_F - P_0}{t_F} \quad (3.15)$$

A velocidade específica máxima de crescimento celular (μ_{max})

|206| foi determinada lançando-se os valores da concentração celu-

lar (X) segundo o tempo de cultivo em gráficos monologarítmicos e

determinando-se, visualmente, o intervalo de crescimento exponen-

cial.

Em seguida, efetuou-se a regressão linear |203| de $\ln X$ contra t

para o referido intervalo e o coeficiente angular da regressão era

o próprio valor de μ_{max} .

3.7.2 Processo Contínuo

O cálculo dos fatores de conversão e das produtividades para o

processo contínuo foi efetuado apenas nos regimes permanentes (cf.

3.5.5).

Chamando-se genericamente Q a concentração da fonte de carbono, indicando-se pelo índice o as condições de alimentação do reator e pelo índice f as do regime permanente e lembrando que não havia cê

lulas na alimentação do reator, pode-se escrever |067| :

(3.16)

$$Y_{X/Q} = \frac{\bar{Q}_j}{X_j} = \frac{\bar{Q}_j - \bar{Q}_j^0}{X_j}$$

fator de conversão de substrato em células (X)

(3.17)

$$Y_{N/Q} = \frac{\bar{Q}_j}{N_j} = \frac{\bar{Q}_j - \bar{Q}_j^0}{N_j}$$

fator de conversão de substrato em células (N)

(3.18)

$$Y_{P/Q} = \frac{\bar{P}_j}{P_j} = \frac{\bar{Q}_j - \bar{Q}_j^0}{P_j}$$

fator de conversão de substrato em proteína celular

(3.19)

$$Y_{X/N_i} = \frac{(N_i)_j}{X_j} = \frac{(N_i)_j - (N_i)_j^0}{X_j}$$

fator de conversão de nitrogênio inorgânico em células (X)

(3.20)

$$Y_{N/N_i} = \frac{(N_i)_j}{N_j} = \frac{(N_i)_j - (N_i)_j^0}{N_j}$$

fator de conversão de nitrogênio inorgânico em células (N)

(3.21)

$$Y_{P/N_i} = \frac{(N_i)_j}{P_j} = \frac{(N_i)_j - (N_i)_j^0}{P_j}$$

fator de conversão de nitrogênio inorgânico em proteína celular

(3.22)

$$P_X = D \cdot X_j$$

produtividade celular
mássica

(3.23)

$$P_N = D \cdot N_j$$

produtividade celular
numérica

3.29 produtividade de proteína celular

$$P_p = D \cdot P_j$$

(3.24)

3.8 Experimentos Realizados e Nomenclatura dos Ensaios

Para estudar o crescimento de *A. brasiliense* sp 245 em diversas fontes de carbono, em diferentes temperaturas e em três sistemas de cultivo foram desenvolvidos oito experimentos. A tabela 3.2 apresenta os títulos desses experimentos e os ensaios que compõem cada um deles.

O nome de cada ensaio é composto de duas letras e um número: a primeira letra (E, F, G) indica a principal fonte de carbono empregada (Extrato de levedura, Frutose ou Glicerol, respectivamente) e a segunda (C, D, S) o processo/equipamento (Contínuo, Descontínuo em fermentador e descontínuo em "Shaker") utilizado no ensaio; o número é sequencial por tipo de ensaio. Por exemplo, o ensaio FS7 foi o sétimo ensaio com frutose como fonte de carbono, realizado em incubador rotativo.

No capítulo 4 são apresentados os ensaios com frutose como fonte de carbono e no 5 os ensaios com glicerol. Nas discussões destes dois capítulos procurou-se tratar cada fonte isoladamente e as comparações entre elas e com os dados de literatura estão no capítulo 6. No capítulo 7 são apresentadas avaliações econômicas para processos alternativos de produção de inoculantes à base de *Azospirillum* nas condições definidas nos experimentos efetuadas. E no capítulo 8 são reunidas as conclusões mais importantes deste trabalho.

Tabela 3.2 Experimentos realizados para o estudo do crescimento de *A. brasiliense* sp 245 e ensaios componentes de cada experimento.

EXPERIMENTO	TÍTULO DO EXPERIMENTO	ENSAIOS
E1	Influência da temperatura no crescimento de <i>A. brasiliense</i> sp 245 com frutose como fonte de carbono	FS1;FS7;FS11;FS12;FS13;FS14;FS15;FS16;FS23
E2	Influência da concentração inicial de frutose no crescimento de <i>A. brasiliense</i> em incubador rotativo	FS14;FS17;FS18;FS19;FS20;FS21;FS23;FS24;FS29;ES1
E3	Influência da concentração inicial de frutose no crescimento de <i>A. brasiliense</i> sp 245 em fermentador, processo descontinuo	FD1;FD2;FD3;FD4;FD5
E4	Influência da vazão específica de alimentação e da concentração inicial de frutose no crescimento de <i>A. brasiliense</i> em processo contínuo	FC1;FC2
E5	Influência da temperatura no crescimento de <i>A. brasiliense</i> sp 245 com glicerol e extrato de levedura como fontes de carbono	GS1;GS4;GS5;GS6;GS9;GS11;GS17;GS20;ES1;ES2;ES3;ES4;ES5;ES6
E6	Influência da concentração inicial de glicerol no crescimento de <i>A. brasiliense</i> sp 245 em incubador rotativo	GS11;GS13;GS14;GS15;GS16;GS19;GS20;ES3
E7	Influência da concentração inicial de glicerol no crescimento de <i>A. brasiliense</i> sp 245 em fermentador	GD2;GD3;GD4;GD5;GD6;GD7
E8	Influência da vazão específica de alimentação no crescimento de <i>A. brasiliense</i> sp 245 em processo contínuo	GCI