

MÁRCIO JOSÉ ROSSI

**TECNOLOGIA PARA PRODUÇÃO DE INOCULANTES  
DE FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS UTILIZANDO  
CULTIVO SUBMERSO EM BIORREATOR *AIRLIFT***

Florianópolis - SC

2006

MÁRCIO JOSÉ ROSSI

**TECNOLOGIA PARA PRODUÇÃO DE INOCULANTES  
DE FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS UTILIZANDO  
CULTIVO SUBMERSO EM BIORREATOR *AIRLIFT***

Tese apresentada ao Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Agenor Furigo Jr.

Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dra. Vetúria Lopes de Oliveira

Florianópolis - SC

2006

## AGRADECIMENTOS

Aos colegas de laboratório, Luiz, Pedro, Luciano, Isabella, Huayna, Carolina, Elza, e Paulo pela colaboração e amizade,

Ao Joaquim pela construção do biorreator e criatividade em vários aspectos do projeto;

Ao Dagoberto pela colaboração e criatividade na confecção de acessórios experimentais,

Aos professores e funcionários do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos,

Aos professores e funcionários do Departamento de Microbiologia e Parasitologia,

Ao Professor Agenor, pela orientação, apoio, amizade e revisão da tese,

À Professora Vetúria, pela amizade, ensinamentos, orientação e revisão da tese,

À Eloane, pelo esforço e trabalho que me permitiram dispor de tempo para realizar este projeto,

Ao Elídio, pela colaboração especial e apoio,

Ao Everton, pela colaboração especial,

Aos meus familiares, pelo apoio, principalmente no momento mais difícil,

À Leyza e à UnC, campus de Caçador, pela colaboração e participação nos experimentos com plantas.

A Estação Experimental da Epagri de Caçador por ceder a casa de vegetação,

Aos técnicos da Epagri e ao Viveiro Floko em Lages pela colaboração na realização de experimentos com plantas,

À FAPESC e CAPES pelo apoio financeiro,

À Universidade Federal de Santa Catarina, pela oportunidade concedida,

Aos membros da Comissão Examinadora, pelas valiosas contribuições e revisão final da tese,

A todos, que de alguma forma contribuíram para a concretização do curso,

**Muito Obrigado!**

## RESUMO

A necessidade crescente de produtos de base florestal criou um déficit mundial, que precisa ser compensado pela utilização de novas estratégias para promover o aumento da produtividade no setor. Em adição, os programas brasileiros de reflorestamento têm que lidar com baixos níveis de fertilidade do solo que determinam o uso de quantidades muito elevadas de fertilizantes para manter a produtividade nos níveis atuais. Esta prática contribui para os altos custos de produção e para impactos ambientais. Estratégias biotecnológicas que tratam da inoculação das plantas com microrganismos promotores do crescimento, tais como os fungos ectomicorrízicos (fECM), são alternativas ao uso de fertilizantes químicos para o aumento da produtividade dessas áreas. A introdução dessa prática nos viveiros florestais depende da seleção de isolados fúngicos eficientes e do desenvolvimento de métodos de produção de inoculantes. No Brasil, um dos principais produtores de madeira no mundo, não há tentativas de introduzir a inoculação micorrízica como uma prática rotineira dos viveiros. Neste contexto, este estudo objetiva estabelecer uma tecnologia para produção de inoculantes de fECM através do cultivo submerso. A cinética de crescimento e de transferência de oxigênio durante o cultivo do fECM *Rhizopogon nigrescens* (isolado UFSC-Rh90) foi estudada em um biorreator *airlift* com circulação externa. Biorreatores *airlifts* são reconhecidos como eficientes para cultivo de microrganismos filamentosos que exigem elevada transferência de massa e baixas tensões de cisalhamento. Para este estudo, foi concebido um biorreator *airlift* de aço inoxidável com 5 L de capacidade. Esse biorreator era equipado com sensor de oxigênio dissolvido esterilizável e o separador de gás foi projetado para melhorar os parâmetros hidrodinâmicos, tais como a velocidade de circulação de líquido ( $U_{Lr}$ ), o gás holdup ( $\epsilon$ ) e, por conseqüência, o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_L a$ ). A velocidade específica de consumo de oxigênio ( $Q_{O_2}$ ) e o  $k_L a$  foram determinados através do método dinâmico, onde a velocidade de sedimentação e o tempo de mistura foram considerados. Os resultados mostraram que o  $k_L a$ , a velocidade específica de crescimento ( $\mu_x$ ) e de respiração ( $Q_{O_2}$ ) são afetadas pelo aumento da concentração da biomassa ( $X$ ), o que ocorre principalmente devido ao aumento no tamanho dos *pellets* de micélio. Isso revela a importância da quantidade e do nível de fragmentação do inóculo na cinética de crescimento. Não foi possível determinar a concentração de oxigênio crítica ( $C_{crit}$ ) nesta situação porque a morfologia do crescimento promoveu uma deterioração contínua das condições de transferência durante o cultivo. Isso indica que níveis elevados de oxigênio dissolvido têm que ser mantidos durante a operação do biorreator. O maior valor de consumo global de oxigênio foi de  $28 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , para uma concentração celular de  $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , durante um ciclo de cultivo com uma vazão específica de ar de  $0,52 \text{ vvm}$ . A quantidade de oxigênio necessária para a manutenção celular foi  $2,36 \text{ mgO}_2 \cdot \text{g}_{cel} \cdot \text{h}^{-1}$ , que correspondeu a 30% da  $Q_{O_2}$  média. A cinética de crescimento para outros cinco isolados - *Scleroderma* sp. (UFSC- Sc42), *Rhizopogon vulgaris* (UFSC-Rh106), *Pisolithus microcarpus* (UFSC-Pt116 e UFSC-Pt188) e *Chondrogaster angustisporus* (UFSC-Ch163) - foi estudada em frascos estáticos. Foram produzidos inoculantes de todos os seis isolados utilizando-se a técnica de imobilização em gel de alginato de cálcio, avaliando-se a viabilidade desses em relação ao tempo de armazenamento. A infectividade e eficiência do inoculante para plântulas de *Eucalyptus* e *Pinus* foram estudadas sob condições de estufa e viveiros. A adição de carvão ativado nas cápsulas de alginato favoreceu a viabilidade do micélio, mantendo-se em 100% após 6 meses de armazenamento sob refrigeração. Enquanto que no tratamento sem carvão, com exceção para os isolados do gênero *Rhizopogon*, a viabilidade era perdida logo após o encapsulamento. Isto indica a necessidade de realização de estudos fisiológicos e bioquímicos, a fim identificar os compostos tóxicos produzidos pelos fungos durante seu crescimento. Nos estudos de inoculação das plantas, verificou-se que todos os isolados foram capazes de colonizar as raízes, apresentando resultados positivos no seu crescimento. Os resultados mostram que a tecnologia de produção de biomassa de fECM em biorreator *airlift* apresenta alta eficiência. A veiculação em gel de alginato de cálcio pode manter a infectividade do inoculante durante longos períodos de armazenamento, sobretudo com a adição de carvão ao inoculante.

Palavras-chave: Fungos ectomicorrízicos, cultivo submerso, inoculante, biorreator *airlift*, hidrodinâmica, transferência de oxigênio.

## ABSTRACT

The increasing need of forest products has created a worldwide deficit that has to be met by the utilization of new strategies to promote a higher productivity in the sector. In addition, Brazilian reforestation programmes have to deal with low levels of soil fertility which determine that very high amounts of fertilizers are necessary to maintain the productivity at the present threshold. This practice contributes to high production costs and to environmental impact. Biotechnological strategies dealing with plant inoculation with growth promoting microorganisms, such as ectomycorrhizal fungi (ECMf), is one alternative to the use of chemical fertilizers for increasing forest productivity. The introduction of this practice in forest nurseries depends on the selection of efficient fungal isolates and the development of inoculum production methods. In Brazil, one of the main timber producers in the world, there is no attempt to introduce controlled mycorrhization as one of the nursery practices. In this context, this study aims to establish a technology of ectomycorrhizal inoculum production through submerged cultivation. In one assay the kinetic of growth and oxygen transfer of an ECMf, *Rhizopogon nigrescens* (isolate UFSC-Rh90), was studied in an airlift bioreactor with external circulation. Airlift bioreactors are well known for their high efficiency in the cultivation of filamentous microorganisms whose growth demands high mass transfer rates and low shear rates. For this study a stainless steel 5-litter airlift bioreactor was conceived. This bioreactor was equipped with a sterilizable dissolved oxygen probe and the gas separator was designed in order to improve hydrodynamic parameters such as liquid circulation rate ( $U_{Lr}$ ), gas holdup ( $\epsilon$ ) and, by consequence, volumetric oxygen mass transfer coefficient ( $k_{La}$ ). The specific oxygen uptake rate ( $Q_{O_2}$ ) and the  $k_{La}$  were determined through the dynamic method, taking into account the sedimentation rate and mixing time. Results show that  $k_{La}$ , as well as the specific growth ( $\mu_x$ ) and respiration rates, are affected by the increase in biomass concentration, which happens mainly through the increase of the size on the mycelium pellets. This indicates the importance of the concentration and the level of inoculum fragmentation on the kinetics of growth. It was impossible to determine the critical oxygen concentration ( $C_{crit}$ ) in this situation because growth morphology promoted a continuous deterioration of the transfer conditions during the course of cultivation. This indicates that high levels of dissolved oxygen have to be maintained during the operation of the bioreactor. The highest value of global oxygen uptake observed was  $28 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , for a cell concentration of  $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , during a cultivation cycle with a specific air flow rate of 0.52 vvm. The amount of oxygen necessary for cell maintenance was  $2.36 \text{ mgO}_2 \cdot \text{g}_{\text{cell}} \cdot \text{h}^{-1}$ , which corresponded to 30% of the average  $Q_{O_2}$ . Growth kinetics of five other isolates - *Scleroderma* sp. (UFSC-Sc42), *Rhizopogon vulgaris* (UFSC-Rh106), *Pisolithus microcarpus* (UFSC-Pt116 and UFSC-Pt188) and *Chondrogaster angustisporus* (UFSC-Ch163) was also studied in static flasks. Inocula of all the six isolates were produced using the calcium alginate immobilization technique and their viability in relation to storage time was evaluated. Their infectivity and efficiency towards *Eucalyptus* and *Pinus* seedlings was studied under greenhouse and nursery conditions. The addition of activated charcoal to the alginate beads improved mycelium viability up to 100% even after 6 months of storage under refrigeration. This indicates that physiological and biochemical studies have to be carried out in order to identify toxic compounds produced by the fungi during their growth. In the inoculation studies, all isolates were able to colonize roots and had a positive effect in the plant growth. Results show that the technology of ECMf biomass production in airlift bioreactors presents high efficiency. The immobilization of the inoculum in calcium alginate contributes to maintain fungal infectivity during a long period of storage, mainly with the addition of activated charcoal.

Key-words: Ectomycorrhizal fungi, submerge cultivation, inoculum, airlift bioreactor, hydrodynamics, oxygen transfer.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	x
LISTA DE QUADROS .....	xiv
LISTA DE TABELAS .....	xv
LISTA DE ABREVIATURAS .....	xvi
LISTA DE SÍMBOLOS .....	xvi
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>19</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>22</b>
<b>2.1 Objetivo geral .....</b>	<b>22</b>
<b>2.2 Objetivos específicos .....</b>	<b>22</b>
<b>2.3 Considerações iniciais .....</b>	<b>22</b>
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1 A produção florestal no Brasil .....</b>	<b>23</b>
3.1.1 O eucalipto .....	25
3.1.2 O pínus .....	27
<b>3.2 Promoção do crescimento vegetal .....</b>	<b>29</b>
3.2.1 A simbiose ectomicorrízica .....	29
3.2.2 A compatibilidade fungo-hospedeiro .....	31
3.2.3 Seleção de fungos ectomicorrízicos eficientes .....	31
3.2.4 Inoculantes ectomicorrízicos .....	32
3.2.5 Eficiência da inoculação .....	34
3.2.6 A diversidade ectomicorrízica no Brasil .....	35
<b>3.3 A produção de inoculantes de fECM .....</b>	<b>35</b>
3.3.1 A cultura submersa e a cultura no estado sólido .....	37
3.3.2 Meios e condições de cultivo .....	38
3.3.3 A veiculação .....	41
<b>3.4 Biorreatores .....</b>	<b>42</b>
3.4.1 Biorreatores <i>airlift</i> .....	44
3.4.1.1 Hidrodinâmica gás-líquido .....	46
3.4.1.2 Transferência de massa gas-líquido .....	47
3.4.1.3 Vantagens e aplicações de biorreatores <i>airlift</i> .....	49
3.4.2 Operação de biorreatores em cultivo de fECM .....	51
<b>3.5 O potencial do mercado de inoculantes ectomicorrízicos no Brasil .....</b>	<b>52</b>
<b>3.6 Considerações finais .....</b>	<b>53</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>54</b>
<b>4.1 Microrganismos utilizados .....</b>	<b>54</b>

<b>4.2 Meios de cultura para os isolados fúngicos</b> .....	55
<b>4.3 Condições de cultivo e de operação</b> .....	57
<b>4.4 Procedimentos de desinfecção e esterilização</b> .....	57
<b>4.5 Métodos analíticos</b> .....	58
4.5.1 Obtenção de amostras .....	58
4.5.2 Determinação da biomassa em cultura líquida .....	59
4.5.3 Quantificação da viabilidade de suspensão miceliana .....	59
4.5.4 Determinação de carboidratos .....	60
4.5.5 Determinação de fenóis totais .....	60
4.5.6 Dosagem de cor .....	61
4.5.7 Determinação da viscosidade .....	61
<b>4.6 Determinação das grandezas de transformação</b> .....	61
4.6.1 Conversão de substrato em biomassa .....	61
4.6.2 Velocidade específica de crescimento .....	62
4.6.3 Velocidade específica de respiração .....	64
4.6.4 Produtividade em biomassa .....	64
<b>4.7 Estudos preliminares</b> .....	65
4.7.1 Viabilidade de inoculante produzido pelo método tradicional – FES .....	65
4.7.2 Efeito do carvão ativo na viabilidade do micélio .....	66
4.7.3 Tempo de fragmentação do micélio .....	66
4.7.4 Estabilidade do gel de alginato de cálcio .....	66
4.7.5 Determinação das velocidades em cultivo estático .....	67
4.7.6 Fatores que afetam o método dinâmico em biorreator <i>airlift</i> .....	67
4.7.6.1 Sedimentação da biomassa .....	67
4.7.6.2 Hidrodinâmica .....	68
4.7.6.3 Constantes de atraso do eletrodo de oxigênio dissolvido .....	68
4.7.6.4 Constante de atraso do sensor de temperatura .....	69
4.7.6.5 Efeito da despressurização .....	69
<b>4.8 Transferência de massa</b> .....	69
4.8.1 Determinação da solubilidade do oxigênio em meio de cultura .....	69
4.8.2 Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio .....	70
4.8.2.1 Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio .....	72
4.8.2.2 Correção do $k_L a$ em função do atraso na resposta do eletrodo .....	74
4.8.3 Transferência e consumo de oxigênio durante o cultivo: det. do $k_L a$ e $Q_{O_2}$ .....	75
4.8.3.1 Correção do $k_L a$ e $Q_{O_2}$ em função do atraso na resposta do eletrodo .....	77
4.8.4 Concentração crítica de oxigênio .....	78
4.8.5 Coeficiente de manutenção e fator de conversão de oxigênio para células .....	79
<b>4.9 Biorreatores utilizados</b> .....	79
4.9.1 Construção do biorreator em aço inoxidável .....	80
4.9.2 Estudos Hidrodinâmicos .....	82
4.9.2.1 Vazão de ar e gás <i>holdup</i> .....	83
4.9.2.2 Velocidade de circulação de líquido .....	84

4.9.2.3 Tempo de mistura .....	85
4.9.2.4 Coeficiente de atrito.....	85
4.9.2.5 Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio .....	86
4.9.2.6 Determinação da pressão no topo do biorreator .....	86
<b>4.10 Produção dos inoculantes em biorreator .....</b>	<b>87</b>
4.10.1 Preparação do inóculo .....	87
4.10.2 Cultivo em biorreator e estudos cinéticos .....	87
4.10.3 Inoculante para estudos de viabilidade e eficiência .....	88
4.10.4 Estudos de viabilidade .....	89
4.10.4.1 Viabilidade dos inoculantes em meio de cultura .....	89
4.10.4.2 Viabilidade dos inoculantes em substrato de plantio .....	90
4.10.4.3 Viabilidade dos inoculantes na presença de plantas .....	90
4.10.5. Efeito da composição do meio de cultura no pH e no crescimento dos fungos .....	91
<b>4.11 Eficiência de inoculante ectomicorrízico em relação à planta .....</b>	<b>91</b>
4.11.1 Forma de aplicação do inoculante .....	91
4.11.2 Tratamento das sementes .....	92
4.11.3 Experimentos em casa de vegetação .....	92
4.11.4 Experimentos em viveiros .....	93
4.11.5 Condições experimentais e coleta dos dados.....	93
4.11.6 Avaliação dos resultados .....	95
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>96</b>
<b>5.1 Estudos preliminares. ....</b>	<b>96</b>
5.1.1 Viabilidade do inoculante produzido pelo sistema tradicional – FES .....	96
5.1.2 Efeito do carvão ativo na viabilidade do micélio .....	98
5.1.3 Tempo de fragmentação do micélio .....	102
5.1.4 Estabilidade do gel de alginato de cálcio .....	103
5.1.5 Determinação das velocidades em cultivo estático .....	104
5.1.6 Fatores que afetam o método dinâmico em biorreator <i>airlift</i> .....	106
5.1.6.1 Sedimentação da biomassa .....	107
5.1.6.2 Constantes de atraso do eletrodo de oxigênio dissolvido .....	108
5.1.6.3 Constante de atraso do sensor de temperatura .....	109
5.1.6.4 Efeito da despressurização .....	110
<b>5.2 Transferência de massa .....</b>	<b>111</b>
5.2.1 Determinação da solubilidade do oxigênio em meio de cultura .....	111
5.2.2 Determinação da viscosidade .....	112
5.2.3 Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio .....	113
5.2.4 Correção do $k_L a$ em função do atraso na resposta do eletrodo .....	113
5.2.5 Determinação do $k_L a$ e $Q_{O_2}$ durante o cultivo .....	115
5.2.6 Correção do $k_L a$ e $Q_{O_2}$ em função do atraso na resposta do eletrodo .....	117
5.2.7 Concentração crítica de oxigênio .....	118
5.2.8 Coeficiente de manutenção e fator de conversão de oxigênio para células .....	119
<b>5.3 Construção do biorreator <i>airlift</i> em aço inox .....</b>	<b>120</b>

5.3.1	Funcionamento do biorreator .....	120
5.3.2	Caracterização hidrodinâmica .....	123
5.3.2.1	Gás <i>holdup</i> e velocidade de circulação de líquido .....	125
5.3.2.2	Tempo de mistura .....	126
5.3.2.3	Coeficiente de atrito .....	127
5.3.2.4	Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio .....	128
5.3.2.5	Determinação da pressão no topo do biorreator .....	130
<b>5.4</b>	<b>Produção de inoculantes</b> .....	<b>131</b>
5.4.1	Cultivo em biorreator e estudos cinéticos .....	131
5.4.2	Inoculante para estudos de viabilidade e eficiência .....	141
5.4.3	Estudos de viabilidade .....	142
5.4.3.1	Viabilidade dos inoculantes em meio de cultura .....	142
5.4.3.2	Viabilidade dos inoculantes em substrato de plantio .....	144
5.4.3.3	Viabilidade dos inoculantes na presença de plantas .....	144
5.4.4	Efeito da composição do meio de cultura no pH e no crescimento dos fungos .....	145
5.4.5	Infectividade e eficiência de inoculante ectomicorrízico em relação à planta .....	147
5.4.5.1	Forma de aplicação do inoculante .....	148
5.4.5.2	Efeito do inoculante no crescimento de eucalipto .....	148
5.4.5.3	Efeito do inoculante no crescimento de pinus .....	151
<b>6.</b>	<b>CONCLUSOES</b> .....	<b>157</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>159</b>
<b>APÊNDICE A:</b>	Planilha do Excel para balanceamento de nutrientes do meio de cultura .....	172
<b>APÊNDICE B:</b>	Utilização de medidas dos gases de saída para determinação de X, $Q_{O_2}$ e $k_L a$ ..	173
<b>APÊNDICE C:</b>	Tempo necessário para atingir a saturação do meio de cultura com oxigênio ..	176
<b>APÊNDICE D:</b>	Cálculo de soluções tampões .....	177
<b>APÊNDICE E:</b>	Dispersão mecânica de <i>pellets</i> durante o cultivo .....	182
<b>APÊNDICE F:</b>	Dados numéricos que geraram as figuras representantes dos cultivos .....	184
<b>ANEXO A:</b>	Sensores para medidas de pH .....	187
<b>ANEXO B:</b>	Transmissor para medidas de pH .....	188

## LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1	Produção comercial de mudas de <i>P. taeda</i> , no viveiro florestal da MOBASA, Rio Negrinho - SC. (Cortesia: Julia G. Dick, 2004) .....	28
Figura 3.2	Desenvolvimento do sistema radicular de pinus provenientes de uma mesma plantação da Fazenda Cerro Azul em Rio Negrinho, SC: sem micorrizas (A) e com micorrizas (B). Observa-se, também, grande diferença entre os diâmetros do caule. (Cortesia: Julia G. Dick, 2004). No detalhe (B') observam-se as ectomicorrizas (Cortesia: Admir J. Giachini & Vetúria L. Oliveira, LECM/UFSC, 2004). .....	30
Figura 3.3	Frutificação de <i>Scleroderma</i> sp. coletada em plantio de pinus da Fazenda São Pedro, Rio Negrinho –SC. (Cortesia: Julia G. Dick, 2004). .....	33
Figura 3.4	Cápsulas de hidrogel contendo o fungo ectomicorrízico <i>Laccaria laccata</i> . (Biosynthetic Pty. Ltd., Austrália). .....	36
Figura 3.5	Biorreator de tanque agitado piloto, equipado com sistemas de controle para as diversas variáveis de processo (Fonte: Bioengineering AG) .....	43
Figura 3.6	Acessórios utilizados na construção de um biorreator: controladores, sistemas de amostragem, válvulas, sistema de limpeza automático, etc. (Fonte: Bioengineering AG) .....	43
Figura 3.7	Biorreator <i>airlift</i> com circulação interna fabricado pela Bioengineering (Cortesia: Daniela M. Soares –Micronal S.A., 2003). .....	45
Figura 3.8	Tipos de biorreatores <i>airlift</i> : Circulação interna, com cilindro dividido (a), com tubo concêntrico (b) e com tubo concêntrico dividido (c); Circulação externa (d). .....	45
Figura 4.1	Representação da interface entre as bolhas de ar e o meio líquido com as películas estagnadas. ....	71
Figura 4.2	Esquema para o balanço de oxigênio na fase líquida em biorreator <i>airlift</i> com circulação externa. ....	72
Figura 4.3	Ilustração para explicar o método dinâmico utilizado para determinar o $k_L a$ e a $Q_{O_2}$ (adaptada de SCHMIDELL, 2001). ....	76
Figura 4.4	Modelo de Monod para o crescimento microbiano (a). Ilustração para explicar a determinação do $C_{crit}$ com a utilização de um sensor de oxigênio dissolvido (b). .....	78
Figura 4.5	Esquema dos biorreatores construídos em aço inox (esquerda) e em vidro borossilicato (direita), com seus respectivos equipamentos acessórios (cinza). Detalhe (a): modificação feita no separador de gás. ....	80
Figura 4.6	Esquema do manômetro em U instalado no biorreator para determinação da pressão formada no topo devido à perda de carga no filtro de saída de gases. ....	86
Figura 4.7	Metodologia para preparação de inóculo. ....	87
Figura 4.8	Metodologia de preparação de inoculante para estudos de viabilidade e eficiência. ....	89
Figura 4.9	Dispositivo para estudos <i>in vitro</i> do efeito das plantas na germinação das cápsulas de inoculante. ....	90
Figura 4.10	Metodologia para análise da infectividade e eficiência do inoculante em plantas. ...	94

Figura 5.1	Aspecto dos inoculantes de fungos ectomicorrízicos produzidos pelo processo FES, em frascos tipo conserva. A incubação foi feita em incubadora BOD, a $25\pm 1$ °C, durante dois meses, na obscuridade. ....	97
Figura 5.2	Inoculante produzido pelo processo FES, após lavagem para remover resíduos do meio de cultura. ....	97
Figura 5.3	Teste de viabilidade de amostras do inoculante produzido pelo processo FES em meio de cultura sólido, com idade variando entre 1 e 6 meses. ....	97
Figura 5.4	Viabilidade de suspensão miceliana do isolado UFSC-Pt116 sem carvão (sc) e com carvão (cc), no momento da fragmentação (a), e 12 dias após o armazenamento sob refrigeração (b). ....	99
Figura 5.5	Viabilidade de suspensão miceliana com carvão do isolado UFSC-Pt116, em meio de cultura sem carvão (a), e em meio de cultura com carvão (b), após 30 dias de armazenamento sob refrigeração. ....	100
Figura 5.6	Viabilidade de suspensão miceliana sem carvão (sc) e com carvão (cc) do isolado UFSC-Ch163, testada com diferentes idades (a), e viabilidade das cápsulas desse inoculante com 15 dias de idade em meio de cultura sem (msc) e com (mcc) carvão ativo, no quarto dia de incubação (b). ....	100
Figura 5.7	Viabilidade de um mesmo lote de cápsulas do isolado UFSC-Pt116 em meio de cultura sólido e em meio de cultura líquido. ....	101
Figura 5.8	Crescimento miceliano do isolado UFSC-Pt116 em meio de cultura sólido adicionado de 1% (a) e 0,3% de carvão ativo (b). Placas com 30 dias de incubação. ....	101
Figura 5.9	Viabilidade de suspensões micelianas preparadas com diferentes tempos de fragmentação. ....	102
Figura 5.10	Viabilidade de cápsulas do inoculante UFSC-Pt116 em meio de cultura líquido. As cápsulas desintegradas por breve agitação não apresentaram viabilidade (a), cápsulas intactas, embora com despolimerização parcial, mantiveram a viabilidade (b). ....	103
Figura 5.11	Viabilidade de cápsulas de inoculante de dois isolados em meio de cultura sólido apresentando desestabilização (intumescimento e perda da consistência) do gel. ....	104
Figura 5.12	Produção de biomassa, consumo de glicose e variação do pH durante cultivo de <i>Scleroderma</i> sp. (UFSC-Sc42) (STREIT <i>et al.</i> , 2005b) (a), e <i>Rhizopogon nigrescens</i> (UFSC-Rh90) (b), em frascos estáticos a $25\pm 1$ °C. ....	105
Figura 5.13	Produção de biomassa, consumo de glicose e variação do pH durante cultivo de <i>Rhizopogon vulgaris</i> (UFSC-Rh106) (a), e <i>Pisolithus microcarpus</i> (UFSC-Pt116) (b), em frascos estáticos a $25\pm 1$ °C. ....	105
Figura 5.14	Produção de biomassa, consumo de glicose e variação do pH durante cultivo de <i>Chondrogaster angustisporus</i> (UFSC-Ch163) (a), e <i>Pisolithus microcarpus</i> (UFSC-Pt188) (b), em frascos estáticos a $25\pm 1$ °C. ....	105
Figura 5.15	Determinação da velocidade específica de crescimento (a) e da conversão de substrato em biomassa (b), para o cultivo do isolado UFSC-Rh90 em frascos estáticos a $25\pm 1$ °C. ....	106
Figura 5.16	Ensaio em proveta para determinação da velocidade de sedimentação. ....	107
Figura 5.17	Teste degrau, com o eletrodo inicialmente zerado com N <sub>2</sub> , colocado em meio de cultura estático saturado com O <sub>2</sub> , a 25 °C: resposta do eletrodo em função do tempo (a) e determinação do tempo de resposta (b). ....	108

Figura 5.18	Teste degrau, com o eletrodo inicialmente zerado com N <sub>2</sub> , colocado em meio de cultura saturado com O <sub>2</sub> e sob agitação, a 25 °C: resposta do eletrodo em função do tempo (a) e determinação do tempo de resposta (b). .....	109
Figura 5.19	Teste degrau, com a temperatura ajustada inicialmente em zero, com água a 0 °C, e depois colocado em água a 63 °C: resposta do eletrodo em função do tempo (a) e determinação do tempo de resposta (b). .....	109
Figura 5.20	Variação da concentração de oxigênio dissolvido em função do tempo, devido à interrupção da aeração (0,20 vvm) e à conseqüente despressurização do biorreator (a). Determinação do efeito equivalente a Q <sub>O2</sub> X (b). Dados experimentais em duplicata. ....	110
Figura 5.21	Resposta do eletrodo de oxigênio dissolvido em relação a quantidades crescentes de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> na presença de catalase. ....	111
Figura 5.22	Variação da viscosidade durante o cultivo do isolado UFSC-Rh90 em biorreator <i>airlift</i> . ....	112
Figura 5.23	Método dinâmico realizado no biorreator <i>airlift</i> utilizando água pura (O <sub>2</sub> removido pela injeção de N <sub>2</sub> ) a 25±0,2 °C e 0,36 vvm: resposta do eletrodo em função do tempo (a), e determinação do k <sub>La</sub> (b). ....	113
Figura 5.24	Variação da concentração real de oxigênio dissolvido (C.C <sub>S</sub> <sup>-1</sup> ) e sinal do eletrodo (C <sub>p</sub> .C <sub>S</sub> <sup>-1</sup> ), durante execução do método dinâmico. Simulação da Equação 4.29 e Equação 4.30 para diferentes valores de k <sub>La</sub> e k <sub>p</sub> . ....	114
Figura 5.25	Variação percentual da concentração de OD em relação à saturação durante a realização do método dinâmico no oitavo (a) e décimo dia (b), durante o cultivo do isolado UFSC-Rh90 a 25±1 °C e 0,20 vvm em biorreator <i>airlift</i> . ....	115
Figura 5.26	Ensaio de viabilidade com CTT onde hifas viáveis reagem formando um pigmento vermelho. No detalhe, <i>pellets</i> de biomassa com diâmetro variando entre 1,6 e 4 mm foram seccionados para mostrar o interior. ....	116
Figura 5.27	Variação experimental da velocidade específica de respiração (Q <sub>O2</sub> ) em função do tempo, e seu valor após corrigido o efeito da despressurização. Cultivo do isolado UFSC-Rh90 em biorreator <i>airlift</i> a 25±1 °C em diferentes vazões de ar. ....	116
Figura 5.28	Dados experimentais do método dinâmico (C <sub>p</sub> ) obtidos em cultivo do isolado UFSC-Rh90. A curva corresponde aos dados teóricos (C <sub>teor</sub> ) e os pontos vazados representam os valores de C <sub>p</sub> corrigido o atraso devido ao tempo de resposta (C <sub>p</sub> corr). ....	117
Figura 5.29	Variação na concentração de oxigênio dissolvido ao longo do tempo, devido ao consumo pelo microrganismo, durante interrupção e posterior retomada da aeração. Cultivo do isolado UFSC-Rh90 em biorreator <i>airlift</i> a 25±1 °C e 0,2 vvm. ...	118
Figura 5.30	Determinação do coeficiente de manutenção para o oxigênio para o cultivo do isolado UFSC-Rh90 nas três vazões de aeração. ....	120
Figura 5.31	Exemplos de locais no biorreator, como portas de sensores e encaixes, que necessitam de desmonte para efetuar uma limpeza correta. ....	121
Figura 5.32	Arranjo experimental com visão em dois ângulos, mostrando os biorreatores <i>airlift</i> construídos em aço inox e em vidro borossilicato, e os equipamentos periféricos. ....	122
Figura 5.33	Seqüências de amostras de dois cultivos do isolado UFSC-Rh90 no biorreator <i>airlift</i> . ....	122

Figura 5.34	Biomassa de dois diferentes cultivos do isolado UFSC-Rh90 no biorreator <i>airlift</i> em inox, mostrando a diferença entre o tamanho dos <i>pellets</i> . .....	123
Figura 5.35	Comparação entre a velocidade superficial de líquido e gás <i>holdup</i> em diferentes vazões de ar (a). Comparação entre os valores de gás <i>holdup</i> obtidos neste trabalho e os obtidos por Pedrini (1997) (b). .....	125
Figura 5.36	Velocidade de circulação do líquido no <i>riser</i> em função da velocidade superficial do gás (a). Comparação entre os valores de gás <i>holdup</i> experimentais e teóricos (b). .....	126
Figura 5.37	Determinação do tempo de mistura no biorreator <i>airlift</i> em inox para vazão de ar de 0,2 vvm. Perfil da temperatura do topo e da base (a) e diferença de temperatura entre o topo e a base (b). .....	127
Figura 5.38	Determinação do coeficiente de atrito através da aplicação dos experimentais e da geometria do biorreator na Equação 4.47, tendo como coeficiente angular o valor de $K_B^{-0,5}$ . .....	128
Figura 5.39	Variação do $k_L a$ em função do gás <i>holdup</i> (a). Valores do $k_L a$ experimentais e valores obtidos através de correlações teóricas (b). .....	129
Figura 5.40	Pressão no topo do biorreator e velocidade superficial de líquido em relação à velocidade superficial do gás, a $25 \pm 0,2$ °C. ....	130
Figura 5.41	Produção de biomassa, consumo de glicose, variação do pH (a), e determinação da conversão de glicose em biomassa (b) o cultivo do isolado UFSC-Rh90 em biorreator <i>airlift</i> de vidro a $25 \pm 1$ °C e 0,40 vvm. ....	132
Figura 5.42	Crescimento na forma de <i>pellets</i> densos em biorreator <i>airlift</i> . ....	132
Figura 5.43	Determinação da velocidade específica de crescimento média durante o cultivo do isolado UFSC-Rh90 em biorreator <i>airlift</i> de vidro a $25 \pm 1$ °C e 0,40 vvm. ....	132
Figura 5.44	Consumo de glicose, produção de biomassa, variação do pH e do oxigênio dissolvido durante o cultivo do fungo <i>Rhizopogon nigrescens</i> (UFSC-Rh90) em biorreator <i>airlift</i> a $25 \pm 1$ °C e 0,20 vvm. ....	133
Figura 5.45	Perfis de velocidade específica de crescimento, velocidade específica de respiração, concentração de biomassa, velocidade de consumo de oxigênio e do coeficiente de transferência de oxigênio, em relação ao tempo, durante o cultivo do fungo <i>R. nigrescens</i> (UFSC-Rh90) em biorreator <i>airlift</i> a $25 \pm 1$ °C e 0,20 vvm. ....	133
Figura 5.46	Consumo de glicose, produção de biomassa, variação do pH e do oxigênio dissolvido durante o cultivo do fungo <i>R. nigrescens</i> (UFSC-Rh90) em biorreator <i>airlift</i> a $25 \pm 1$ °C e 0,36 vvm. ....	134
Figura 5.47	Perfis de velocidade específica de crescimento, velocidade específica de respiração, concentração de biomassa, velocidade de consumo de oxigênio e do coeficiente de transferência de oxigênio, em relação ao tempo, durante o cultivo do fungo <i>R. nigrescens</i> (UFSC-Rh90) em biorreator <i>airlift</i> a $25 \pm 1$ °C e 0,36 vvm. ...	134
Figura 5.48	Consumo de glicose, produção de biomassa, variação do pH e do oxigênio dissolvido durante o cultivo do fungo <i>R. nigrescens</i> (UFSC-Rh90) em biorreator <i>airlift</i> a $25 \pm 1$ °C e 0,52 vvm. ....	135
Figura 5.49	Perfis de velocidade específica de crescimento, velocidade específica de respiração, concentração de biomassa, velocidade de consumo de oxigênio e do coeficiente de transferência de oxigênio, em relação ao tempo, durante o cultivo do fungo <i>R. nigrescens</i> (UFSC-Rh90) em biorreator <i>airlift</i> a $25 \pm 1$ °C e 0,52 vvm. ....	135

Figura 5.50	Determinação da conversão de glicose em biomassa para o cultivo do fungo <i>R. nigrescens</i> (UFSC-Rh90) em biorreator <i>airlift</i> a 25±1 °C em diferentes vazões de ar. ....	136
Figura 5.51	Variação na coloração do extrato de cultivo do fungo <i>R. nigrescens</i> (UFSC-Rh90) em biorreator <i>airlift</i> a 25±1 °C a 0,52 vvm em função do tempo de cultivo. ....	136
Figura 5.52	Nessa seqüência se observa algumas imagens desde o momento da inoculação até a biomassa final já em solução salina com carvão, pronta para ser armazenada. ....	140
Figura 5.53	Dispositivo de encapsulamento da biomassa em gel de alginato de cálcio. A distribuição uniforme da biomassa foi garantida através da agitação constante. ....	141
Figura 5.54	Lotes de inoculantes de fungos ectomicorrízicos encapsulados em gel de alginato de cálcio para estudos de viabilidade e eficiência. ....	142
Figura 5.55	Viabilidade dos inoculantes em meio de cultura em placas. ....	143
Figura 5.56	Viabilidade das cápsulas de inoculantes verificada em meio de cultura sólido....	143
Figura 5.57	Viabilidade do inoculante UFSC-Pt188 em substrato turfa-vermiculita. Devido à baixa densidade das hifas, somente é possível ver a colonização através da ampliação. ....	144
Figura 5.58	Cápsulas de inoculante do isolado UFSC-Pt188 em substrato turfa-vermiculita mostrando o crescimento de hifas na presença (a) e a falta de crescimento na ausência (b) de planta de <i>Eucalyptus dunnii</i> . ....	145
Figura 5.59	Resultado de glicose residual, biomassa e pH final para o cultivo do isolado UFSC-Ch163 em diferentes composições do meio de cultura PGKM. Média de triplicatas. ....	146
Figura 5.60	Efeito dos tampões no pH do meio de cultura e no crescimento dos fungos. ....	146
Figura 5.61	Estudos de infectividade e eficiência do inoculante em mudas de <i>E. dunnii</i> sob condições de casa de vegetação.. ....	148
Figura 5.62	Imagens mostrando torrões com as raízes colonizadas e detalhes ampliados 30X mostrando as micorrizas formadas com os três isolados inoculados .....	150
Figura 5.63	Detalhe de um torrão mostrando as hifas envolvendo completamente uma cápsula do fertilizante Osmocote® para captar seus nutrientes e transferir para as raízes através das micorrizas. ....	151
Figura 5.64	Avaliação dos resultados de experimento de micorrização controlada em pínus em condições de viveiro comercial de mudas. Viveiro Floko em Lages-SC. ....	153
Figura 5.65	Aspecto de micorrizas observadas no experimento com pínus em viveiro. ....	155

## LISTA DE QUADROS

Quadro 3.1	Área plantada com reflorestamentos no Brasil, por Estado e gênero (em ha) (CARON NETO, 2000). ....	24
Quadro 4.1	Isolados de fungos ectomicorrízicos da coleção do LECM da UFSC. ....	55

Quadro 4.2	Composição dos meios de cultura utilizados como base para os estudos de produção de biomassa. ....	55
Quadro 4.3	Micro-nutrientes para complementação dos meios de cultivo. ....	56
Quadro 4.4	Dados de projeto utilizados na construção dos biorreatores. ....	82
Quadro 4.5	Vazões de aeração para caracterização hidrodinâmica do biorreator <i>airlift</i> de 5 L. Os valores em destaque foram estabelecidos para os estudos de transferência de massa. ....	84
Quadro 4.6	Modificações do meio de cultura PGKM testadas em cultivo em meio líquido em frascos. ....	91
Quadro 5.1	Variáveis cinéticas e fator de conversão obtidos do cultivo em frascos estáticos a $25\pm 1$ °C. O valor do pH inicial médio foi 5,7. ....	106
Quadro 5.2	Variáveis de cultivo avaliadas no momento da realização do ensaio para determinação de $C_{crit}$ . O ensaio foi realizado na metade do tempo de cultivo total ....	119
Quadro 5.3	Parâmetros hidrodinâmicos obtidos experimentalmente em solução fisiológica, para caracterização do biorreator <i>airlift</i> construído em aço inox. ....	124
Quadro 5.4	Comparação dos parâmetros hidrodinâmicos de diversos trabalhos obtidos para diferentes biorreatores, para um velocidade de gás ( $U_G$ ) igual a $0,02 \text{ m.s}^{-1}$ . ....	129
Quadro 5.5	Valores das variáveis obtidas durante o cultivo do isolado UFSC-Rh90 no biorreator <i>airlift</i> em inox. O "f" subscrito refere-se ao último valor experimental. ....	138

## LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1	Crescimento e colonização radicular de mudas de <i>Eucalyptus dunnii</i> após 3,5 meses em casa de vegetação, inoculadas com fungos ectomicorrízicos produzidos em biorreator <i>airlift</i> e encapsulados em gel de alginato de cálcio. MIP/UFSC, abril de 2005. ....	149
Tabela 5.2	Crescimento e colonização radicular de mudas de <i>Eucalyptus dunnii</i> após 5 meses em casa de vegetação, inoculadas com duas doses de fungos ectomicorrízicos produzidos em biorreator <i>airlift</i> e encapsulados em gel de alginato de cálcio. MIP/UFSC, julho de 2005. ....	150
Tabela 5.3	Crescimento, colonização radicular e conteúdo de fósforo em mudas de <i>Pinus taeda</i> após 6 meses em casa de vegetação, inoculadas com fungo ectomicorrízico produzido em biorreator <i>airlift</i> , encapsulado em gel de alginato de cálcio e armazenado durante 8 meses sob refrigeração. Caçador – SC, maio de 2003. ....	152
Tabela 5.4	Crescimento e colonização radicular de mudas de <i>Pinus taeda</i> após 6 meses em viveiro, inoculadas com fungos ectomicorrízicos produzidos em biorreator <i>airlift</i> e encapsulado em gel de alginato de cálcio. Lages – SC, novembro de 2004. ....	153
Tabela 5.5	Crescimento e colonização radicular de mudas de <i>Pinus taeda</i> após 6 meses em viveiro, inoculadas com fungos ectomicorrízicos produzidos em biorreator <i>airlift</i> e encapsulados em gel de alginato de cálcio. Caçador - SC, junho de 2005. ....	154

## LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	adenosina trifosfato
®, <sup>TM</sup>	marca registrada
C/N	relação definida entre as fontes de glicose e as fontes de nitrogênio
ca.	cerca de
cf.	conforme
CMC	Carboximetilcelulose
CNTP	condições normais de temperatura e pressão
CTT	cloreto de trifenil tetrazolium
DBO	demanda bioquímica de oxigênio
DNS	ácido 3,5-dinitrosalicílico
ENGEBIO	Laboratório de Engenharia Bioquímica
fECM	fungo ectomicorrízico
FES	cultivo no estado sólido
GOD	enzima glicose-oxidase
ha	hectare
HPLC	cromatografia líquida de alta performance
LECM	Laboratório de Ectomicorrizas
mg	miligrama
min.	minuto
MNM	meio de Melin Norkrans modificado
NPK	adubo à base de nitrogênio, fósforo e potássio
Ø	diâmetro
OD	oxigênio dissolvido
PGK	meio de Pridham-Gottlieb modificado
PTFE	politetrafluoretileno
STR	reator de tanque agitado
TIG	Soldagem que utiliza eletrodo de tungstênio em atmosfera de gás inerte
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
vs.	versus
v/v	volume por volume
vvm	volume de ar por volume de meio por minuto

## LISTA DE SÍMBOLOS

A	área	cm <sup>2</sup>
A <sub>d</sub>	área da seção transversal do <i>downcomer</i>	cm <sup>2</sup>
A <sub>r</sub>	área da seção transversal do <i>riser</i>	cm <sup>2</sup>

C	concentração de oxigênio no líquido	$\text{mgO}_2.\text{L}^{-1}$
$C_{\text{crit}}$	concentração de oxigênio dissolvido crítica	$\text{mgO}_2.\text{L}^{-1}$
$C_d$	concentração de oxigênio no <i>downcomer</i>	$\text{mgO}_2.\text{L}^{-1}$
$C_i$	concentração de oxigênio dissolvido na interface gás-líquido	$\text{mgO}_2.\text{L}^{-1}$
$C_s$	concentração de saturação do oxigênio no líquido	$\text{mgO}_2.\text{L}^{-1}$
$C_p$	concentração de oxigênio dissolvido lida pelo eletrodo	$\text{mgO}_2.\text{L}^{-1}$
D	diâmetro interno do <i>riser</i>	mm
$F_L$	vazão volumétrica de líquido	$\text{L.h}^{-1}$
g	aceleração devido à gravidade	$\text{m.s}^{-2}$ , $\text{N.kg}^{-1}$
H	altura	m
H	constante de Henry	$\text{mgO}_2.\text{L}^{-1}.\text{atm}^{-1}$
h	altura da coluna de líquido	m
$h_D$	altura da dispersão gás-líquido	m
K	número de fatores	-
$K_B$	coeficiente de atrito	-
$k_g$	coeficiente de transferência de massa da película gasosa	$\text{cm.h}^{-1}$
$k_L$	coeficiente de transferência de massa da película líquida	$\text{cm.h}^{-1}$
$k_{L,a}$	coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio	$\text{h}^{-1}$
$k_p$	constante de atraso do eletrodo	$\text{h}^{-1}$
$L_{CP}$	comprimento da junção horizontal que conecta o <i>riser</i> e o <i>downcomer</i>	cm
m	massa	g
$m_{a+f}$	massa da amostra seca+ massa do papel filtro	g
$m_f$	massa do papel filtro	g
$m_s$	coeficiente de manutenção para o substrato	$\text{mg}_{\text{sub}}.\text{g}_{\text{cel}}^{-1}.\text{h}^{-1}$
$m_o$	coeficiente de manutenção para o oxigênio	$\text{mgO}_2.\text{g}_{\text{cel}}^{-1}.\text{h}^{-1}$
$n_{O_2}$	fluxo de oxigênio	$\text{mgO}_2.\text{cm}^{-2}.\text{h}$
P	pressão	atm, bar
$P_{\text{atm}}$	pressão atmosférica	atm, bar
$p_g$	pressão parcial de oxigênio no gás	atm
$p_i$	pressão parcial de oxigênio na interface gás-líquido	atm
$p_L$	pressão parcial de $\text{O}_2$ em equilíbrio com a concentração de $\text{O}_2$ no líquido	atm
$P_X$	produtividade média em biomassa	$\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$
$Q_{O_2}$	velocidade específica de respiração	$\text{mgO}_2.\text{g}_{\text{cel}}^{-1}.\text{h}^{-1}$
$r_s$	velocidade de consumo de substrato	$\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$
S	concentração de glicose durante um cultivo	$\text{g.L}^{-1}$
$S_0$	concentração inicial de glicose	$\text{g.L}^{-1}$
t	tempo	dia
$t_c$	tempo médio de uma recirculação completa	s

$t_d$	tempo gasto para o líquido percorrer o downcomer	s
$t_{dup}$	tempo para duplicação da biomassa	dia
$t_f$	tempo total de um cultivo	dia
$t_m$	tempo de mistura	s
$U_g$	velocidade superficial do gás no riser	$m.s^{-1}$
$\bar{U}_{LC}$	velocidade média de circulação de líquido	$m.s^{-1}$
$U_{Ld}$	velocidade superficial do líquido no <i>downcomer</i>	$m.s^{-1}$
$U_{Lr}$	velocidade superficial do líquido no <i>riser</i>	$m.s^{-1}$
$V$	volume	L
$V_a$	volume da amostra	L
$V_D$	volume da dispersão gás-líquido	L
$V_r$	Volume do <i>riser</i>	L
$V_E$	aumento do volume de líquido pela expansão do gás	L
$V_L^d$	volume de líquido no <i>downcomer</i>	L
$V_L^r$	volume de líquido no <i>riser</i>	L
$V_d$	volume do <i>downcomer</i>	L
$X$	concentração de biomassa	$g.L^{-1}$
$X_0$	concentração inicial de biomassa	$g.L^{-1}$
$X_{0i}$	concentração celular no início da fase exponencial	$g.L^{-1}$
$x_C$	distância percorrida por um traçador durante uma circulação completa	m
$X_f$	concentração final de biomassa	$g.L^{-1}$
$X_m$	concentração máxima de biomassa	$g.L^{-1}$
$y_O$	fator de conversão de oxigênio para células	$g_{cel}.g_{O_2}^{-1}$
$Y_{X/S}$	fator de conversão de substrato (glicose) em biomassa	$g_{cel}.g_{sub}^{-1}$
$Y'_{X/S}$	fator de conversão verdadeiro de substrato em biomassa	$g_{cel}.g_{sub}^{-1}$
$\emptyset_{ar}$	vazão específica de ar	$min^{-1}$
$\mu$	viscosidade	mpoise
$\mu_M$	velocidade específica de crescimento na fase exponencial	$dia^{-1}$
$\mu_S$	velocidade específica de consumo de substrato	$dia^{-1}$
$\mu_X$	velocidade específica de crescimento de células	$dia^{-1}$
$\epsilon$	<i>gás holdup</i>	-
$\epsilon_d$	<i>gás holdup no downcomer</i>	-
$\epsilon_r$	<i>gás holdup no riser</i>	-
$\rho$	massa específica	$g.cm^{-3}$

## 1. INTRODUÇÃO

Para suprir a demanda crescente de madeira, florestas estão sendo continuamente plantadas em nosso país, sendo necessário, para isso, a produção de cerca de 100 milhões de mudas por mês, e a incorporação de novas áreas para plantio. Devido às limitações impostas a esta última, surge a necessidade do desenvolvimento de tecnologias que aumentem a produtividade das plantações.

Para a produção de madeira em regiões tropicais, o eucalipto e o pinus se apresentam como excelentes opções, em virtude de sua diversidade de espécies, adaptabilidade, potencial de produção e características físico-mecânicas, sendo utilizados na obtenção de celulose e papel, madeira processada, postes, para geração de energia, na indústria química e farmacêutica, entre outros.

Entre as tecnologias que poderão contribuir para o aumento da produtividade das plantações florestais, encontra-se a inoculação das plantas com fungos micorrízicos previamente selecionados, capazes de promover um melhor estabelecimento e crescimento, principalmente em solos pobres ou degradados. Os efeitos positivos observados em vários estudos revelam o potencial dessa prática como ferramenta biotecnológica para os sistemas de produção de mudas no setor florestal, proporcionando vantagens para produtores e indústrias do setor.

As espécies de *Eucalyptus* e *Pinus* encontram-se entre aquelas que dependem da simbiose micorrízica, particularmente do tipo ectomicorrízica, para sua sobrevivência e crescimento. Essa associação entre certos fungos e raízes tem proporcionado ganhos em sobrevivência e produtividade. Nessa interação, o fungo proporciona à planta uma maior capacidade de utilização de água e nutrientes, dentre outros, e a planta, por sua vez, fornece ao fungo carboidratos produzidos durante a fotossíntese.

Além da seleção dos fungos mais eficientes para o estabelecimento de programas de inoculação micorrízica, é necessário produzir inoculantes dos fungos em escala industrial. Esta etapa tem sido uma das principais limitações ao uso rotineiro de fungos ectomicorrízicos nos programas de reflorestamento, devido às dificuldades na multiplicação desses fungos.

No Brasil, a inoculação micorrízica limita-se ao uso de substratos contendo propágulos dos fungos, obtidos da compostagem de cascas e folhas, ou o uso de esporos obtidos de frutificações. A desvantagem desse tipo de inoculante, dito “natural”, reside no fato de não permitir avaliar previamente a compatibilidade e a eficiência do(s) fungo(s) introduzido(s) em relação à planta hospedeira. Além disso, a variabilidade na qualidade do inoculante é muito alta, apresentando, ainda, riscos de introdução de doenças e pragas, e a perpetuação de espécies ineficientes.

Os inoculantes mais apropriados são os micelianos ou vegetativos, produzidos em cultura pura, que permitem a utilização de isolados previamente testados quanto à sua compatibilidade e eficiência. Sua produção é geralmente feita por meio de cultivo em meio sólido utilizando uma mistura turfa-vermiculita complementada com nutrientes. Embora apresente limitações no aumento de escala e nos custos de produção, é um tipo de inoculante de qualidade já comprovada, sendo utilizado em alguns países.

Um método que permite a produção em maior escala, e com menos espaço, é representado pelo cultivo submerso desses fungos em biorreatores, seguido de veiculação numa matriz protetora, como em gel de alginato de cálcio. Estudos em viveiros demonstraram que este tipo é mais eficiente que o inoculante em substrato sólido, provavelmente devido à maior proteção do micélio no solo. Além dessa vantagem, o inoculante encapsulado proporciona maior facilidade no armazenamento e transporte, devido aos menores volumes, e viabilidade mais prolongada que o inoculante em substrato sólido, reduzindo-se, assim, a quantidade a ser empregada.

Entretanto, apesar de vários anos de estudos, ainda não foram estabelecidas técnicas rotineiras de cultivo submerso para fungos ectomicorrízicos. Algumas das razões para isso residem na dificuldade dos fungos ectomicorrízicos crescerem em cultura líquida e na manutenção da viabilidade devido a problemas como a intoxicação por produtos do metabolismo. Essa dificuldade parece, também, resultar da falta de estudos fisiológicos e bioquímicos do crescimento desses fungos em biorreatores e de estudos relacionados aos fenômenos de transporte envolvidos no cultivo. Com o conhecimento desses aspectos, e a utilização de técnicas adequadas de cultivo submerso em biorreator, poderão ser produzidos inoculantes de alta qualidade, e em quantidade adequada para atender às necessidades dos futuros programas de inoculação micorrízica.

Processos multifásicos gás-sólido-líquido são comuns na indústria bioquímica, e os biorreatores formam o núcleo desses processos. Um biorreator precisa ter boa capacidade de mistura para se atingir uma distribuição homogênea do oxigênio transferido, bem como de outros nutrientes, para o seio do fluido. A hidrodinâmica do biorreator também afeta seu desempenho em parâmetros tais como a transferência de calor e massa. A natureza dos fluidos afeta o transporte de oxigênio e o fenômeno da mistura.

O biorreator de tanque agitado tem sido aplicado extensamente para cultivos aeróbios. Entretanto, este tipo de reator não é o mais adequado para o cultivo de fungos filamentosos. Dentre as razões para isso, encontra-se a ocorrência de danos ao micélio devido ao alto grau de cisalhamento provocado pelo nível de agitação requerido para transferência de oxigênio. Além disso, a energia mecânica necessária para realizar a transferência de massa é elevada e antieconômica para equipamentos de grande porte, sendo, também, dissipada no fluido na forma de calor, que precisa ser removido para controle da temperatura.

Em biorreatores *airlift* as forças de cisalhamento são muito mais baixas, permitindo que a integridade do micélio seja preservada. A turbulência gerada pela injeção de ar e recirculação de líquido e a grande distância que as bolhas de gás devem atravessar em contato com o líquido promovem altos níveis de transferência de oxigênio, que podem proporcionar processos de produção de microrganismos em grande escala. O biorreator *airlift* pode ter circulação interna ou externa, e é de construção fácil e barata, principalmente pela ausência do sistema mecânico de agitação.

Desde 1988, o Laboratório de Ectomicorrizas do Departamento de Microbiologia e Parasitologia (MIP) da UFSC vem desenvolvendo estudos sobre fungos ectomicorrízicos em *Eucalyptus* e *Pinus*. O laboratório mantém uma coleção de mais de 100 isolados, pertencentes a mais de 40 espécies, cuja maioria foi obtida em plantações de Santa Catarina. Resultados desses estudos permitiram selecionar fungos eficientes, com potencial para utilização em programas de controle de micorrização.

O desenvolvimento de tecnologias para a produção de inoculantes de fECM é um fator chave para a adoção da prática de controle da micorrização, visto que as informações sobre a ecologia e biologia das associações micorrízicas com plantas recomendam essa prática.

Este estudo foi desenvolvido com a colaboração dos departamentos de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos (EQA-CT), através do Laboratório de Engenharia Bioquímica (ENGEBIO), e Departamentos de Microbiologia e Parasitologia (MIP-CCB), através do Laboratório de Ectomicorrizas (LECM) da UFSC, com o objetivo de desenvolver tecnologia para produção de inoculantes ectomicorrízicos para o setor florestal. Ele representou uma continuação do trabalho de mestrado do autor (ROSSI, 2001), no qual se iniciou a pesquisa de produção desses inoculantes utilizando um biorreator *airlift*, e desenvolveu-se uma base importante de conhecimentos para que neste estudo fosse possível atingir resultados mais concretos com relação ao processo para produção de inoculante em escala comercial.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Desenvolvimento de tecnologia para produção de inoculantes de fungos ectomicorrízicos em larga escala utilizando cultivo submerso, para inoculação de mudas de pinus e eucalipto em viveiros florestais.

### 2.2 Objetivos específicos

1. Construir um biorreator *airlift* em aço inox, com acessórios para a realização de estudos de transferência de oxigênio, e caracterizar sua hidrodinâmica;
2. Estabelecer os valores adequados para as variáveis de cultivo concentração celular inicial, nível de fragmentação do inóculo, nível de aeração e pressão de operação;
3. Adequar o meio de cultura quanto ao pH, balanceamento de nutrientes (C/N) e concentração das fontes de carbono;
4. Determinar as variáveis cinéticas (velocidade específica de crescimento e produtividade) e a conversão de substrato em células para seis isolados de fungos ectomicorrízicos;
5. Estudar a transferência de oxigênio durante o cultivo;
6. Veicular os inoculantes em gel de alginato de cálcio e avaliar sua viabilidade em relação ao tempo de armazenamento;
7. Avaliar a infectividade e eficiência dos inoculantes em plantas de *Pinus* e *Eucalyptus* em condições de casa de vegetação e de viveiros comerciais.

### 2.3 Considerações iniciais

Para este estudo foi montado no MIP um laboratório temporário para estudos de produção de inoculantes (LTPI), que permitiu melhores condições de trabalho frente às dificuldades inerentes ao cultivo de fungos ectomicorrízicos. No LTPI foram realizadas as etapas produção de inóculo, ensaios em frascos estáticos, estudos de viabilidade dos inoculantes e estudos cinéticos e de transferência de massa em biorreator. Os estudos de infectividade e eficiência dos inoculantes foram realizados na casa de vegetação do MIP, no viveiro Floko em Lages e num viveiro da Associação de Produtores de Caçador, localizado na região meio-oeste do estado de Santa Catarina.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 A produção florestal no Brasil

A implantação de florestas no Brasil, em sua grande maioria com espécies exóticas, é consequência da evolução da estrutura industrial que tem como objetivo atender a demanda das regiões mais desenvolvidas do país com matéria-prima necessária para a produção de papel, celulose, chapas, aglomerados, carvão vegetal, móveis, e outros (SCHUMACHER, 2003). O setor industrial de base florestal tem sido marcado por um processo de utilização crescente de madeiras provenientes de reflorestamento, sintonizando-se com a ordem mundial, que enfatiza a preservação das florestas naturais e incentiva a implantação de florestas renováveis (SOARES, *et al.*, 2003). O processo de conscientização, os movimentos para preservação da natureza, as restrições legais e os impedimentos burocráticos tornaram o processo de uso e consumo de madeiras nativas cada vez mais proibitivo. Nesse período o setor industrial madeireiro foi adaptando-se ao processamento e uso da madeira proveniente das florestas plantadas, principalmente com eucaliptos e pinus.

Atualmente, a área plantada estimada corresponde a 4,8 milhões de hectares (Quadro 3.1) representando somente 1% da área florestal do país. Desse total, 75% estão vinculados à indústria e o restante disponível ao mercado geral. A maior concentração está nas regiões sudeste (51%) e sul (26%). Consolidado para o processamento mecânico, o gênero *Pinus* está concentrado em 57% na região sul do Brasil, especialmente no Paraná e Santa Catarina. O gênero *Eucalyptus* está concentrado em cerca de 70% na região sudeste, principalmente em Minas Gerais e São Paulo (CARON NETO, 2000). A produção primária florestal do Brasil, em 2002, somou quase 6 bilhões de reais. O segmento silvicultura contribuiu com 52% e o extrativismo vegetal com 48% desse total.

Atualmente, estima-se que no cenário macroeconômico nacional, o setor da indústria de base florestal represente 4,5% do PIB. Isto caracteriza um montante de aproximadamente 23 bilhões de dólares (INSTITUTO DE PLANEJAMENTO E ECONOMIA AGRÍCOLA DE SANTA CATARINA, 2004). Neste contexto, os produtos oriundos da atividade florestal, pela exploração de madeira como matéria-prima, tornam a atividade auto-sustentável, tendo em vista que se trata de um recurso renovável e com menor consumo de energia, quando comparada a outros produtos como ferro, aço, tijolos, etc. Além disso, os produtos podem ser considerados ambientalmente corretos, pois são recicláveis e biodegradáveis.

Estado	Eucalipto	Pínus	TOTAL
Minas Gerais	1.535.290	143.410	1.678.700
São Paulo	574.150	202.010	776.160
Paraná	67.000	605.130	672.130
Santa Catarina	41.150	318.120	359.670
Bahia	213.400	238.390	451.790
Rio Grande do Sul	115.900	136.800	252.700
Demais estados	418.990	196.190	615.180
<b>TOTAL</b>	<b>2.965.880</b>	<b>1.840.050</b>	<b>4.805.930</b>

Quadro 3.1 Área plantada com reflorestamentos no Brasil, por estado e gênero (em ha) (CARON NETO, 2000).

O consumo de madeira proveniente de florestas plantadas tem aumentado muito, sendo da ordem de 108 milhões de m<sup>3</sup>/ano. Os setores que mais concentram o consumo são o de produção de papel e celulose (30%), o energético (30%) e o setor madeireiro (20%). O restante do consumo distribui-se entre os setores de lâminas e chapas multilaminadas, chapas reconstituídas e lenha industrial. Em 2000, os estoques existentes somavam uma oferta aproximada de 852 milhões de m<sup>3</sup> (CARON NETO, 2000) e com a tendência de crescimento observada no consumo espera-se a exaustão da base florestal plantada até 2006 (GARLIPP, 2000).

A média de área plantada por ano estimada até 2006 é três vezes inferior ao necessário para dar cobertura a essa tendência de consumo. Essa situação vem contribuindo para o aumento nos preços de mercado em todas as regiões consumidoras. Uma consequência direta é o aumento da pressão sobre as florestas nativas remanescentes, que ainda atinge níveis alarmantes na proporção do consumo nacional, aproximadamente 56% da demanda anual de 250 milhões de m<sup>3</sup> (HOEFLICH *et al.*, 2000). Desta forma, fica bastante evidente a necessidade de retomada do processo de recuperação de florestas plantadas, seja pela expansão de área, desde que salvaguardadas as áreas de solos ricos destinadas à produção de alimentos e as florestas nativas, seja pela melhoria da produtividade.

Para reverter esse quadro, o governo federal lançou oficialmente, em fevereiro de 2004, o Programa Nacional de Florestas (PNF) para o período 2004-2007, contendo metas ambiciosas para o setor. Estão previstos investimentos de 1,8 bilhões de reais na expansão da base florestal plantada, na recuperação de ecossistemas degradados e no manejo de florestas nativas para produção sustentável. As metas prevêem expandir o reflorestamento em 800 mil ha nas pequenas e médias propriedades rurais e em 1,2 milhões de ha nos programas empresariais, além de agregar 15 milhões de ha de florestas naturais ao manejo sustentável e recuperar 200 mil ha de áreas de preservação permanente para proteção dos ecossistemas de maior diversidade ecológica (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2004). Foram criadas linhas de

crédito para o setor, que serão acompanhadas de assistência técnica, apoio à pesquisa e ao desenvolvimento tecnológico.

Os principais aspectos ecológicos do uso de florestas plantadas estão no rápido crescimento, na capacidade produtiva e na menor pressão sobre florestas nativas. Com as tendências mundiais de valorização ambiental e as cobranças da sociedade por alternativas menos danosas ao ambiente, a atividade florestal e industrial madeireira tenderá a se consolidar. Entretanto, devido às características e à dinâmica de desenvolvimento, as florestas não permitem a realização de alterações estratégicas com resposta a curto prazo, que devido às características biológicas próprias exigem formas específicas de gerenciamento e a necessidade de alto grau de especialização. Neste cenário, a contribuição da área biotecnológica para o desenvolvimento de tecnologias que permitam o aumento da produtividade é de fundamental importância.

### 3.1.1 O eucalipto

O gênero *Eucalyptus* engloba centenas de espécies, originadas quase que exclusivamente da Austrália, sendo uma das essências florestais mais plantadas no mundo (LIMA, 1993). O eucalipto foi introduzido no Brasil em 1868, no Rio Grande do Sul e no Rio de Janeiro. Até o início do século 20, o eucalipto foi plantado como árvore decorativa, pelo seu extraordinário desenvolvimento, como quebra ventos, ou por supostas propriedades sanitárias. A cultura em larga escala foi iniciada no ano de 1903 no estado de São Paulo, na região de Jundiaí, com a finalidade de produzir madeira para lenha.

No final desse ano, em Jundiaí, iniciou-se uma série de estudos experimentais que deram sustentação à implantação do eucalipto em grande escala. Aos poucos, o eucalipto foi sendo adotado como espécie alternativa para o suprimento de madeira (LIMA, 1993), principalmente como combustível nas formas de lenha e carvão, em função da crescente escassez das matas nativas.

Em resposta à grande demanda de madeira para futuros projetos industriais, o governo brasileiro instituiu em 1966 um programa de incentivos fiscais (1966-1988) para aumentar a área plantada (HOEFLICH *et al.*, 2000). Em poucos anos, a área com plantações de eucaliptos saltou de 400 mil para aproximadamente 3,7 milhões de ha em 1986. Criaram-se, nessa época, os cursos de Engenharia Florestal e várias instituições de pesquisa florestal, como o Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal (IBDF), extinto em 1987, que deram suporte ao desenvolvimento da eucaliptocultura. Atualmente, o Brasil possui por volta de 3 milhões de ha em madeira de eucalipto, sendo este o gênero mais plantado no país. Para o caso específico do Brasil, o eucalipto possui um caráter estratégico, uma vez que sua madeira é responsável

pelo abastecimento da maior parte do setor industrial de base florestal (REVISTA DA MADEIRA, 2001).

Basta citar alguns números para se apreciar a importância de sua participação na economia nacional. Da madeira de eucalipto, são produzidas por ano 5,4 milhões de toneladas de celulose, representando mais de 70% da produção nacional. Número também impressionante é o do setor de carvão vegetal, com uma produção anual de 18,8 milhões de metros cúbicos, representando, também, mais de 70% da produção nacional. Outro setor importante é o de chapa de fibra, com uma produção anual de 558 mil metros cúbicos, representando 100% da produção nacional. Finalmente, o setor de chapas de fibra aglomerada que produz 500 mil metros cúbicos, representando quase 30% da produção nacional (REVISTA DA MADEIRA, 2001).

Diferentemente de sua utilização no passado, como lenha para queima, hoje, com o aumento das informações sobre suas propriedades, esta madeira vem a cada dia sendo utilizada para fins mais nobres. As propriedades mecânicas, como a resistência quando solicitada por esforços, são requisitos básicos para a maioria das utilizações da madeira, principalmente para uso estrutural, sendo que o eucalipto atende às mais diversas exigências. A madeira de eucalipto é freqüentemente utilizada numa idade jovem, em geral de oito a dez anos, para fins de produção de celulose, chapa de fibras, painéis de madeira aglomerada, lenha e carvão. Apenas uma proporção muito reduzida das plantações de eucalipto é normalmente manejada para a produção de madeira para serraria, requerendo rotações mais longas, geralmente a partir dos 20 a 25 anos (REVISTA DA MADEIRA, 2003).

Quando se pensa em espécies de rápido crescimento, o *Eucalyptus* se apresenta como gênero potencial dos mais importantes, não somente por sua capacidade produtiva e adaptabilidade a diversos ambientes, mas, principalmente, pela grande diversidade de espécies, tornando possível atender aos requisitos tecnológicos dos mais diferentes segmentos da produção industrial (REVISTA DA MADEIRA, 2001). O potencial do eucalipto como fornecedor de matéria-prima de qualidade para os diversos usos industriais já se encontra demonstrado, estando razoavelmente definidos os parâmetros de qualidade da madeira exigidos para tais aplicações. As perspectivas de utilização intensiva da madeira de eucalipto são muito promissoras e têm por base o conhecimento já acumulado sobre a silvicultura e o manejo de várias espécies do gênero, sua maleabilidade e respostas ao melhoramento genético, que o tornam adequado para usos múltiplos.

Face ao avançado estágio evolutivo da cultura do eucalipto no Brasil e à grande área plantada, aliados a uma maior compreensão dos aspectos tecnológicos envolvidos no processamento e utilização da madeira de eucalipto, pode-se concluir que o eucalipto já é a madeira do presente e será a base da indústria florestal do futuro.

### 3.1.2 O pínus

O gênero *Pinus* possui cerca de 90 espécies, com origem em diversos países do hemisfério norte (JOLY, 1987). Espécies de pínus vêm sendo introduzidas no Brasil há mais de um século para finalidades variadas. Muitas delas foram trazidas pelos imigrantes europeus como curiosidade, para fins ornamentais e para produção de madeira. Por volta de 1936, foram iniciados os primeiros ensaios de introdução de pínus para fins silviculturais, com espécies européias. No entanto, não houve sucesso, em decorrência da má adaptação ao nosso clima e, também, como ocorreu em outros países, problemas relacionados à ausência de certos microrganismos simbiotes que somente existiam nos locais de origem dessas plantas (VOZZO e HACKSKAYLO, 1971). Somente em 1948, através do Serviço Florestal do Estado de São Paulo, foram introduzidas, para estudos, as espécies americanas *Pinus palustris*, *Pinus echinata*, *Pinus elliottii* e *Pinus taeda*. Dentre estas, as duas últimas se destacaram pela facilidade nos tratamentos culturais, rápido crescimento e reprodução intensa no Sul e no Sudeste do Brasil. O tempo de corte é superior ao do eucalipto, ficando a média em torno dos 14 anos.

Desde então, um grande número de espécies continuou sendo introduzido e estabelecido em experimentos no campo por agências do governo e empresas privadas, visando ao estabelecimento de plantios comerciais. *P. taeda* foi o principal destaque nos plantios na região do planalto do Sul e Sudeste (Figura 3.1). Esta é uma espécie de ampla distribuição geográfica no Leste e Sudeste dos Estados Unidos, sendo altamente variável em função de sua distribuição geográfica, principalmente quanto à resistência a geadas e à temperatura requerida para o seu processo de crescimento (SHIMIZU, 2004). Para os locais mais frios, como nas serras gaúchas e no planalto catarinense, as procedências de locais mais frios têm demonstrado maior produtividade.

Várias características de *P. taeda*, que têm reflexo direto no valor econômico da madeira, estão sob controle genético moderado a alto e podem ser melhorados através da seleção de matrizes e cruzamento controlado entre elas. Assim, mediante trabalhos básicos de seleção criteriosa e cruzamentos controlados, conseguiu-se alterar as características das árvores, aumentando o valor das florestas de *P. taeda* (SHIMIZU, 2004).

A madeira de *P. taeda* é utilizada para processamento mecânico na produção de peças serradas para estruturas, confecção de móveis, embalagens, molduras e chapas de diversos tipos. Para esses usos, a qualidade da matéria-prima aumenta à medida que aumenta a densidade da madeira, dentro dos limites normais da espécie. No entanto, na produção de celulose de fibra longa pelos processos mecânicos, a madeira juvenil de baixa densidade é muitas vezes preferida (REVISTA DA MADEIRA, 2003; SHIMIZU, 2004).



Figura 3.1 Produção comercial de mudas de *P. taeda*, no viveiro florestal da MOBASA, Rio Negrinho-SC. (Cortesia: Julia G. Dick, 2004).

*P. elliottii* var. *elliottii* se destacou como espécie viável em plantações comerciais para produção de madeira e resina no Brasil (ROMANELLI E SEBBENN, 2004). A região ecológica ideal para o seu desenvolvimento coincide, em grande parte, com a de *P. taeda*. Porém, por ser de ambiente com características mais próximas ao tropical, perde em crescimento para *P. taeda* nas partes mais frias do planalto sul. Por outro lado, ele pode ser plantado com grande sucesso em ambientes característicos de Cerrado das Regiões Sul e Sudeste, bem como na planície costeira (SHIMIZU, 2004).

A resina extraída de árvores de *P. elliottii* var. *elliottii* possibilitou a criação de uma atividade econômica muito importante no setor florestal através do processamento e exportação de resina. Dados de 2002 indicam que a produção brasileira de resina, de aproximadamente 100 mil toneladas por ano, representa uma movimentação financeira de US\$ 25 milhões. Com isso, o Brasil passou de importador a exportador deste produto. A exploração da resina gera mais de 12 mil empregos diretos no campo, oferecendo uma importante contribuição social que resulta no melhoramento das condições de vida (SHIMIZU, 2004).

Dentre os fatores limitantes do aumento da produtividade das áreas plantadas com pínus, destacam-se a fertilidade do solo e, especialmente a baixa disponibilidade de fósforo. A adubação com fosfatos solúveis é uma prática utilizada para suprir essa carência, mas aumenta muito os custos de produção. Esses adubos precisam ser adicionados em dosagens superiores às necessidades das plantas, pois a maior parte do fósforo aplicado ao solo torna-se rapidamente indisponível por diferentes formas de retenção (NARLOCH, 2002). A biotecnologia, com a utilização de microrganismos promotores de crescimento de plantas, como as bactérias e

fungos solubilizadores de fosfatos (SILVA FILHO *et al.*, 2002) e fungos simbiotes (ROSSI *et al.*, 2002; SOUZA, 2003; SOUZA *et al.*, 2004; OLIVEIRA, 2004), desponta como uma importante alternativa para aumentar a produtividade e lucratividade das florestas plantadas, salvaguardando as espécies nativas e reduzindo a contaminação do solo com insumos químicos.

### 3.2 Promoção do crescimento vegetal

São várias as estratégias utilizadas para promover o crescimento das plantas de interesse comercial para reflorestamento. Todas são relativamente novas, e no Brasil se desenvolveram com a implantação das florestas de eucalipto e pínus. Essas estratégias englobam desde as técnicas de preparo do solo e manejo das florestas, melhoramento das plantas através de cruzamentos entre as espécies, até a utilização da engenharia genética. A tecnologia da cultura de células, protoplastos e tecidos de plantas conquistaram destacada posição na propagação comercial e industrial de plantas, no melhoramento genético, no intercâmbio e conservação de germoplasma e em outras aplicações como as pesquisas em fisiologia vegetal e produção industrial de compostos secundários.

Outra interessante tecnologia que possibilita o desenvolvimento das plantas, mesmo em solos contaminados e degradados, e que permite diminuir a utilização de fertilizantes químicos e pesticidas, trata da exploração da simbiose ectomicorrízica através da inoculação das plantas com fungos capazes de promover o crescimento vegetal.

#### 3.2.1 A simbiose ectomicorrízica

Micorrizas são associações mutualísticas entre raízes e fungos do solo (FRANK, 1885), que promovem uma melhor absorção de água e nutrientes pela planta, enquanto o fungo obtém compostos carbonados provenientes da fotossíntese. Para esse autor, as micorrizas representam um fenômeno de ocorrência generalizada, resultante da união orgânica entre as raízes e o micélio de fungos, seguida pelo crescimento de ambas as partes com dependência fisiológica íntima e recíproca, sendo consideradas o mais inesperado e surpreendente fenômeno da natureza. Algumas dessas associações tiveram papel fundamental na colonização do ambiente terrestre pelas plantas há centenas de milhões de anos (PIROZYNSKI, 1981).

As micorrizas constituem-se num importante fator de crescimento e desenvolvimento das plantas. Sua importância foi demonstrada nas primeiras tentativas de implantação de espécies vegetais fora de seus *habitats* naturais, e na dificuldade em se estabelecerem áreas de

florestamentos em regiões de solos degradados, onde não existiam fungos compatíveis com as espécies introduzidas (VOZZO e HACKSKAYLO, 1971; MIKOLA, 1973).

As pesquisas mostram que a presença de fungos micorrízicos no sistema radicular das plantas aumenta a absorção de água e nutrientes do solo, principalmente dos elementos minerais de baixa mobilidade, como o fósforo (LE TACON *et al.*, 1987; DUDDRIDGE *et al.*, 1991; GLOWA *et al.*, 2003; SAWYER *et al.*, 2003). Esse aumento da capacidade de absorção de nutrientes é devido, sobretudo, ao crescimento do fungo além das raízes, ramificando-se no solo. Assim, as hifas aumentam a área superficial e a massa das raízes (Figura 3.2) com uma maior superfície distribuída, principalmente, para absorção de P da solução do solo. Além disso, outros relatos evidenciam, também, que as micorrizas podem aumentar a condutividade hidráulica, a resistência das plantas à seca e aos patógenos que atacam o sistema radicular e, de maneira geral, aumentar o crescimento e a produção das plantas (MARX e CORDELL, 1990; WILKINS, 1991; SMITH e READ, 1997), e ainda promovem a agregação e estabilidade do solo (TISDALL *et al.*, 1997, BOGEAT-TRIBOULOT *et al.*, 2004). Com isso, contribuem para o estabelecimento e o crescimento das plantas, mesmo em solos de baixa fertilidade ou degradados (MARX *et al.*, 1977).

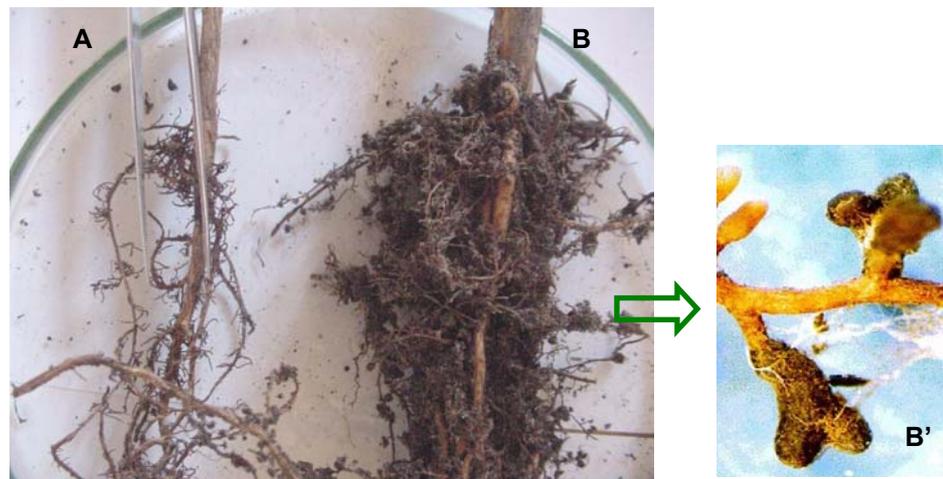


Figura 3.2 Desenvolvimento do sistema radicular de pinus provenientes de uma mesma plantação da Fazenda Cerro Azul em Rio Negrinho - SC: sem micorrizas (A) e com micorrizas (B). Observa-se, também, grande diferença entre os diâmetros do caule. (Cortesia: Julia G. Dick, 2004). No detalhe (B') observam-se as ectomicorrizas (Cortesia: Admir J. Giachini & Vetúria L. Oliveira, LECM/UFSC, 2004).

As ectomicorrizas são formadas em sua maioria por fungos basidiomicetos, sendo caracterizadas pela penetração intercelular da raiz pelo micélio fúngico, formando a rede de Hartig no interior do córtex, e do manto fúngico que se desenvolve ao redor dos segmentos das raízes colonizadas. Além destas características anatômicas, são ainda evidentes as modificações morfológicas nas raízes colonizadas (SMITH e READ, 1997).

Apesar da baixa diversidade de hospedeiros, as ectomicorrizas apresentam alta diversidade de fungos simbiotes, cerca de 6000 espécies (SMITH e READ, 1997). Além disso, a presença de micorrizas é particularmente importante para o crescimento de espécies dos gêneros *Eucalyptus* e *Pinus*. Para as espécies deste último gênero, a associação com fungos ectomicorrízicos é indispensável à sobrevivência e o desenvolvimento das plantas (VOZZO e HACKSKAYLO, 1971). É sabido que a introdução de espécies desse gênero em áreas exóticas só é possível com a introdução concomitante de fungos ectomicorrízicos compatíveis.

### 3.2.2 A compatibilidade fungo-hospedeiro

Embora freqüentes nas florestas e plantações, os fungos ectomicorrízicos (fECM) se diferenciam na sua capacidade de colonizar as raízes e na intensidade dos benefícios conferidos às plantas (MARX e CORDELL, 1989). Essas diferenças determinam a necessidade de estudos que permitam selecionar as melhores combinações fungo-hospedeiro-ambiente, num processo que é denominado "controle da micorrização" (GARBAYE, 1984). Experimentos em viveiros têm demonstrado que a utilização de fungos específicos pode aumentar a sobrevivência e crescimento das mudas (MARX, 1980). Tal especificidade pode ocorrer entre gêneros de fECM e gêneros de plantas, ou até mesmo em nível de espécie ou isolado (OLIVEIRA *et al.*, 1994; SOUZA *et al.*, 2004).

O controle da micorrização pode melhorar significativamente a produtividade das plantações, como tem sido demonstrado nos Estados Unidos e na França. Para que isso se torne amplamente utilizado é necessária a produção de inoculantes em larga escala. Assim, o controle da micorrização tem início com a seleção de isolados fúngicos mais eficientes e culmina com a produção de inoculantes desses isolados mais adequados à espécie cultivada (MARX *et al.*, 1977; GARBAYE, 1990; ROSSI *et al.*, 2002).

### 3.2.3 Seleção de fungos ectomicorrízicos eficientes

A maioria dos estudos sobre micorrizas aborda os efeitos da inoculação das plantas com pouca consideração sobre os fungos associados (BRUNDRETT *et al.*, 1996). No Brasil, as raras tentativas de inoculação de plantas com fungos ectomicorrízicos foram feitas sem estudos prévios de seleção (TOMAZELLO e KRÜGNER, 1982). Só recentemente foram realizados estudos desse tipo com isolados de fECM para utilização na produção de inoculantes para *Eucalyptus dunnii* (SOUZA, 2003; SOUZA *et al.*, 2004) e *Pinus taeda* (OLIVEIRA, 2004). Esses estudos, conduzidos em casa de vegetação, permitiram selecionar isolados dos gêneros

*Pisolithus*, *Scleroderma*, *Amanita*, *Rhizopogon* e *Chondrogaster*, com potencial para promover o crescimento das plantas e para produção em escala comercial.

Os critérios geralmente utilizados na seleção de isolados de fECM são a compatibilidade com a planta hospedeira e a capacidade de promover o crescimento das mudas. Isso envolve a avaliação de parâmetros como altura das plantas, diâmetro do caule, porcentagem de colonização radicular, comprimento radicular colonizado, comprimento total do sistema radicular, matéria seca total e conteúdo de fósforo na parte aérea (SMITH e READ, 1997; SOUZA, 2003). Também são consideradas as questões relacionadas com a adaptação ao substrato ou ao solo, a capacidade de auxiliar a sobrevivência das plantas durante o transplântio, o percentual de colonização das raízes das mudas no viveiro e a propagação no campo (BRUNDRETT *et al.*, 1996). Após o transplântio das mudas do viveiro para o campo foi observado que mesmo mudas micorrizadas podem ter dificuldades em se estabelecer devido à sucessão das populações fúngicas (MIKOLA, 1989), demonstrando a importância de se observar a capacidade de competição do fungo introduzido em relação àqueles já existentes no solo.

Outro critério de grande importância, mas pouco considerado na prática, está relacionado com a capacidade de multiplicação do fungo em grande escala, onde a cinética de crescimento, avaliada em cultivo durante um estudo nutricional, é também fundamental para a etapa de seleção. Um isolado fúngico de fECM com ótima capacidade de promover o crescimento da planta, pode ser inviável para a etapa de produção do inoculante em escala comercial, caso apresente uma velocidade de crescimento muito baixa. Quando comparados aos microrganismos de vida livre, os fungos ectomicorrízicos apresentam baixa velocidade de crescimento (GARBAYE, 1990; ROSSI, 2001; ROSSI *et al.*, 2002; ROSSI *et al.*, 2003; ROSSI, *et al.*, 2005; STREIT *et al.*, 2005a). Esse fator torna-se muito importante na seleção de isolados, pois além dos problemas técnicos na operação dos biorreatores, períodos longos de cultivo, acima de 20 dias, podem comprometer a viabilidade do inoculante, devido à diminuição dos níveis de ATP nas hifas mais velhas (LAPEYRIE e BRUCHET, 1985), além do acúmulo de metabólitos tóxicos.

#### 3.2.4 Inoculantes ectomicorrízicos

A forma do inoculante tem importância fundamental para o sucesso de um programa de inoculação de mudas. O inoculante deve ser adequado para armazenamento e transporte, de modo a conservar a viabilidade dos propágulos fúngicos, garantindo a infectividade mesmo após vários meses de armazenamento. Além disso, deve ser de aplicação fácil e uniforme e ser compatível com a espécie de planta. Outro fator também importante é a qualidade microbiológica, tanto pela ausência de patógenos que comprometem o controle fitossanitário, quanto de microrganismos de vida livre que possam afetar a viabilidade do inoculante.

Finalmente, os custos do inoculante devem ser compatíveis com os da produção de mudas (BRUNDRETT, *et al.*, 1996).

Existem vários tipos de inoculantes ectomicorrízicos, desde os mais simples como o próprio solo procedente de florestas ou de plantações, até os mais sofisticados produzidos em biorreator a partir do micélio fúngico. Dentre os dois extremos, há ainda os inoculantes à base de esporos obtidos de frutificações fúngicas (Figura 3.3) coletadas em plantações anteriores (THEODOROU, 1971).



Figura 3.3 Frutificação de *Scleroderma* sp. coletada em plantio de pinus da Fazenda São Pedro, Rio Negrinho - SC. (Cortesia: Julia G. Dick, 2004).

O inoculante à base de esporos é facilmente produzido, podendo ser utilizado na forma de pó ou "peletizado". Pode-se, também, utilizá-lo na forma de uma suspensão dos esporos que é aplicada posteriormente sobre o substrato de plantas. Entretanto, esse tipo de inoculante somente pode ser obtido de fungos capazes de produzir grande quantidade de esporos e não permite que os fungos sejam testados quanto a sua compatibilidade e eficiência em relação à planta que se deseja cultivar. Além disso, sua obtenção é sazonal, sendo necessária a coleta e a estocagem de grandes quantidades de frutificações, o que compromete a qualidade e limita o número de espécies fúngicas a ser utilizadas (CORDELL *et al.*, 1988).

A produção de inoculante miceliano é aplicável a qualquer fungo que possa ser cultivado em cultura pura, permitindo a utilização de fungos selecionados quanto a sua eficiência na promoção do crescimento da planta hospedeira (MARX, 1980; LAST *et al.*, 1984; ALVES *et al.*, 2001). Culturas puras dos isolados são comumente obtidas a partir de corpos de frutificação e mantidas indefinidamente em laboratório. O micélio dessas culturas pode ser utilizado diretamente em testes *in vitro*, mas para outras aplicações, como em testes de seleção em casa de vegetação e, comercialmente na inoculação de mudas em viveiros, faz-se necessária a multiplicação, em substrato sólido ou em meio de cultura líquido, em várias escalas.

A formação de micorrizas do fungo *Pisolithus tinctorius*, em mudas de *Pinus palustris*, foi muito mais efetiva com o uso de micélio do que com esporos (MARX e CORDELL, 1990). A

inoculação de plantas com inoculante vegetativo produzido em substrato sólido foi realizada em algumas regiões dos Estados Unidos (CASTELLANO e MOLINA, 1989) e da França (SELOSSE *et al.*, 2000).

No Brasil, ainda não existem programas de controle de micorrização e nem inoculantes comercialmente disponíveis. Ocasionalmente, são utilizadas as acículas ou suspensão de esporos como inoculante. Substratos comerciais, em cuja composição há cascas de pinus, que também contêm esporos ou outros propágulos, são mais comumente utilizados. Entretanto, não há nas normas de produção de mudas informações definindo a quantidade de serrapilheira ou de solo de plantios comerciais ou a concentração de esporos para utilização como inoculante.

### 3.2.5 Eficiência da inoculação

A avaliação da eficiência da inoculação em condições controladas de casa de vegetação é uma etapa importante para a seleção de isolados fúngicos com potencial para produção de inoculantes (SOUZA, 2003; OLIVEIRA, 2004). Entretanto, para justificar investimentos para instalação de unidades de produção desses inoculantes e, também, para garantir ao viveirista que o inoculante promoverá aumento de produtividade, são necessários estudos nas condições de viveiros e em condições de campo. Estudos em viveiros, para essências como *Eucalyptus* e *Pinus*, podem ser realizados dentro de um prazo relativamente curto de até seis meses. Entretanto, nas condições de campo são necessários vários anos de acompanhamento e utilização de grande número de plantas em diversas localidades (KUEK, 1994; SELOSSE, *et al.*, 2000), tornando o estudo difícil, caro e de execução complexa, mesmo para centros de pesquisa com boa estrutura.

Com relação a este assunto, Garbaye (1990) avaliou 25 estudos realizados durante mais de uma década em diversos países, incluindo o Brasil. Tais estudos foram realizados em plantações experimentais, onde se comparou o crescimento de plantas inoculadas em viveiros com plantas não inoculadas, naturalmente colonizadas por fungos locais após o transplante. Consideraram-se o clima, o solo, as espécies de plantas e fungos utilizados e avaliaram-se altura (mais avaliado), volume por hectare, volume por tronco, percentual de sobrevivência e matéria seca, em diversos estágios do crescimento. Alguns dos resultados da avaliação indicaram aumento médio, em relação às testemunhas não inoculadas, de 130% na altura, de 40% no volume e 25% na sobrevivência. De modo geral, os aumentos chegaram a 400% em relação às plantas testemunhas não inoculadas.

Os resultados mostram, assim, que a prática do controle da micorrização pode ser considerada como uma alternativa aos métodos tradicionais para o aumento da produtividade das plantações.

### 3.2.6 A diversidade ectomicorrízica no Brasil

As associações ectomicorrízicas são consideradas fatores chave nos ecossistemas florestais e o conhecimento da distribuição e ecologia dos fungos ectomicorrízicos são importantes para monitoramento da diversidade e para a seleção das espécies para uso nos viveiros florestais (TRAPPE, 1977). Embora muitos reconheçam a importância desse conhecimento, tanto para florestas nativas quanto para florestas introduzidas, apenas dois estudos detalhados tinham sido realizados no Brasil até o ano 2000. Nesses estudos foram observadas 38 espécies de fungos ectomicorrízicos em 19 gêneros coletados na floresta Amazônica (SINGER e ARAÚJO, 1979) e 8 espécies em plantações de pínus e eucalipto no estado de São Paulo (YOKOMIZO, 1986). Mais recentemente, um estudo detalhado sobre a diversidade ectomicorrízica foi realizado por Giachini *et al.* (2000) em plantações de pínus e eucalipto em Santa Catarina, demonstrando-se que a riqueza de espécies é maior da que havia sido detectada nos outros levantamentos. Esses autores descreveram 49 espécies de fungos ectomicorrízicos representando 9 ordens e 12 famílias, das quais muitas foram descritas pela primeira vez na América do Sul. Três dessas espécies são espécies novas, *Chondrogaster angustisporus*, *Descomyces giachinii* e *Scleroderma bougheri*. Também foi verificado que os gêneros *Laccaria* e *Scleroderma* foram os que apresentaram maior quantidade de espécies.

Em face dessa grande diversidade, fica evidente que a busca por fungos ectomicorrízicos eficientes para programas de inoculação no Brasil deve partir dos isolados obtidos no país. Seja a partir dos isolados já disponíveis em coleção locais, seja a partir de novos isolados, dando-se prosseguimento aos projetos de levantamento e isolamento desses fungos.

### 3.3 A produção de inoculantes de fECM

A exploração das simbioses micorrízicas para aumento da produtividade vegetal depende do desenvolvimento de métodos de produção de inoculantes em larga escala. A literatura ainda é pobre com relação a muitos dos aspectos da produção de inoculantes de fungos ectomicorrízicos. Muito tem sido estudado sobre as micorrizas, seus mecanismos de ação, benefícios, fisiologia, diversidade, etc. (MARX, 1969; HARLEY, 1978; LE TACON *et al.*, 1983; GARBAYE, 1984; LE TACON *et al.*, 1987; MALAJCZUK *et al.*, 1990; KUEK *et al.*, 1992; BURGESS *et al.*, 1993; GIACHINI *et al.*, 2000; CHEN *et al.*, 2003), mas quando se trata da produção de inoculante miceliano para aplicação na silvicultura, percebe-se a carência de estudos que abordem a fisiologia e a bioquímica do crescimento, a cinética e a transferência de massa. Tal carência tem dificultado a produção de inoculantes em larga escala e a manutenção de sua viabilidade.

Uma técnica de produção de inoculantes vegetativos é representada pelo cultivo em estado sólido (FES), geralmente realizada numa mistura de vermiculita e turfa, adicionada de solução nutritiva, em frascos (MARX *et al.*, 1982) ou sacos plásticos. A principal vantagem dessa técnica é proteção do micélio entre as lâminas das partículas de vermiculita, garantindo sua sobrevivência até o aparecimento das raízes curtas receptivas. A vermiculita apresenta, ainda, a vantagem de ser um material barato e com uma estrutura adequada para a absorção das soluções e para permitir a aeração do substrato. De acordo com Garbaye (1990), se o meio de cultura utilizado não for rico em açúcares, o inoculante não precisa ser submetido à lavagem antes de sua aplicação ao substrato de plantio. Entretanto, como geralmente o cultivo necessita de altos teores de açúcares, sendo eles as únicas fontes de carbono, é difícil dispensar o tratamento de lavagem para remoção dos açúcares residuais. Os nutrientes tendem a se difundir para os poros da vermiculita, dificultando a exaustão dos açúcares e prolongando o tempo de cultivo. Inoculantes contendo açúcares residuais são susceptíveis de contaminação e, conseqüentemente, de perda da viabilidade.

Outras técnicas mais elaboradas de produção de inoculantes consistem no cultivo do fungo em meio líquido em biorreatores (LE TACON *et al.*, 1983), com posterior encapsulamento do micélio em gel de alginato de cálcio (Figura 3.4). Diversos estudos realizados em viveiros demonstraram que este tipo de inoculante é mais eficiente que o inoculante produzido em substrato sólido, provavelmente pela melhor sobrevivência do fungo no substrato de plantio (LE TACON *et al.*, 1985; KUEK *et al.*, 1992). Dependendo do fungo, o micélio encapsulado pode ser armazenado em água a 4 °C durante até 6 meses, com retenção de 95 a 100% de sua viabilidade (MAUPÉRIN *et al.*, 1987; KUEK *et al.*, 1992). Utilizando esta técnica, Oliveira *et al.* (2006) conseguiram manter 100% de viabilidade para um inoculante de *Rhizopogon nigrescens*, armazenado durante mais de 18 meses. Esse inoculante apresentou eficiência significativa ao ser inoculado em mudas de *P. taeda* sob condições de casa de vegetação.

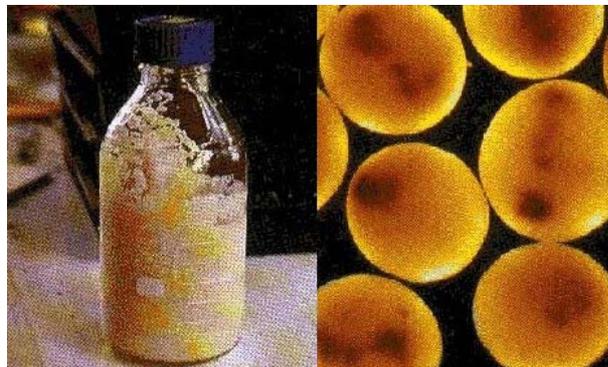


Figura 3.4 Cápsulas de hidrogel contendo o fungo ectomicorrízico *Laccaria laccata*. (Biosynthetica Pty. Ltd., Austrália).

Embora essa técnica pareça promissora, sua utilização está ainda muito limitada, apesar de mais de uma década de estudos. A principal razão para esse atraso reside em dificuldades na multiplicação do fungo por processos de cultivo em meio líquido. A baixa velocidade de crescimento dos fungos ectomicorrízicos, em relação a outros microrganismos (fungos saprofiticos, bactérias e leveduras) permite contaminações freqüentes que inviabilizam a cultura; e as operações de lavagem e imobilização da biomassa apresentam novos riscos de contaminação, além de aumentarem os custos de produção (GARBAYE, 1990).

Os poucos estudos relatados, utilizando biorreatores, não abordaram os aspectos da engenharia do processo. Dessa forma, as questões que limitam o desenvolvimento de tecnologia de produção de inoculantes de fungos ectomicorrízicos em cultivo submerso permanecem sem solução. Rossi *et al.* (2002) apresentam pela primeira vez a cinética de crescimento da produção do inoculante de *Pisolithus microcarpus* em cultivo submerso, apontando a necessidade de estudos de transferência de oxigênio.

A limitação quanto à utilização do cultivo submerso para fungos ectomicorrízicos pode estar relacionada com a falta de aplicação de conhecimentos específicos da área da engenharia química quanto aos fenômenos de transporte envolvidos, além da falta de estudos fisiológicos e bioquímicos do crescimento em meio líquido. Para cultivo submerso existem várias alternativas tecnológicas já desenvolvidas que podem ser testadas e adaptadas para processos como a produção de inoculantes de fungos ectomicorrízicos.

### 3.3.1 A cultura submersa e a cultura no estado sólido

A produção de inoculantes microbianos em cultura submersa e em cultura no estado sólido (FES) foi revisada por Walter e Paau (1993). Várias características tornam o sistema líquido atrativo para a produção de culturas e produtos biológicos. Sistemas líquidos são de fácil mistura, permitindo condições uniformes para o crescimento da cultura. Permitem, também, fácil e rápida modificação de condições de cultivo como pH, oxigênio dissolvido, temperatura, velocidade de agitação e concentração de nutrientes. O alto calor específico e a alta condutividade térmica auxiliam no controle da temperatura. Existem tecnologias eficientes, com alto grau de automação, diversidade e disponibilidade de equipamentos.

Já no processo em estado sólido, a matriz não possui homogeneidade espacial nas partículas, nem nos agregados. Partículas com mais de 3 mm de diâmetro podem apresentar condições anaeróbicas em seu interior e aeróbicas na superfície (GREENWOOD, 1961). Em culturas com alta atividade, pode, facilmente, ocorrer auto limitação pelo excessivo acúmulo de calor e, conseqüentemente, aumento da temperatura (HOGAN *et al.*, 1989). O cultivo no estado sólido também apresenta desvantagem em relação ao processo submerso quando há necessidade de esterilizar o substrato de cultivo. A baixa velocidade de transferência de calor e o

efeito estabilizante da superfície de contato das partículas tornam as células mais resistentes à temperatura (FINSTEIN *et al.*, 1982).

Sistemas de cultivo no estado sólido também são difíceis de estudar devido à dificuldade de obtenção de amostras homogêneas. Variáveis importantes como o pH, pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub> e temperatura são de difícil controle e a atividade microbológica pode mudar rapidamente as condições locais, trazendo dificuldade para construção de modelos de previsão (SMITS *et al.*, 1994). A modelagem de processos de cultivo em estado sólido em escala de laboratório é difícil tanto na teoria quanto na prática. A variação espacial, o difícil controle dos parâmetros de processo e os poucos dados de engenharia tornam o aumento de escala mais complexo do que em sistemas submersos.

Entretanto, segundo Cannel e Moo-Young (1980), a redução de contaminação bacteriana devido à ausência de água livre, o baixo custo das instalações e o fluxograma simplificado são vantagens que o processo FES apresenta quando comparado ao cultivo submerso. O cultivo no estado sólido é particularmente interessante para aplicação com microrganismos nutricionalmente pouco exigentes e que degradam a lignina e a celulose, podendo-se utilizar diversos resíduos agrícolas com pequena correção de nutrientes, ou apenas adição de água (AIDOO *et al.*, 1982).

O cultivo submerso revela-se uma alternativa adequada em relação ao processo no estado sólido para a produção de inoculantes de fungos ectomicorrízicos (ROSSI *et al.*, 2002). O processo pode ser realizado em menor espaço e, também, em período mais curto de tempo, pois no biorreator o contato entre fungo-nutriente-oxigênio é máximo, permitindo uma utilização mais eficiente dos nutrientes até a exaustão dos açúcares. Isso possibilita dispensar a etapa posterior de lavagem da biomassa para remoção de resíduos, como ocorre no processo em estado sólido.

### 3.3.2 Meios e condições de cultivo

A aplicação dos fungos ectomicorrízicos depende de sua capacidade de crescimento rápido em larga escala e em substratos de baixo custo, e da manutenção da viabilidade e infectividade por longos períodos de armazenamento. Neste contexto, estudos relacionados com a fisiologia e a bioquímica do crescimento, as exigências nutricionais e as condições de cultivo, visando melhorar a cinética de crescimento, devem ser feitos. Esses estudos são especialmente importantes para microrganismos de crescimento lento, e devem ser realizados antes de se iniciar o cultivo em biorreator. Para esses microrganismos, o cultivo em biorreator pode se estender por várias semanas, podendo ocorrer o fixação de micélio em certos locais do equipamento, como sensores e aeradores e área de separação de gás, causar entupimento de linhas de alimentação e de descarga. Além disso, pode ocorrer diminuição da conversão do

substrato em biomassa, e ação mais intensa dos metabólitos inibidores sobre o próprio microrganismo.

A condição de simbiote dos fungos ectomicorrízicos no seu habitat natural determina que as substâncias carbonadas sejam obtidas da planta hospedeira (SMITH e READ, 1997). Os fungos ectomicorrízicos necessitam, em geral, de fatores de crescimento e de açúcares simples. Em cultura, muitos isolados podem utilizar de modo satisfatório carboidratos como a celobiose, maltose e sacarose. Entretanto, o carboidrato melhor assimilado é a glicose, e as concentrações mais utilizadas em meios de cultura variam de 5 a 20 g.L<sup>-1</sup>.

O fato de que muitos fungos ectomicorrízicos possam crescer em cultura axênica permite estudar a utilização de diferentes formas de nitrogênio por esses organismos (SMITH e READ, 1997). Muitas espécies utilizam NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ou NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, enquanto que outras utilizam compostos orgânicos simples como os aminoácidos. Contudo, a maioria dos isolados estudados demonstra preferência por NH<sub>4</sub><sup>+</sup> do que por NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, como fonte de nitrogênio (FRANCE e REID, 1984; KELLER, 1996; ANDERSON *et al.* 1999).

A literatura fornece vários exemplos de meios de cultura utilizados para o cultivo de fungos ectomicorrízicos. Lamb (1974) apresenta um meio composto por glicose, NH<sub>4</sub>Cl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Fe-EDTA (Fe-Etileno Diamino Tetra Acético), tiamina e biotina. Já Harvey (1991) cita três meios diferentes: meio Pridham-Gottlieb (PG), contendo glicose, peptona, extrato de levedura e sais; meio Hagem, com glicose, extrato de levedura, tiamina e sais; e o meio Melin-Norkrans Modificado (MNM), composto de sacarose, extrato de malte, tiamina e sais.

Até o presente, o meio MNM (MARX, 1969) tem sido o mais utilizado para cultivo de fungos ectomicorrízicos. Marx e Bryan (1975), Smith (1982), Boyle *et al.* (1987), Oliveira *et al.* (1989), Pradella *et al.* (1991a,b), Willenborg *et al.* (1990), Harvey (1991), Rodrigues *et al.* (1999), Rossi (2001), Sawyer *et al.* (2003), entre outros, utilizaram este meio como base de cultivo para esses fungos. Em todos os estudos citados, a sacarose original foi substituída pela glicose. A exclusão da tiamina (SMITH, 1982) e do extrato de malte (HARVEY, 1991), além da suplementação do meio com extrato de levedura (OLIVEIRA *et al.*, 1989; PRADELLA *et al.*, 1991a,b), foram outras modificações também introduzidas no meio MNM. Chama atenção o fato de que o meio originalmente proposto, MN (NORKRANS, 1949) continha apenas 2,5 g.L<sup>-1</sup> da fonte de C enquanto que as modificações utilizadas até hoje (MNM) contêm mais de 12 g.L<sup>-1</sup>, o que constitui uma relação C:N desbalanceada para o crescimento fúngico.

Tem sido observado que inoculantes de fungos ectomicorrízicos (*P. tinctorius* e *Paxillus involutus*) apresentam maior viabilidade quando obtidos em meio de cultura pobre em nutrientes (com menos proteínas e carboidratos em relação aos meios considerados ricos em nutrientes) e são testados em meio rico (LAPEYRIE e BRUCHET, 1985). Segundo esses autores, isso ocorre, possivelmente, devido ao maior número de enzimas ativadas no inóculo produzido em meio de cultura pobre. Esses autores demonstraram que períodos de cultivo superiores a 20 dias provocam uma diminuição considerável da quantidade de ATP no micélio e, conseqüentemente,

da viabilidade. Uma informação importante desse estudo é que os níveis de ATP estão relacionados com o tempo de cultivo e, também, com a fase de crescimento do fungo, onde a maior quantidade de energia corresponde à maior velocidade de crescimento. Entretanto, esses cultivos foram conduzidos por mais de 40 dias, tendo a máxima viabilidade sido observada quando apenas metade da biomassa havia sido produzida. Isso indica a necessidade de se determinarem condições para que todo o cultivo se complete em menos de 20 dias. Desta forma, seria possível manter altos níveis de ATP nas células até o final do cultivo, garantindo a viabilidade do inoculante.

Muitos fungos ectomicorrízicos apresentam crescimento ótimo na faixa de temperatura de 18 a 25 °C (HARVEY, 1991), podendo, porém, tolerar até 42 °C (HUNG e CHIEN, 1978). Existe, assim, um amplo intervalo de temperatura para cultivo desses fungos, e isso deve estar diretamente relacionado com as condições predominantes em suas diferentes regiões de origem. É importante considerar que temperaturas mais elevadas diminuem a solubilidade do oxigênio no meio de cultivo, e este é um dos principais fatores limitantes do crescimento de fungos filamentosos nessas condições (SCHMIDELL, 2001). Assim, a definição da temperatura de operação para um determinado cultivo em biorreator deve considerar as principais variáveis envolvidas, como a atividade enzimática e a transferência de oxigênio. A temperatura estabelecida num cultivo estático, onde o fungo cresce na superfície do substrato, pode não ser adequada para cultivo submerso aerado, onde o fungo cresce dentro do líquido e pode sofrer limitações de oxigênio em temperaturas mais elevadas.

A preparação dos meios, particularmente a esterilização, pode afetar a disponibilidade de carboidratos para o processo de crescimento. Assim, é aconselhável esterilizar os açúcares separadamente, porque eles podem reagir com íons amônio e aminoácidos, formando compostos que podem inibir parcialmente o crescimento de muitos microrganismos (STANBURY *et al.*, 1995). Gaunt *et al.* (1984) demonstraram que a esterilização em autoclave também pode precipitar íons de ferro, manganês e zinco presentes no meio, mas o problema pode ser resolvido com a adição de pequena quantidade de EDTA, ácido cítrico ou polifosfatos, que servem para manter os metais em solução. Porém, é importante verificar se o quelante não inibe o crescimento do microrganismo em estudo, através da retenção desses elementos ou, por ação tóxica.

O controle do pH é extremamente importante para alcançar níveis ótimos de produtividade. Em geral, os fungos crescem melhor em ambientes ácidos, apresentando atividade ótima na faixa de pH 4 a 6. As atividades metabólicas resultam na produção de catabólitos como os ácidos da degradação dos carboidratos, e os álcalis da quebra de proteínas, provocando variações no pH que podem limitar o crescimento (CAPPUCCINO e SHERMAN, 2002). Desta forma, a utilização balanceada de fontes de carbono e nitrogênio proveniente de proteínas, peptídeos e aminoácidos pode, também, contribuir para controle do pH.

O pH pode ser controlado pela adição de amônia ou hidróxido de cálcio, ou ácido sulfúrico (STANBURY *et al.*, 1995). Se o biorreator não possui um sistema de adição de ácido/base para controle do pH, substâncias podem ser adicionadas ao meio para servir especificamente como tampão, podendo, também, ser utilizadas como nutrientes. Muitos meios são tamponados em pH 7,0 pela incorporação de carbonato de cálcio; se o pH diminui, o carbonato é decomposto. Obviamente, carbonatos que fazem parte de muitos meios também atuam como tampões.

Smith (1982) e Rossi *et al.* (2002) obtiveram ótima produção de biomassa de *Pisolithus* spp. em meios tamponados com ácido cítrico e citrato de cálcio, até pH 5,4, antes da esterilização. Outro sistema tampão freqüentemente utilizado em meios de cultura é aquele formado por  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , um sal de uma base fraca, e  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , um sal de ácido fraco. Num meio que se torna ácido durante um cultivo, o  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  absorve o excesso de  $\text{H}^+$  para formar um sal de ácido fraco mais um sal de potássio. O meio PG utilizado por Litchfield e Arthur (1983) é autotampicante, devido à presença dos nutrientes  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ , além das proteínas da peptona e do extrato de levedura. Por outro lado, altas concentrações de componentes fosfatados no meio de cultivo podem criar dificuldades posteriores na adaptação do fungo aos baixos níveis de fósforo normalmente presentes no solo, como sugerido por Kuek (1996).

É importante considerar as variações de pH em todo o processo de produção do inoculante, desde a preparação do inóculo, até a veiculação posterior ao cultivo e no armazenamento e aplicação. Deve-se manter o pH o mais estável possível durante todo o processo, evitando que variações bruscas de uma etapa para outra prejudiquem a viabilidade do inoculante.

### 3.3.3 A veiculação

A inserção da biomassa fúngica num veículo, ou envoltório protetor, é especialmente importante para o inoculante produzido em cultivo submerso. Ao contrário do inoculante em substrato sólido, onde as hifas ficam protegidas nas lâminas das partículas de vermiculita, a biomassa obtida em cultivo submerso é pura e concentrada, sendo necessária sua veiculação para proteção física e manutenção da umidade, além de permitir melhor rendimento e distribuição, facilidade de armazenamento e transporte.

Polímeros como alginato, poliacrilamida e carragenas têm sido utilizados para imobilizar enzimas, bactérias, fungos, células de plantas e de animais, representando uma forma flexível (em relação à concentração dos reagentes, temperatura de trabalho, tamanho das cápsulas e concentração de células, entre outros parâmetros) de imobilização (CHIBATA *et al.*, 1986). O desenvolvimento da encapsulação de células vivas em gel de alginato (KIERSTAN e BUCKE, 1977; VELIKI e WILLIAMS, 1981) possibilitou a produção de um novo tipo de inoculante.

Da mesma maneira como utilizado para outros microrganismos (BRODELIUS *et al.*, 1979; OSÉE MUYIMA e CLOETE, 1995), o micélio de fungos ectomicorrízicos cultivados em meio líquido pode ser inserido em cápsulas de gel de alginato de cálcio. Esta técnica consiste da mistura de uma suspensão miceliana com uma solução de alginato de sódio, seguindo-se o gotejamento numa solução concentrada de cloreto de cálcio. A troca iônica do sódio pelo cálcio resulta em esferas solidificadas de gel de alginato de cálcio. O tamanho das esferas pode ser facilmente controlado pelo dispositivo de gotejamento. O sistema oferece grande flexibilidade, como a adição de cargas para melhorar a estabilidade e conservação (MAUPERIN *et al.*, 1987), podendo agir como adsorventes de substâncias tóxicas e de íons que possam alterar o pH, além da adição controlada de nutrientes e estimuladores ou inibidores de crescimento. A matriz porosa do gel permite o crescimento dos microrganismos tanto dentro das esferas quanto em direção ao exterior destas (KUEK *et al.*, 1992; OSÉE MUYIMA e CLOETE, 1995).

As cápsulas, conservadas sob refrigeração, podem manter a viabilidade dos microrganismos durante vários meses de armazenamento. Nas aplicações com fungos ectomicorrízicos os estudos mostram diferenças de viabilidade em relação ao tempo de armazenamento, entre diferentes espécies fúngicas. Kuek *et al.* (1992) observaram perdas de 60% da viabilidade em 30 dias em cápsulas do inoculante de *Elaphomyces* sp., enquanto que para o inoculante de *Hebeloma westraliensi* e *Laccaria laccata* observaram alta viabilidade (acima de 80%) após 7 meses de armazenamento. Outros estudos de conservação de inoculantes de fECM em gel relatam viabilidade superior a 90% após 5 meses de armazenamento para *Hebeloma crustuliniforme* (MAUPERIN *et al.*, 1987), após 2 meses para *Paxillus involutus* (RODRIGUES *et al.*, 1999), e mas de 18 meses para *Rhizopogon nigrescens* (OLIVEIRA *et al.*, 2004). As discussões envolvem, além das diferentes espécies e isolados, a idade, a forma e o grau de fragmentação do micélio, a temperatura de armazenamento, o teor de umidade nas cápsulas e as cargas adicionadas.

Testes com plantas realizados em viveiros demonstraram que o inoculante encapsulado em gel de alginato de cálcio promoveu um melhor crescimento das mudas em relação ao inoculante produzido em substrato sólido pelo método tradicional clássico (LE TACON *et al.*, 1985), confirmando as observações de outros estudos, com relação à maior proteção do micélio conferida pelo gel de alginato.

### 3.4 Biorreatores

Com o atual desenvolvimento da biotecnologia, os produtos oriundos da biotransformação como enzimas, corantes, hormônios, antibióticos e anticorpos são agora comuns. Outra área em crescimento está relacionada com a aplicação das técnicas de cultura de células e tecidos vegetais, visando a produção de "mudas" (micropropagação) em larga escala.

Ao mesmo tempo, modernos biorreatores têm sido construídos para as mais diversas necessidades de produção (Figura 3.5), com sistemas de controle para todas as variáveis de processo e com uma imensa gama de acessórios (Figura 3.6), projetados para operação em condições assépticas, com sistemas de auto-limpeza e de esterilização local. Embora com todos esses avanços, a utilização comercial do potencial da biotecnologia moderna para muitas aplicações permanece limitada. O conhecimento insuficiente da engenharia de bioprocessos é um dos vários limitantes do sucesso de projetos e do aumento de escala das pesquisas em laboratório.



Figura 3.5 Biorreator de tanque agitado piloto, equipado com sistemas de controle para as diversas variáveis de processo (Fonte: Bioengineering AG).



Figura 3.6 Acessórios utilizados na construção de um biorreator: controladores, sistemas de amostragem, válvulas, sistema de limpeza automático, etc. (Fonte: Bioengineering AG).

O projeto e o desenvolvimento de bioprocessos obedecem a uma seqüência cujo centro é representado por um biorreator, seguido pelo desenvolvimento dos sistemas de separação e purificação dos produtos. Sistemas de troca de calor, utilitários e o sistema de controle

completam o processo. O projeto do biorreator, por sua vez, envolve vários aspectos, como a cinética das reações, os fenômenos de transporte, as formas de operação, além das questões da estrutura física (CHISTI, 1989).

Muitos tipos de biorreatores são empregados em processos biotecnológicos. Tradicionalmente, o tipo mais utilizado é o de tanque agitado (STR) (Figura 3.5). A primeira aplicação data dos anos 40, quando foi utilizado durante a II Guerra Mundial no cultivo aeróbio para produção do antibiótico penicilina (BAILEY, 1980), sendo utilizado para produção de inoculante de fungos ectomicorrízicos pela primeira vez na França em 1983 (LE TACON *et al.*, 1983). Presentemente, cerca de 90% dos biorreatores aeróbios utilizados na indústria são de tanque agitado tradicional. Os 10% restantes são representados pelos biorreatores pneumáticos, sem agitação mecânica como os *airlifts* e os colunas de bolhas (KOSSEN, 1984).

Embora muito utilizados, os biorreatores de tanque agitado não são os mais adequados para cultivo de microrganismos (ROYSE, 1987), sobretudo porque o grau de agitação requerido para atingir a transferência de massa adequada, em muitos casos, causa danos aos microrganismos devido às zonas de alto cisalhamento das pás do agitador. Além disso, a energia mecânica necessária para manter a mistura e a transferência de massa é muito alta, e ao se dissipar no fluido como calor precisa ser removido para manter o controle de temperatura. Outra consideração muito importante é que a maioria dos bioprocessos exige que o cultivo se mantenha asséptico por longos períodos, necessitando que os biorreatores de tanque agitado sejam equipados com selos mecânicos complexos. Assim, os biorreatores convencionais são mais caros e menos robustos que vários outros tipos de biorreatores. Essas desvantagens têm conduzido a estudos visando desenvolver outros tipos de biorreatores, como é o caso dos biorreatores de colunas de bolhas (SCHÜGERL *et al.*, 1977) e os *airlift* (BLENKE, 1979; CHISTI e MOO-YOUNG, 1987).

#### 3.4.1 Biorreatores *airlift*

Biorreatores *airlift* possuem o volume de líquido dividido em duas zonas distintas, onde somente uma recebe a injeção de ar. A diferença de gás *holdup* entre a zona aerada e a zona não aerada resulta numa diferença de densidade do líquido entre essas regiões, causando a circulação do fluido no biorreator por uma ação *air-lift* (CHISTI, 1989). A parte do biorreator que contém a mistura gás-líquido em fluxo ascendente é denominada de riser, e a região que contém o líquido em fluxo descendente é o *downcomer*. A Figura 3.7 mostra um biorreator *airlift* de bancada equipado com os sistemas de operação e controle do processo.

Uma grande variedade de configurações de biorreatores *airlift* tem sido estudada. Existem duas classes básicas: os de circulação interna e os de circulação externa, podendo ser

subdivididos dentro dessas classes em função de seus detalhes (Figura 3.8). Os biorreatores de circulação externa apresentam menor variedade de configuração, mas permitem mais adequações com relação aos desenhos das conexões horizontais entre o *riser* e o *downcomer*, particularmente na conexão do topo. Modificações adicionais podem ser introduzidas no topo do biorreator, onde a eficiência do separador de gás pode influenciar significativamente o desempenho do biorreator (SIEGEL *et al.*, 1986). Além disso, a possibilidade de ter-se um escoamento horizontal no biorreator de circulação externa permite uma melhor separação do gás, com influência no comportamento geral do biorreator (BELLO *et al.*, 1985).



Figura 3.7 Biorreator *airlift* com circulação interna fabricado pela Bioengineering (Cortesia: Daniela M. Soares - Micronal S.A., 2003).

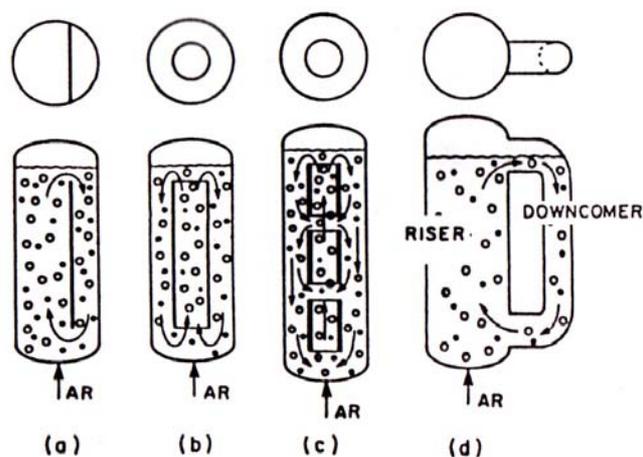


Figura 3.8 Tipos de biorreatores *airlift*: Circulação interna, com cilindro dividido (a), com tubo concêntrico (b) e com tubo concêntrico dividido (c); Circulação externa (d).

Apesar de haver grande volume de literatura disponível sobre biorreatores *airlift*, muitos estudos não têm obtido sucesso na aplicação de equipamentos similares, devido, freqüentemente, à especificidade dos sistemas de cada projeto, e ao alto grau de empirismo e suposições adotados. Chisti (1989) observa que no passado, os estudos foram conduzidos tipicamente utilizando fluidos simples como a água, e raramente em meios de cultivos, onde ocorrem alterações nas propriedades do fluido, com implicações no desempenho do biorreator.

#### 3.4.1.1 Hidrodinâmica gás-líquido

Os parâmetros hidrodinâmicos de interesse nos estudos e projetos de biorreatores *airlift* são o gás *holdup*, a velocidade de circulação de líquido e os coeficientes de dispersão da fase líquida em várias regiões do biorreator.

O gás *holdup* refere-se à fração de gás na dispersão gás-líquido. Esse parâmetro, em combinação com o tamanho das bolhas, determina o tempo de residência do gás no líquido, influenciando a área interfacial disponível para transferência de oxigênio (CHISTI, 1989). O processo de coalescência das bolhas, resultante do aumento da freqüência de colisão, tende a limitar o *holdup* em valores baixos, sendo da ordem de 0,3 os valores máximos utilizados em biorreatores. Freqüentemente, se um valor elevado de *holdup* é alcançado, o que é possível com a redução do tamanho de bolha, ele poderá ser inadequado em certo ponto, principalmente quando se trata de fluidos viscosos. Isto ocorre porque um gás com bolhas muito finas pode ter um tempo de residência muito longo e entrar em equilíbrio com o líquido e, dessa forma, contribuir muito pouco para a transferência de oxigênio (HEIJNEN e VAN'T RIET, 1980; KAWASE e MOO-YOUNG, 1987), atuando, em parte, como um volume morto. O gás *holdup* tem influencia, também, sobre o projeto do biorreator porque o volume total planejado deve considerar o *holdup* máximo que se pretende acomodar.

A circulação de líquido num biorreator *airlift* resulta da diferença de densidade do líquido entre o *riser* e o *downcomer*, como visto anteriormente. A diferença de gás *holdup* entre essas regiões afeta a velocidade de circulação do líquido que, por sua vez, afeta esses *holdups* ( $\epsilon_r$  e  $\epsilon_d$ ) pelo aumento ou diminuição da velocidade de subida das bolhas (PEDRINI, 1997). Além disso, a circulação afeta a turbulência, os coeficientes de transferência de calor, a transferência de massa gás-líquido, e as forças de cisalhamento às quais os microrganismos estão expostos (CHISTI e MOO-YOUNG, 1988).

As características de mistura das fases gasosa e líquida, além da sólida (microrganismos), têm uma forte influência na performance do biorreator. Se, por um lado, a mistura é afetada pela turbulência, por outro, ela afeta os gradientes para transferência de calor e massa. A mistura deve proporcionar uma rápida dispersão dos pulsos de ácido/base injetados no biorreator para controle do pH, para prevenir regiões com altas concentrações por longos

períodos que poderiam causar danos ao metabolismo. Além disso, com relação ao oxigênio, deve fornecer condições homogêneas de transferência e evitar zonas mortas onde possa ocorrer anoxia. Da mesma forma, é necessária a rápida mistura dos fluidos adjacentes aos trocadores de calor (CHISTI, 1989).

Uma restrição para a mistura e transferência de massa em sistemas biológicos é imposta pelo nível de cisalhamento que pode ser tolerado. Zonas do biorreator com excessivas forças de cisalhamento podem causar danos físicos a microrganismos filamentosos (KOSSEN e METZ, 1976; WASE *et al.*, 1985). Essas restrições estão se tornando cada vez mais importantes devido aos avanços biotecnológicos e ao aumento das indústrias que utilizam culturas de células animais e microrganismos geneticamente modificados, que geralmente são mecanicamente menos resistentes. Assim, é cada vez maior a necessidade de novos projetos de biorreatores e de regimes de operação.

O grau de cisalhamento também pode afetar a morfologia de crescimento. O nível dessas forças pode determinar se um fungo crescerá na forma de micélio livre ou na forma de *pellets*. Os efeitos físicos da agitação podem remover fragmentos de hifas da superfície dos *pellets* e, também, provocar sua ruptura (TAGUCHI *et al.*, 1968). O crescimento “peletizado” pode impor limitações adicionais na transferência de oxigênio para o interior dos aglomerados de hifas (ROSSI *et al.*, 2002).

Os biofluidos ocorrem na forma de fluidos Newtonianos, como a água, o mel e muitas culturas de bactérias e leveduras, e na forma de fluidos não-Newtonianos, como em culturas com produção de polissacarídeos e em cultivos de muitos fungos. Na prática, para a maioria dos casos, os modelos de Bingham e Ostwald-de Waele (ou lei da potência) são satisfatórios para estimar a viscosidade. Modelos mais complexos para descrever um fluido particular são mais utilizados experimentalmente (CHISTI, 1989).

#### 3.4.1.2 Transferência de massa gás-líquido

Em cultivos aeróbios, o oxigênio é o menos solúvel de todos os nutrientes, sendo, freqüentemente, o fator limitante. A concentração de oxigênio dissolvido mínima necessária, abaixo da qual ocorre limitação do crescimento (denominada de crítica), para o cultivo de microrganismos é de 0,1 a 1,6 mg.L<sup>-1</sup> (BAILEY e OLLIS, 1977). A solubilidade do oxigênio em meios de cultivo em equilíbrio com a pressão atmosférica é inferior a 8 mg.L<sup>-1</sup> a 25 °C, e a demanda máxima em cultivos microbiológicos está na faixa de 0,18 a 2,7 mgO<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup> (FINN, 1967). Isso demonstra que uma população ativa de microrganismos, crescendo em sistema fechado, pode consumir todo o oxigênio de um meio originalmente saturado pelo ar em 3 a 40 segundos. Esta alta velocidade de consumo de oxigênio deve ser igualada por uma velocidade de suprimento se o objetivo é manter a produtividade constante. Freqüentemente, uma

interrupção momentânea no fornecimento de oxigênio pode levar a uma condição anóxica e resultar em alterações metabólicas ou mesmo a morte das células.

A natureza física dos biofluidos pode complicar a transferência de oxigênio e o fenômeno de mistura. Muitos microrganismos, como bactérias, leveduras e fungos, secretam vários polímeros que podem aumentar a viscosidade do meio de cultivo, levando-o a adquirir propriedades de fluido não-Newtoniano. No entanto, no caso de fungos, as propriedades reológicas são devidas principalmente à morfologia peculiar. Esses organismos formam micélio, com hifas de 50 a 500  $\mu\text{m}$  de comprimento e 10-20  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Sob certas condições, as hifas se enovelam para formar *pellets* que podem alcançar vários milímetros de diâmetro (METZ *et al.*, 1979, ROSSI *et al.*, 2002). A morfologia da superfície dos *pellets* também influencia as propriedades reológicas, através das interações entre as hifas superficiais. O crescimento dos microrganismos na forma de *pellets* pode ser uma forma de se evitar as variações na densidade dos meios durante o cultivo (PROSSER e TOUGH, 1991).

Para o oxigênio da fase gasosa alcançar as células suspensas em uma dispersão gás-líquido, deve percorrer um certo caminho onde podem existir até oito tipos de resistência ao transporte (MOO-YOUNG e BLANCH, 1981; SCHMIDELL, 2001). Entretanto, nem todo tipo de resistência tem importância significativa. Os níveis de turbulência que levam à predominância do transporte convectivo, o tamanho diminuto das células que proporcionam grande área de troca e, a grande velocidade das reações bioquímicas que promovem o transporte de oxigênio através da membrana, estão entre os fatores que simplificam a abordagem e permitem eliminar todas as resistências ao transporte, com exceção daquela que envolve a interface gás-líquido.

Assim, o problema da modelagem do transporte de oxigênio se reduz à transferência de massa na interface gás-líquido, onde um dos modelos mais utilizados considera a existência de duas películas estagnadas (WHITMAN, 1923). Entretanto, o cálculo do coeficiente de transferência de oxigênio ( $k_L$ ) em condições reais é praticamente impossível, porque as condições na película (espessura, velocidade de renovação, tempo de exposição) não podem ser quantificadas. Por causa disso, considera-se a área interfacial das bolhas por unidade de volume de líquido, e a questão é abordada através do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_L a$ ). Na prática, prever e melhorar a transferência de oxigênio em um biorreator é equivalente a prever e melhorar o  $k_L a$ .

O projeto (tipo e geometria do biorreator), o sistema (propriedades do fluido) e a operação (velocidade do gás e do líquido) devem ser estudadas de forma a otimizar o  $k_L a$ , com uma necessidade mínima de energia. Entretanto, a otimização do  $k_L a$  não é a única maneira de se melhorar a performance de um biorreator. Para um  $k_L a$  fixo, pode-se aumentar a diferença de concentração de oxigênio no líquido em relação à saturação ( $C_s - C$ ). Isso pode ser realizado aumentando-se  $C_s$  através do aumento da fração molar de oxigênio na fase gasosa, ou pelo aumento da pressão total (reduzindo o volume molar na fase gasosa) (CHISTI, 1989, SCHMIDELL, 2001). Ambas as possibilidades são, porém, de difícil prática. Primeiramente,

devido aos custos do gás, pois apenas uma pequena fração do oxigênio do gás é transferida para o líquido (menos que 0,01%). No segundo caso, porque o aumento da pressão, além de aumentar os custos de capital e de operação do biorreator, aumenta a solubilidade do dióxido de carbono produzido durante o cultivo, podendo gerar condições tóxicas ao microrganismo (HO e SHANAHAN, 1986).

As técnicas para determinação do  $k_La$  envolvem remoção do oxigênio do líquido (utilizando nitrogênio, gás carbônico, sulfito ou hidrazina) seguindo-se da retomada da aeração e do monitoramento do aumento na concentração do oxigênio dissolvido ( $C$ ) com um eletrodo polarográfico. Este método é denominado de método dinâmico. A equação resultante do balanço de massa para o oxigênio na fase líquida permite a determinação do  $k_La$  através dos dados experimentais (CHISTI, 1989; SCHMIDELL, 2001). Nessas técnicas transientes, a dinâmica do próprio eletrodo de oxigênio pode influenciar o  $k_La$ , devendo-se desprezar os dados de  $C$  obtidos antes de 20 s, tempo necessário para o desenvolvimento completo da hidrodinâmica, e considerar o tempo de atraso na resposta do eletrodo quando for superior a 10 s. Foi demonstrado que o erro máximo no valor de  $k_La$  é inferior a 6% contanto que o tempo de resposta do eletrodo seja menor ou igual a  $(k_La)^{-1}$ .

#### 3.4.1.3 Vantagens e aplicações de biorreatores *airlift*

Biorreatores *airlift* podem ser utilizados em qualquer processo de contato gás-líquido. A aplicação prática depende da capacidade de se alcançar a velocidade de transferência de momento, calor e massa, com um capital de investimento e custos operacionais economicamente viáveis.

Uma das grandes vantagens do biorreator *airlift* é a simplicidade do projeto e da construção (MORESI, 1981), possibilitando uma manutenção fácil e barata. A ausência de partes mecânicas móveis para a agitação reduz o perigo de contaminação, pois facilita a limpeza e a esterilização. A injeção do gás serve para agitar e aerar, eliminando o gasto de energia e promovendo um aumento na capacidade de transferência de massa e calor (SIEGEL e ROBINSON, 1992), tornando-se atrativo para utilização em processos aeróbios.

Uma outra vantagem dos *airlifts* sobre os demais biorreatores, em processos biológicos, está relacionada ao fato de a força de cisalhamento, devida à turbulência, sobre as células ou *pellets* suspensos no meio, ser muito menor. O campo de cisalhamento também é mais homogêneo, sendo relativamente constante ao longo do biorreator, apresentando padrões de escoamento melhor definidos (MERCHUK, 1986). Mesmo com sobreposição de movimentos ao acaso, há total direcionalidade do escoamento do líquido (SIEGEL e ROBINSON, 1992). Um fluxo menos turbulento parece ter um efeito positivo na produção de células sensíveis ao

cisalhamento. Já foi demonstrado experimentalmente, que mesmo em meios altamente viscosos, o uso de biorreatores *airlift* pode ser vantajoso (KESSLER *et al.*, 1993).

Fracos campos de cisalhamento, boa capacidade de mistura e operação asséptica por longos períodos, tornados possíveis graças à eliminação dos agitadores, selos e conexões, são vantagens importantes dos biorreatores *airlift* em diversas aplicações. Produção contínua de cerveja, vinagre, ácido cítrico e biomassa de levedura, bactérias e fungos, tem sido conduzida em *airlifts* com diferentes capacidades de trabalho (MORESI, 1981).

Apesar das vantagens apresentadas, a aplicação dos biorreatores *airlift* em escala de produção industrial ainda é limitada. Os *airlifts* são menos flexíveis para as mudanças de processo que os STR, uma vez que os parâmetros geométricos são determinados para um determinado processo já durante o projeto; a velocidade do fluxo de gás é, em princípio, o único parâmetro que pode ser ajustado durante a operação. Portanto, os *airlift* são menos adaptáveis a outros processos com necessidade muito diferente de mistura e agitação, distribuição de gás e características de transferência de massa, em relação aos STR, que apresentam controles independentes de aeração e agitação (CHISTI, 1989).

Fröhlich *et al.* (1991), Wu e Wu (1991) e Pollard *et al.* (1996) estudaram o cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* em biorreatores *airlift*, testando diversas configurações físicas, conseguindo melhorar o desempenho desses equipamentos. Bonnarme *et al.* (1993) utilizaram com sucesso um biorreator *airlift* para produção das enzimas lignina e manganês peroxidases, e de proteína extracelular do fungo *Phanerochaete chrysosporium*. Su e He (1997) verificaram que um biorreator *airlift* com circulação externa foi eficiente na produção de fosfatase ácida por *Neurospora crassa*. Aleksieva e Peeva (2000) obtiveram em biorreator *airlift* desempenho similar a um biorreator STR, com relação à produção de proteinase ácida pelo fungo *Humicola lutea*. Jin *et al.* (2001) caracterizaram e melhoraram a transferência de oxigênio num biorreator *airlift* com circulação externa para produção de biomassa de *Rhizopus oligosporus*, acrescentando um segundo dispersor de ar na base do *downcomer*. Fu *et al.* (2003), utilizaram um biorreator *airlift* com circulação interna em cultivos para produção de bioinseticida, ácido glutâmico e biomassa de leveduras, celulose bacteriana e pigmentos, todos com exigência elevada de oxigênio. Finalmente, Rossi *et al.* (2004) utilizaram pela primeira vez um biorreator *airlift* para produção de biomassa de *Agaricus brasiliensis*, para utilização como inoculante, ou *spawn*, na produção de cogumelos comestíveis, onde foi possível reduzir para uma semana o tempo de cultivo que, no processo FES convencional, era de 8 semanas.

Outros autores verificaram o potencial de biorreatores *airlift* para o tratamento de vários resíduos. Tyagi *et al.* (1990) utilizaram um *airlift* com circulação externa para estudar a digestão aeróbica de efluentes urbanos. Hüppe *et al.* (1990) utilizaram uma planta piloto de dois estágios para o tratamento biológico de efluentes de refinaria de carvão.

A aplicação dos biorreatores *airlift*, para inúmeros bioprocessos, foi revista por Onken e Weiland (1980), Smart e Fowler (1984), e Siegel *et al.* (1986). Entretanto, na área de inoculantes

de fungos micorrízicos, a aplicação tem sido muito restrita. Jolicoeur *et al.* (1999) utilizaram pela primeira vez, em escala de bancada, um biorreator *airlift* com circulação interna para produzir propágulos de fungos endomicorrízicos, propondo uma segunda geração de bioprocessos para este fim. Recentemente, foram relatadas aplicações de biorreatores *airlift* para produção de inoculantes de fungos ectomicorrízicos (ROSSI *et al.*, 2002; ROSSI *et al.*, 2003, ROSSI *et al.*, 2005). Os resultados indicam o potencial que essa tecnologia representa para a área de inoculantes micorrízicos, até o presente, com dificuldade para se desenvolver e oferecer produtos ao mercado.

#### 3.4.2 Operação de biorreatores em cultivo de fungos ectomicorrízicos

Como já mencionado, são raros os estudos publicados sobre o cultivo submerso para produção de biomassa de fungos ectomicorrízicos utilizando biorreatores. Adicionalmente, nenhum estudo foi relatado sobre outros processos como a batelada alimentada, ou alguma forma de sistema contínuo no cultivo desses fungos. Apesar da carência de estudos, é fácil concluir que seria extremamente difícil operar um sistema contínuo para o cultivo desses fungos. Além dos problemas clássicos, relacionados com o investimento inicial e a possibilidade de seleção de mutantes menos eficientes, com relação ao desempenho em cultivo, têm-se ainda os problemas de contaminação, a dificuldade de se atingir o estado estacionário, devido à baixa velocidade de crescimento, e o pequeno volume dos biorreatores. Outro problema, possivelmente um dos maiores, é o crescimento de micélio preso nas paredes do biorreator e linhas de alimentação e de saída de produtos (FACCIOTTI, 2001). Este último pode ser observado quando o tempo de cultivo se prolonga além de 14 dias e, muitas vezes, representa um problema mesmo em cultivo descontínuo (PRADELLA *et al.*, 1991a).

Os pontos onde a biomassa se prende ao biorreator *airlift* encontram-se no distribuidor de ar, nos poros ou rebarbas de solda, locais onde ocorre aprisionamento de bolhas de ar, visores, sensores, separador de gás, locais onde a velocidade de fluxo é diminuída (nas conexões), e na base do separador de gás, onde a ausência de bolhas torna o escoamento mais laminar. Em biorreatores *airlift* com circulação interna, este problema seria, possivelmente, agravado por obstáculos ao fluxo, como os suportes que mantêm o *riser* na sua posição, ou pelos furos do tubo concêntrico, quando este modelo de *riser* é utilizado com o objetivo de aumentar a transferência de massa (FU *et al.*, 2003) ou, ainda, quando algum dispositivo é inserido no *riser* com este mesmo objetivo (MENG *et al.*, 2002; NIKAKHTARI *et al.*, 2005).

Pradella *et al.* (1991a) utilizaram biorreatores de tanque agitado, operando em modo batelada repetida, para produção de inoculante de *P. tinctorius*, realizando quatro ciclos durante 75 dias, sem interrupção. Esses autores conseguiram um aumento de 50% na produtividade do segundo e terceiro ciclo em relação ao primeiro e ao quarto ciclo. Mesmo assim, a produtividade

foi muito baixa ( $0,15 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ) se comparada com a obtida para *P. microcarpus* num biorreator *airlift* operado em batelada simples ( $0,48 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ) (ROSSI *et al.*, 2002).

Apesar dos problemas apontados, seria importante testar para cultivos de fungos ectomicorrízicos um sistema operando de forma descontínua alimentada. Poderia ser utilizado para minimizar os efeitos de controle do metabolismo, na prevenção da inibição por substrato ou precursores, minimizar a formação de produtos tóxicos de metabolismo, e nos estudos cinéticos, onde as velocidades máximas poderiam ser encontradas nessas circunstâncias (PIRT, 1975). Entretanto, para biorreatores *airlift*, a batelada alimentada também seria de difícil aplicação, pois quase que o total do volume deve ser preenchido ainda no início do cultivo para criar as condições de circulação do líquido. Se o volume alimentado for pequeno, suficiente para que possa variar apenas no topo do biorreator (permitindo a circulação), como a alimentação de precursores ou inibidores, ou nutrientes concentrados, seria possível esse tipo de operação também num biorreator *airlift*.

O sistema de operação em batelada alimentada, somado à utilização de meios de cultura diluídos, pode ser uma alternativa para obtenção de maior produtividade (e viabilidade do micélio) em cultivo de fungos ectomicorrízicos, principalmente daqueles sensíveis aos produtos de seu próprio metabolismo.

### 3.5 O potencial do mercado de inoculantes ectomicorrízicos no Brasil

A estimativa da necessidade de plantio anual para 2005/2006, considerando os segmentos celulose e papel, carvão e lenha e madeira sólida, é de 672.500 ha (CARON NETO, 2000). Assumindo um plantio com espaçamento médio de 2,5 m por 2,5 m, tem-se 1600 plantas por hectare, perfazendo um total de 1,13 bilhões de mudas por ano entre eucalipto e pínus, admitindo-se 5% de perdas por motivos diversos. Para um plano nacional de inoculação micorrízica, utilizando uma dosagem de inoculante de 8 a 10 g de biomassa fúngica por  $\text{m}^3$  de substrato de plantio, três vezes superior à dose recomendada por Garbaye (1990), e um rendimento de 14 mil mudas a partir deste substrato, chega-se a uma necessidade média de 726 Kg de biomassa fúngica por ano.

Com a utilização de biorreatores *airlift*, com capacidade entre 50 e 100 L, com altura variando de 2,5 a 4,0 m, e dois cultivos mensais, seriam necessários cerca de 110 biorreatores em operação, além de pelo menos uns 40 biorreatores menores para produção do inóculo. Se fossem comercializadas doses de inoculante para 200 L de substrato (suficiente para inocular mudas para 2 ha), o volume da dose seria de 1 L, sendo necessárias 580 mil doses para atender à demanda de um programa dessa dimensão.

Uma muda micorrizada, com selo de certificação, poderia valer atualmente 20 centavos, sendo de aproximadamente 2 centavos o custo do inoculante para o produtor. Uma avaliação preliminar do custo de produção do inoculante indica que poderá ser inferior 0,5 centavos por planta. Esse aumento do custo de produção poderia ser compensado pelo ganho de produtividade da plantação. Ganhos com o controle de micorrização variam da ordem de 10 a 400%, sendo de 40% o aumento de volume na parte aérea (GARBAYE, 1990), demonstrando, assim, que um aumento de 10% no custo na muda seria insignificante em relação ao benefício de 10% de madeira produzida, considerando-se cerca de R\$ 80,00 o preço de 1 m<sup>3</sup> de madeira em toras (CARON NETO, 2000; REVISTA DA MADEIRA, 2003). Para o Brasil, pode-se estimar, então, em mais de 23 milhões de reais por ano o potencial de mercado de inoculantes ectomicorrízicos, podendo-se estabelecer mais de uma dezena de empresas de biotecnologia de pequeno e médio porte. Além disso, inúmeros produtos podem ser obtidos nos extratos de cultivo desses fungos, subprodutos da produção de inoculantes, que podem agregar um valor de magnitude ainda maior.

### 3.6 Considerações finais

Com relação à produção de inoculantes de fECM, a literatura apresenta apenas dados qualitativos, não sendo encontrada qualquer informação sobre a cinética do cultivo, tornando as informações apenas de caráter preliminar. Isto demonstra que os resultados podem ainda ser irrelevantes dentro do contexto de produção em larga escala. Isso responde, provavelmente, pelo atraso tecnológico na área de produção industrial de inoculantes de fungos ectomicorrízicos. No Brasil, tentativas de produção desses inoculantes estão limitadas a alguns poucos grupos de pesquisadores.

Para abordar esta questão, este trabalho envolveu estudos cinéticos de modo a avaliar quantitativamente o potencial de isolados de fungos ectomicorrízicos para a produção de inoculantes comerciais através do cultivo submerso.

Este trabalho fez parte de um projeto mais amplo que aborda a diversidade, o isolamento, a seleção, a produção e a aplicação de microrganismos promotores do crescimento de plantas da área florestal (GIACHINI, *et al.*, 2000; ROSSI, 2001; NARLOCH, 2003; SOUZA, 2003; OLIVEIRA, 2004).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados neste trabalho vários isolados fúngicos com diferenças fisiológicas marcantes, servindo, assim, como modelos apropriados para estudos de produção de inoculantes. Para os estudos de transferência de oxigênio, um dos mais importantes, foi preciso definir um isolado que não apresentasse inibição por metabólitos, oriundos da própria cultura, ao longo do cultivo, para que fosse possível estudar os efeitos relacionados com as variáveis de processo. O isolado UFSC-Rh90 foi selecionado por apresentar essa característica.

O caráter inédito dos estudos de transferência de oxigênio para fungos ectomicorrízicos em biorreator *airlift* exigiu vários estudos complementares. O problema da viabilidade desses fungos também gerou trabalho adicional, tanto que, neste caso, devido à sua importância para a tecnologia de produção de inoculantes, iniciou-se um estudo específico relacionado com a fisiologia e bioquímica de crescimento desses fungos, que será tratado em outro projeto de doutoramento.

Na caracterização hidrodinâmica do biorreator, foram utilizadas técnicas mais simplificadas, que evitaram a construção de diversas portas acessórias. Uma deficiência no arranjo experimental foi gerada pela falta de um sistema de controle do pH, pois os fungos ectomicorrízicos produzem muitos ácidos orgânicos que, embora responsáveis pelos benefícios proporcionados pela solubilização de minerais do solo, podem se tornar limitantes ao crescimento durante o cultivo submerso.

A flexibilidade e a dinâmica dos ensaios em frascos possibilitou economia de tempo e materiais e, apesar das diferentes condições em relação ao cultivo em biorreator, foram úteis para o estudo preliminar de parâmetros como a conversão de substrato em biomassa, as variações do pH, dentre outros.

### 4.1 Microrganismos utilizados

Os isolados de fungos ectomicorrízicos (fECM) utilizados neste trabalho foram provenientes de plantações de *Pinus* spp. e *Eucalyptus* spp., localizadas em Santa Catarina e Minas Gerais, e pertencem à coleção do LECM/MIP da UFSC. Foram utilizados 6 isolados de fECM dessa coleção, conforme indicado no Quadro 4.1. *Chondrogaster angustisporus* Giachini, Castellano, Trappe & Oliveira, é uma nova espécie encontrada no Brasil e na Austrália e descrita por Giachini *et al.* (2000). Essa espécie também foi encontrada mais

recentemente em plantios de eucalipto na Espanha (ALVAREZ e CERCEDA, 2005). A escolha desses isolados baseou-se em resultados de trabalhos anteriores realizados por membros do mesmo laboratório (ROSSI, 2001; NARLOCH, 2002; SOUZA, 2003; SOUZA *et al.*, 2004, OLIVEIRA, 2004) nos quais verificou-se o desempenho desses isolados em colonizar o sistema radicular e promover o crescimento e absorção de P em mudas de *E. dunnii* e *P. taeda*.

Os isolados foram mantidos por subcultura em meio MNM e PGK sólido (1,5% ágar) (Quadro 4.2), com repicagens mensais, e incubação na ausência de luz à temperatura de  $25\pm 1$  °C.

Código	Espécie	Hospedeiro	Local	Ano da coleta
UFSC-Sc42	<i>Scleroderma</i> sp. (Persoon) Fries	<i>Pinus</i> sp.	Blumenau-SC	1988
UFSC-Rh90	<b>Rhizopogon nigrescens Coker &amp; Couch</b>	<i>P. taeda</i>	Três Barras-SC	1993
UFSC-Rh106	<i>Rhizopogon vulgaris</i> (Vitt.) M. Lange	<i>P. taeda</i>	Três Barras-SC	1995
UFSC-Pt116	<i>Pisolithus microcarpus</i> (Cooke & Masee) G. Cunn.	<i>E. dunnii</i>	Correia Pinto-SC	1997
UFSC-Ch163	<i>Chondrogaster angustisporus</i> Giachini, Castellano, Trappe & Oliveira	<i>E. dunnii</i>	Correia Pinto-SC	1995
UFSC-Pt188	<i>Pisolithus microcarpus</i> (Cooke & Masee) G. Cunn.	<i>Eucalyptus</i> sp.	Lavras-MG	1999

Quadro 4.1 Isolados de fungos ectomicorrízicos da coleção do LECM da UFSC.

#### 4.2 Meios de cultura para os isolados fúngicos

Foram utilizados o meio MNM (MARX, 1969) e variações do meio PGK (ROSSI, 2001; ROSSI *et al.*, 2002). A quantidade de nitrogênio do meio MNM, originalmente  $0,25 \text{ g.L}^{-1}$  (C/N 50/1), foi alterada para  $0,75 \text{ g.L}^{-1}$ , pois Marx (1969) modificou a fonte de carbono e não corrigiu o nitrogênio, deixando o meio desbalanceado para aplicações em estudos de crescimento. Em diversas aplicações também se adicionou 0,2% de carvão ativo neutralizado no meio de cultura para placas. A composição desses meios é apresentada no Quadro 4.2, sendo denominados da seguinte forma:

- MNM Meio de Melin-Norkrans Modificado (MARX, 1969);
- PGK Meio Pridham-Gottlieb (LITCHFIELD e ARTHUR, 1983) com modificações propostas por KUEK (1996);
- PGKM Meio utilizado por KUEK (1996) com modificações propostas neste trabalho.

Componentes	MNM (g.L <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	PGK (g.L <sup>-1</sup> )	PGKM (g.L <sup>-1</sup> )
Glicose	10,0	10,0	14,0
Peptona de soja	-	3,33	5,00
Extrato de levedura	-	0,67	-
Extrato de malte	3,0	-	3,00
CaCl <sub>2</sub>	0,050	-	-
NaCl	0,025	-	-
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	-	1,0	0,90
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,75	-	-
NH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>	-	-	0,10
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,50	0,264	0,264
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	0,628	0,628
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,15	0,330	0,330
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	-	0,0021	0,0021
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	-	0,0004	0,0004
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	-	0,0006	0,0006
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	-	0,0005	0,0005
FeCl <sub>3</sub> (solução 1%)	1,2 mL	-	-
Tiamina-HCl	100 µg	-	-
Relação C/N	14/1	10/1	14,6/1

Quadro 4.2 Composição dos meios de cultura utilizados como base para os estudos de produção de biomassa.

Uma variação diluída do meio PGKM também foi utilizada, contendo (em g.L<sup>-1</sup>): glicose 10,0; peptona de soja 2,5; extrato de malte 1,5, e sais 70% da formulação. Na maioria das vezes os meios de cultura foram complementados com os micro-nutrientes apresentados no Quadro 4.3.

Componentes	Quantidade (g.L <sup>-1</sup> )
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,00200
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,00300
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,00003
KI	0,00075

Quadro 4.3 Micro-nutrientes para complementação dos meios de cultura.

**Nota:**

Ao longo da apresentação serão mencionados muitas vezes os termos inóculo e inoculante. Apesar de em essência ter o mesmo significado, o termo inoculante é utilizado aqui com propósito de designar um produto para inoculação de plantas, enquanto que inóculo é utilizado para designar a biomassa utilizada para inocular o meio de cultura.

<sup>1</sup> Exceto para FeCl<sub>3</sub> e Tiamina-HCl, conforme unidades em destaque.

### 4.3 Condições de cultivo e de operação

Os fungos ectomicorrízicos não esporulam em cultura, mas somente através das frutificações (cogumelos), fazendo com que o inóculo para cultivo desses fungos seja constituído de uma suspensão de hifas. Como observado em estudos anteriores (ROSSI, 2001), as dificuldades para produção do inóculo desses fungos são maiores em *shaker*, além disso, no cultivo em meio líquido estático a biomassa cresce na superfície facilitando sua separação do extrato que normalmente é tóxico ao próprio fungo. A simplicidade, o menor risco de contaminação e o alto rendimento, fazem do cultivo estático uma ótima opção para produção do inóculo em pequena escala.

Devido à utilização de vários isolados e, principalmente, à falta de um sistema de controle do pH, neste trabalho não foram realizados estudos para otimização das condições de cultivo. Desse modo, o pH adotado foi aquele mais utilizado no cultivo desses fungos, e a temperatura foi a média que ocorre normalmente na região de Santa Catarina.

Como o cultivo dos fungos constituiu o ponto central desta proposta, são apresentadas abaixo as condições gerais utilizadas para tal fim:

1. **Em placas de Petri:** culturas incubadas em estufa tipo BOD a  $25 \pm 1$  °C, na ausência de luz.
2. **Em frascos:** cultivo estático em incubadora BOD, à temperatura de  $25 \pm 1$  °C e na ausência de luz. Foram utilizados frascos de Erlenmeyer de 250 mL de volume com 25 mL de meio de cultura. Os fungos foram inoculados na forma de discos de micélio-ágar de 7 mm de diâmetro (5 a 8 discos por frasco), obtidos de culturas recentes (20 a 30 dias) em placas.
3. **Em biorreator:** processo em batelada, à temperatura de  $25 \pm 1$  °C e vazão de ar constante. No biorreator de inox, o cultivo foi conduzido na ausência de luz, e no biorreator de vidro permaneceu exposto à luminosidade natural. Os fungos foram inoculados na forma de suspensão miceliana com concentração variando entre 0,20 e 0,50 g.L<sup>-1</sup>.
4. O ajuste de pH nos meios de cultura, de regra em 5,8, foi realizado antes da esterilização e, dependendo do ensaio, com uma solução equimolar de ácido cítrico/citrato de sódio (A/C) 0,1 M (SMITH, 1982), com a função auxiliar de manutenção do pH, ou HCl/NaOH 0,1 M. Foi utilizado um potenciômetro padrão de bancada.
5. Nos cultivos em biorreator, foram utilizados 0,2 a 0,4 mL.L<sup>-1</sup> do anti-espumante polipropilenoglicol.

### 4.4 Procedimentos de desinfecção e esterilização

1. A esterilização de meios de cultura e utensílios foi realizada em autoclave com temperatura de 121 °C.

2. Os meios de cultura, com volumes inferiores a 1 L foram esterilizados durante 15 min.
3. Os meios de cultura, em volumes de 2,5 a 5 L, para fermentações em biorreator foram esterilizados durante 20 e 30 min, respectivamente.
4. Todos os materiais acessórios para manipulação direta com o fungo foram esterilizados durante 20 min; o biorreator de vidro foi esterilizado durante 30 min. O biorreator de aço inox foi esterilizado por um processo que utilizou temperaturas entre 100 e 121°C, obtidas através de uma entrada de vapor, gerado por uma autoclave de 8 L, conectada através de uma derivação da entrada de ar. Durante a esterilização dos pontos de alimentação, amostragem e descarga, entrada de ar, filtro de saída de gases, manômetro e sensor de oxigênio dissolvido (OD), a temperatura foi mantida entre 100 e 110 °C devido à depressurização causada pelas sangrias e à limitada geração de vapor. Após esta fase, que durava 120 min., o biorreator foi pressurizado até atingir 121°C, permanecendo por mais 30 min. O liquidificador utilizado para preparação das suspensões micelianas era constituído com uma jarra em aço inox esterilizável.
5. Antes de cada fermentação, o piso da sala e superfícies de bancadas foram desinfetadas com solução de hipoclorito de sódio (0,2%). Esse procedimento foi importante para prevenção de vetores de contaminação como os ácaros e formigas. Na ocorrência de contaminação das culturas em biorreator, este foi esterilizado duas vezes seguidas, após a retirada do conteúdo contaminado e limpeza.
6. Materiais contaminados foram esterilizados durante 20 min antes do descarte.
7. Os procedimentos de inoculação dos meios e de repicagens foram realizados sob condições assépticas em capela de fluxo laminar.
8. Sementes foram desinfetadas pela imersão em solução de álcool 70%, durante 30 s e, em seguida, lavadas em água destilada esterilizada. Posteriormente, as sementes foram imersas em solução de hipoclorito de sódio 1% durante 20 min sob agitação e, finalmente, lavadas em água estéril três vezes consecutivas.
9. Para utilização nos experimentos com plantas em casa de vegetação, os tubetes plásticos foram submetidos à esterilização em autoclave durante 20 min, e o substrato de plantio durante 60 min.

## **4.5 Métodos analíticos**

### **4.5.1 Obtenção de amostras**

Para o cultivo em frascos, foi empregada uma amostragem destrutiva com as amostras compostas pelo conteúdo total dos frascos, em duplicatas e triplicatas. Em alguns casos foram

retiradas, assepticamente, alíquotas para determinação do pH e da glicose residual. Para cultivo em biorreator foram retiradas amostras de 25 mL (biorreator de 2,3 L) e 40 mL (biorreator de 5 L).

#### 4.5.2 Determinação da biomassa em cultura líquida

Para o cultivo tanto em frascos quanto em biorreator, a concentração celular foi determinada através da massa seca. Para isso, amostras de volume conhecido foram filtradas em papel de filtro previamente pesado, lavadas com igual volume de água destilada e secadas a 75 °C até peso constante (mínimo de 48 horas). A concentração celular foi, então, determinada através da Equação 4.1:

$$X = \frac{(m_{a+f} - m_f)}{V_a} \quad (4.1)$$

Onde: X = concentração de biomassa (g.L<sup>-1</sup>)  
 $m_{a+f}$  = massa da amostra seca + massa do papel filtro (g)  
 $m_f$  = massa do papel filtro (g)  
 $V_a$  = volume da amostra (L)

#### 4.5.3 Quantificação da viabilidade de suspensão miceliana

A viabilidade de uma suspensão miceliana, como a utilizada para inoculação do biorreator ou para o processo de encapsulação, apresenta uma variabilidade dependente de muitos fatores, como, por exemplo, a idade da cultura, o modo de fragmentação, o nível de ATP nas hifas e a presença de metabólitos tóxicos. Assim, foi necessário encontrar técnicas para a quantificação da viabilidade dessa suspensão, pois no caso de cultivo em placas demora-se mais de 2 dias para determiná-la, não sendo possível verificar o estado real naquele instante.

Uma dessas técnicas preconiza o uso de cloreto de trifetil tetrazolium (CTT) (BENSON, 1994). Essa técnica baseia-se no princípio de que a atividade da desidrogenase de células viáveis reduz o CTT a um produto vermelho (conhecido como vermelho de tetrazolium), que pode ser medido por espectrofotometria. Para isso, adicionam-se 3 mL do reagente CTT (6 g.L<sup>-1</sup> de CTT em 0,05 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tamponado em pH 7,4 + 0,5 mL.L<sup>-1</sup> de Tween 80) a 50-100 mg de micélio em tubo de 20 mL de capacidade. O micélio é retirado das bordas de colônias jovens, com uma semana de idade, obtidas em meio MNM sólido, e constitui o padrão, com 100% de viabilidade. Em seguida, infiltra-se o reagente sob vácuo durante 5 min., e incuba-se a amostra, em triplicata, a 25 °C durante 10 h. Repete-se o procedimento descrito acima, substituindo-se o micélio jovem obtido em meio sólido, por micélio obtido através da metodologia descrita no item 4.9.1, fragmentado em liquidificador. No dia seguinte, adicionam-se 7 mL de etanol (95%) por tubo e extrai-se o complexo avermelhado formado, fervendo-se em banho-

maria durante 4 min. As amostras de micélio são filtradas em papel de filtro, lavadas e secadas a 75 °C durante 48 h para determinar a matéria seca. A absorbância do complexo avermelhado é determinada a 490 nm. Os valores das amostras fragmentadas são confrontados com os valores padrão e a viabilidade é expressa em gramas de micélio viável por grama de matéria seca (ROSSI *et al.*, 2002). Alternativamente, essa técnica foi utilizada apenas para ensaios qualitativos rápidos, adicionando-se o reagente CTT na amostra e observando-se sob microscópio estereoscópio a mudança de cor das hifas após cerca de 3 a 6 h.

#### 4.5.4 Determinação de carboidratos

A concentração de glicose nas amostras de cultivo foi determinada pelo método enzimático GOD, fundamentado na clássica reação de Trinder (TRINDER, 1969), envolvendo a oxidação da D-glicose, pela glicose oxidase (GOD), a ácido glucônico e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio, na presença de peroxidase, reage com o hidroxibenzoato de sódio e 4-amino-fenazona para formar o complexo-quinona. A intensidade da cor formada é proporcional à concentração de glicose na amostra, podendo ser medida por espectrofotometria. Neste estudo, foi utilizado o reagente comercial EnzColor<sup>®</sup> da Biodiagnóstica, e a absorbância foi determinada a 500 nm.

Os açúcares totais redutores foram determinados pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), adaptado de Miller (1959). O princípio do método consiste na oxidação do grupo aldeído presente nos açúcares (redutores) e redução do ácido 3,5-dinitrosalicílico em condições alcalinas. Os ensaios foram realizados em tubos contendo 400 µL de amostra previamente diluída e 400 µL do reagente DNS<sup>2</sup>. Após manter em banho-maria a 100 °C por 5 min., a mistura foi resfriada em banho de gelo e adicionada de 4 mL de água destilada, permanecendo em repouso por 15 min. A determinação da absorbância em espectrofotômetro foi feita a 540 nm. Uma curva padrão de glicose foi preparada com concentrações na faixa de 0 a 3 g.L<sup>-1</sup>.

#### 4.5.5 Determinação de fenóis totais

A determinação de fenóis totais foi realizada por dosagem química, utilizando-se o método da 4-aminoantipyrina (4-AAP) (YANG e HUMPHREY, 1975). Uma amostra de 50 µL do extrato de cultivo foi misturada com 0,5 mL de tampão glicina 0,1 M, pH 9,7, contendo 1% de ferrocianeto de potássio. Em seguida, 2,5 mL de 4-AAP 1% (preparada com o mesmo tampão)

---

<sup>2</sup> DNS: 75 g de tartarato de sódio e potássio e 4 g de hidróxido de sódio dissolvido em água destilada. Em seguida, adição lenta e sob agitação constante de 2,5 g de ácido dinitrosalicílico. Volume final para 250 mL.

foram adicionados para formar uma cor vermelha na solução resultante, que foi determinada por espectrofotometria a 595 nm, e posterior comparação com um padrão de fenol.

#### 4.5.6 Dosagem de cor

A produção de pigmentos é comum na maioria dos fungos ectomicorrízicos e pode ser o indicativo de algum fator inibidor como as substâncias fenólicas. A medida da coloração ou descoloração do meio de cultura produzido pelos fungos durante cultivo foi realizada através do monitoramento da absorbância a 465 nm em pH 7,6 nas amostras (SOARES e DURAN, 2001).

#### 4.5.7 Determinação da viscosidade

A presença de micélio disperso pode alterar as propriedades reológicas do meio de cultura fazendo com que a viscosidade aumente com o aumento da agitação reduzindo, assim, o transporte de nutrientes, oxigênio e calor. A viscosidade aparente foi determinada ao longo de um cultivo através da análise das amostras utilizando-se um viscosímetro rotacional com geometria de cilindros concêntricos, modelo VT550 com sensor NV, da Thermo HAAKE. A temperatura das amostras durante os ensaios foi mantida a 25 °C com a utilização de um banho termostaticado.

### 4.6 Determinação das grandezas de transformação

#### 4.6.1 Conversão de substrato em biomassa

A conversão de substrato em biomassa em um cultivo batelada a volume constante é:

$$Y_{X/S} = \frac{dX}{-dS} \quad (4.2)$$

Essa grandeza é útil na análise de processos e na definição do substrato limitante. Desde que as condições não sejam alteradas significativamente ao longo do cultivo,  $Y_{X/S}$  deve ser constante, e a integração da Equação 4.2 fornece a Equação 4.3. Caso contrário, somente seu valor instantâneo ( $Y_{X/S} = dX/-dS$ ) deve ser levado em conta.

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad (4.3)$$

Onde:  $Y_{X/S}$  = fator de conversão de substrato (glicose) em biomassa ( $\text{g}_{\text{cel}} \cdot \text{g}_{\text{sub}}^{-1}$ )  
 $X_0$  = concentração inicial de biomassa ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )  
 $S_0$  = concentração inicial de glicose ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )  
 $S$  = concentração de glicose durante o cultivo ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )

Representando-se os dados em um gráfico  $X = f(S)$ , o coeficiente angular da tangente à curva em qualquer instante é  $Y_{X/S}$ . A partir de seu valor, é possível calcular o valor da concentração da biomassa ( $X$ ), a partir de um valor conhecido da concentração de substrato ( $S$ ) (item 4.5.2).

Em fermentações industriais, principalmente com grandes volumes, dificilmente são observados valores constantes dos fatores de conversão, tanto  $Y_{X/S}$ , como  $Y_{X/P}$  e  $Y_{P/S}$ . Além da conversão depender do microrganismo em relação à natureza e composição do substrato, também é afetada pelo tempo de mistura e pela transferência de oxigênio. Além disso, deve-se considerar a parcela de energia da oxidação do substrato que é utilizada para manutenção das atividades vitais (HISS, 2001), que torna-se mais significativa para microrganismos de crescimento lento, fazendo com que um determinado consumo de substrato não produza sempre um aumento proporcional na biomassa.

Introduzindo-se esse conceito através do consumo específico de substrato para manutenção ( $m_S$ ) ao balanço material, obtém-se uma nova definição para o fator de conversão que, sem demonstração, é apresentado através da Equação 4.4.

$$\mu_S = \frac{\mu_X}{Y'_{X/S}} + m_S \quad (4.4)$$

Onde:  $\mu_S$  = velocidade específica de consumo de substrato ( $\text{dia}^{-1}$ )  
 $\mu_X$  = velocidade específica de crescimento de células ( $\text{dia}^{-1}$ )  
 $m_S$  = coeficiente de manutenção para o substrato ( $\text{mg}_{\text{sub}} \cdot \text{g}_{\text{cel}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ )  
 $Y'_{X/S}$  = fator de conversão de substrato em biomassa verdadeiro ( $\text{g}_{\text{cel}} \cdot \text{g}_{\text{sub}}^{-1}$ )

O balanço poderia também ser ampliado com a introdução de parcelas de consumo de substrato para produtos do metabolismo, cujos valores experimentais sejam conhecidos, resultando novos valores dos fatores de conversão e do coeficiente de manutenção. Entretanto, todas as conclusões a respeito de um determinado cultivo dependem muito da quantidade de dados experimentais disponíveis sobre o sistema (HISS, 2001). Neste trabalho, devido à essas limitações, foi considerado o valor médio de  $Y_{X/S}$  definido pela Equação 4.3, e, também, por ser o parâmetro mais utilizado na maioria dos estudos na área de engenharia bioquímica.

#### 4.6.2 Velocidade específica de crescimento

Pelo fato de a concentração celular aumentar durante um cultivo descontínuo, aumentando, conseqüentemente, a concentração das enzimas responsáveis pela transformação

do substrato, é mais coerente analisar o valor da velocidade instantânea com relação à referida concentração celular. Por esta razão, o estado em que se encontra o sistema é melhor definido pela velocidade específica de consumo do substrato ( $\mu_S$ ) e, do mesmo modo, a velocidade específica de crescimento das hifas ( $\mu_X$ ), conforme as expressões:

$$\mu_S = \frac{-1}{X} \cdot \frac{dS}{dt} \quad (4.5)$$

$$\mu_X = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (4.6)$$

Onde:  $\mu_S$  = velocidade específica de consumo de substrato ( $\text{dia}^{-1}$ )  
 $\mu_X$  = velocidade específica de crescimento de hifas ( $\text{dia}^{-1}$ )  
 $t$  = tempo (dia)

As velocidades anteriormente definidas por unidade de concentração celular (GADEN, 1955) têm como dimensão [ $\text{tempo}^{-1}$ ], desde que S e X estejam expressas em  $\text{g.L}^{-1}$ . Ao representar a fase de crescimento exponencial em escala semilogarítmica, os dados experimentais devem se alinhar. Então, representando dados da fase exponencial em um gráfico  $\ln(X) = f(t)$ , o coeficiente angular à curva em qualquer instante seria:

$$\frac{d\ln(X)}{dt} = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = \mu_X \quad (4.7)$$

Assim, durante a fase exponencial,  $\mu$  é constante e apresenta seu valor máximo ( $\mu_M$ )<sup>3</sup>. Desta forma, quando a biomassa estiver aumentando exponencialmente tem-se, segundo a integração da Equação 4.7, considerando  $\mu_X = \text{constante} = \mu_M$ :

$$X = X_{0i} e^{\mu_M(t-t_i)} \quad (4.8)$$

Onde: ( $t_i$  = tempo inicial = 0)

Ou, re-escrevendo de outra forma, tem-se:

$$\ln X = \ln X_{0i} + \mu_M \cdot t \quad (4.9)$$

Então, locando-se  $\ln X = f(t)$  obtém-se uma reta cujo coeficiente angular é  $\mu_M$ . Como em cultivo de fungos filamentosos não ocorre uma fase exatamente exponencial, devido às limitações de transferência de massa nos aglomerados de hifas ou *pellets*, os valores de

<sup>3</sup> Obs.: O valor de  $\mu_X$  é o máximo para as condições do experimento, o que não implica que seja o máximo para o microrganismo.

velocidade obtidos através dessa metodologia foram considerados como médias dentro do intervalo onde os dados foram ajustados. Curvas de velocidade específica de crescimento para determinação dos coeficientes de manutenção (item 4.8.5), foram obtidas através do método geométrico de cálculo das derivadas proposto por Le Duy e Zajic (HISS, 2001), utilizando-se uma planilha de cálculos do Microsoft Excel®.

Pode-se, também, obter o tempo de duplicação da biomassa, considerando-se  $X = 2X_{0i}$  na Equação (4.9), o que resulta em:

$$t_{dup} = \frac{\ln 2}{\mu_M} \quad (4.10)$$

Onde:  $t_{dup}$  = tempo para duplicação da biomassa (dia)

Com a Equação (4.9) e o conhecimento da velocidade específica de crescimento, pode-se prever a duração de um cultivo, sabendo-se a concentração inicial de biomassa.

#### 4.6.3 Velocidade específica de respiração

A velocidade específica de respiração é definida como:

$$Q_{O_2} = \frac{1}{X} \frac{dO_2}{dt} \quad (4.11)$$

Onde:  $Q_{O_2}$  = velocidade específica de respiração ( $\text{mgO}_2 \cdot \text{g}_{\text{cel}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ )  
 $dO_2/dt$  = velocidade de consumo de oxigênio ( $\text{mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ )

A grandeza  $Q_{O_2}$  representa a característica biológica do sistema, pois ela depende do microrganismo empregado, da composição do meio e das condições de cultivo (pH, temperatura, etc.). A sua determinação é feita conjuntamente com o  $k_L a$  descrito no item 4.8.3.

#### 4.6.4 Produtividade em biomassa

Uma definição especial de velocidade, cujo interesse prático está na avaliação do desempenho de um cultivo, é a produtividade média em biomassa definida por:

$$P_X = \frac{X_m - X_0}{t_f} \quad (4.12)$$

Onde:  $P_x$  = produtividade média em biomassa ( $\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ )  
 $X_m$  = concentração máxima de biomassa ( $\text{g.L}^{-1}$ )  
 $t_f$  = tempo total do cultivo (dia)

Apesar de ser utilizada neste trabalho, a produtividade tem interesse maior quando o processo de produção se encontra mais definido e padronizado, principalmente com relação ao inóculo, pois o estado fisiológico e a quantidade inicial de biomassa interferem no tempo de cultivo e, desse modo, na produtividade. Além disso, foi considerado apenas a produtividade do cultivo e não a do processo como um todo.

#### 4.7 Estudos preliminares

##### 4.7.1 Viabilidade de inoculante produzido pelo método tradicional – FES

Com o propósito de comparar a viabilidade dos inoculantes encapsulados em gel, foram produzidos inoculantes dos isolados utilizando-se o método tradicional de fermentação no estado sólido (FES) (ALVES *et al.*, 2001; SOUZA *et al.*, 2004), em frascos de conserva. Para isso, a partir do micélio produzido em dois frascos de Erlenmeyer foram preparadas suspensões (item 4.10.1), sem adição de carvão e utilizando-se 100 mL meio MNM ao invés de solução salina. Cerca de 60 mL das suspensões foram utilizados para inocular 250 mL de uma mistura turfa-vermiculita (1:4, v:v) em frascos tipo conserva de 600 mL. Partículas de turfa menores que 1 mm, e partículas de vermiculita entre 4 e 5 mm, foram selecionadas por peneiração. O substrato foi umidificado previamente com 40 mL de meio MNM, o pH foi estabilizado previamente e a mistura foi esterilizada durante 20 min.

No total foram adicionados 100 mL de meio de cultivo por frasco (40%, v/v), permitindo uma produção de biomassa estimada em  $0,35 \text{ g.L}^{-1}$ , considerando-se os valores de conversão em torno de 42% (ROSSI, 2001). Esse dimensionamento foi adotado para obter-se uma equivalência em relação à biomassa das cápsulas, de modo a permitir uma comparação mais confiável. Na tampa de cada frasco foram feitos dois furos de  $\varnothing = 1 \text{ cm}$  que foram selados com duas camadas de esparadrapo tipo Milipore® antes da esterilização, para permitir a troca de gases.

Os frascos foram selados com filme PVC e mantidos em estufa tipo BOD para crescimento do micélio durante 2 meses, nas mesmas condições utilizadas para os demais cultivos (*cf.* item 4.3). Após esse período, o substrato colonizado foi lavado com água destilada estéril para remoção de resíduos de açúcares e/ou metabólitos. A lavagem consistiu da adição, por duas vezes, de um volume de 300 mL de água e cuidadosa agitação utilizando um bastão de vidro estéril. As partículas mais pesadas da turfa sedimentaram, podendo-se separar as partículas de vermiculita contendo o micélio e que permaneceram inteiras. Em seguida, foram acondicionadas ainda úmidas em frascos e armazenadas a  $8 \text{ }^\circ\text{C}$ . A viabilidade do micélio foi

testada periodicamente em meio MNM sólido em placas de Petri (*cf.* item 4.10.4.1), utilizando-se porções de inoculante equivalente ao volume de uma cápsula.

#### 4.7.2 Efeito do carvão ativo na viabilidade do micélio

Foram realizados estudos para avaliar o efeito do carvão ativo na viabilidade de suspensões micelianas e de cápsulas de inoculante, em relação ao tempo de armazenamento. Para isso, foram preparadas suspensões do micélio obtido em meio líquido através de fragmentação em solução salina (0,85% NaCl) em liquidificador, durante cerca de 8 segundos. As suspensões foram divididas em duas frações, numa delas foi adicionado 0,25% de carvão ativo neutralizado (TENG, 1997). Uma parte da suspensão com carvão foi utilizada para produção de cápsulas, conforme descrito no item 4.10.3. A outra parte da suspensão com carvão, juntamente com a fração sem carvão, foi armazenada em refrigerador para testes de viabilidade, inoculando-se periodicamente 2,5 mL em meio sólido em placas e, posteriormente, incubando-se em estufa BOD. Ambas as suspensões foram testadas em meio de cultura sem carvão e, também, em meio contendo 0,25% de carvão ativado.

#### 4.7.3 Tempo de fragmentação do micélio

Para avaliar o efeito do tempo de fragmentação sobre a viabilidade do inóculo, e permitir a definição de um tempo de fragmentação apropriado, foram preparadas para cada isolado duas suspensões de micélio obtido em cultura líquida através da fragmentação em solução salina em liquidificador a 3600 rpm, durante 10 e 60 segundos. As suspensões foram adicionadas de 0,25% de carvão ativo neutralizado e armazenadas em refrigerador para testes de viabilidade, inoculando-se periodicamente 2,5 mL em meio sólido em placas e, posteriormente, incubando-se em estufa BOD. Ambas as suspensões foram testadas em meio de cultura sólido contendo, também, 0,25% de carvão ativo.

#### 4.7.4 Estabilidade do gel de alginato de cálcio

O intumescimento, seguido de desintegração, observado em cápsulas durante alguns testes com tampões, sugeriu a realização de ensaios para verificar o que provocava a desestabilização do gel e como isso poderia afetar a viabilidade do inoculante. Para isso, 20 cápsulas de dois isolados (UFSC-Rh106 e UFSC-Pt116) foram colocadas em três condições: água destilada pH 3,5 e pH 6,5 e em solução salina (0,85% NaCl). Após 24 h foi observado em qual dos tratamentos ocorreu aumento de volume das cápsulas. Em ensaio paralelo, para cada isolado, 10 cápsulas foram inoculadas em quatro frascos com meio de cultura líquido. Após 24 h, e decorrido ou não o intumescimento, dois frascos de cada isolado foram agitados intensamente

para desintegrar as cápsulas e, posteriormente, foram incubados para verificar a viabilidade. Para cada isolado foram, também, inoculadas cerca de 25 cápsulas em meio de cultura sólido em placas, contendo excesso de sódio e incubadas para verificar a viabilidade. Os meios de cultura continham um excesso de íons sódio, pela presença de tampão citrato.

#### 4.7.5 Determinação das velocidades em cultivo estático

Para efeito de comparação e planejamento dos experimentos em biorreator, cultivos em frascos estáticos foram realizados para obtenção dos parâmetros cinéticos dentro das condições do item 4.3 (1). Os fungos foram inoculados em meio PGKM líquido na forma de discos de micélio-ágar de 7 mm de diâmetro, obtidos de culturas recentes (20 a 30 dias) em placas. Foram utilizados de 5 a 8 discos viáveis para inocular 25 mL de meio em frascos de Erlenmeyer de 250 mL de volume. Esse pequeno volume de meio permite que os isolados cresçam facilmente na superfície do líquido e capturem o oxigênio diretamente da atmosfera do frasco, onde está em quantidade suficiente para total conversão do substrato (ROSSI, 2001). Os frascos foram selados para evitar a entrada de ácaros e outros contaminantes durante o período de incubação que se estendeu por mais de dez dias. Os dados de matéria seca, pH e glicose residual foram obtidos ao longo do cultivo, com periodicidade variável entre os isolados em função das diferentes velocidades de crescimento exibidas. As amostras obtidas foram destrutivas e em duplicata. Esses dados permitiram determinar a velocidade específica de crescimento, a produtividade e a conversão de substrato em biomassa.

#### 4.7.6 Fatores que afetam o método dinâmico em biorreator *airlift*

O método dinâmico é um ensaio que utiliza um eletrodo específico para medida da concentração de oxigênio dissolvido em um meio líquido. Após aplicação desse método no biorreator *airlift* durante o cultivo, para determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio e da velocidade específica de respiração, foi necessário considerar certos parâmetros para o tratamento dos dados como a velocidade de sedimentação, atraso no tempo de resposta do eletrodo, dentre outros, apresentados a seguir.

##### 4.7.6.1 Sedimentação da biomassa

Durante o cultivo dos fungos ocorreu um aumento da massa dos *pellets* e, conseqüentemente, uma variação da velocidade de sedimentação. Através das amostras de biomassa foram realizados ensaios em uma proveta de 50 mL para determinar as velocidades de sedimentação. As diferentes bandas de concentração que se formam devido aos diferentes

tamanhos das partículas, típicas em ensaios de sedimentação, não chegam a se destacar em curto espaço de tempo (por ex. 30 s). Assim, considerou-se para a definição dessas velocidades o tempo decorrido para sedimentação da banda com a concentração de biomassa visivelmente mais uniforme.

#### 4.7.6.2 Hidrodinâmica

A sedimentação da biomassa resulta numa concentração de oxigênio dissolvido variável ao longo da altura do biorreator, principalmente entre o topo e a base. Com a retomada da aeração, ocorre inicialmente uma instabilidade nas leituras devida à mistura de líquido com diferentes concentrações de oxigênio dissolvido e, devida, também, à hidrodinâmica do biorreator. O tempo necessário para a homogeneização da concentração do OD foi determinado do modo como descrito no item 4.9.2.3, sendo utilizado para selecionar os dados não afetados por esse fenômeno, para a determinação do  $k_{LA}$ .

#### 4.7.6.3 Constantes de atraso do eletrodo de oxigênio dissolvido

Considerando que o sinal do sensor ( $C_p$ ) varia no tempo proporcionalmente à diferença entre a concentração real do oxigênio dissolvido ( $C$ ) e o sinal ( $C_p$ ) (AIBA e HUANG, 1969), tem-se:

$$\frac{dC_p}{dt} = k_p(C - C_p) \quad (4.13)$$

Onde:  $C_p$  = concentração de OD lida pelo eletrodo ( $\text{mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$ )  
 $k_p$  = constante de atraso do eletrodo ( $\text{h}^{-1}$ )

As constantes de atraso do eletrodo ( $k_p$ ) foram determinadas através de um ensaio degrau onde, primeiramente, zerou-se a leitura do sensor imerso em água através da injeção de nitrogênio e, posteriormente, introduziu-o imediatamente em líquido saturado de  $\text{O}_2$  e registraram-se as leituras obtidas. Foram realizados três ensaios em meio de cultura estático saturado de oxigênio, e três em meio de cultura saturado sob agitação constante proporcionada pela própria aeração, caso em que se minimiza o efeito do filme estagnado na membrana do sensor.

Nas condições do ensaio degrau tem-se desde o instante  $t = 0$  que  $C = C_S$ , e a Equação 4.13 resulta em (SCHMIDELL, 2001):

$$\frac{dC_p}{dt} = k_p(C_S - C_p) \quad (4.14)$$

ou:

$$\ln\left(1 - \frac{C_p}{C_s}\right) = -k_p \cdot t \quad (4.15)$$

Locando-se os valores de  $\ln(1-C_p/C_s)$ , em função do tempo, obtidos do ensaio degrau para as duas situações, o ajuste permitiu a obtenção dos valores de  $k_p$ .

#### 4.7.6.4 Constante de atraso do sensor de temperatura

O atraso na resposta dos termômetros durante os ensaios para determinação do tempo de mistura (item 4.9.2.3), também foi determinado através de um teste degrau. Para isso, primeiramente ajustou-se a temperatura do termômetro para zero com água a 0 °C e, em seguida, colocou-se o mesmo em água a 63 °C, registrando-se as leituras obtidas a cada 5 segundos. Considerando-se um raciocínio semelhante ao descrito acima, obteve-se um valor para a constante de atraso dos termômetros. Foram utilizados termômetros digitais idênticos.

#### 4.7.6.5 Efeito da despressurização

No momento da realização do método dinâmico, com a interrupção da aeração, ocorre uma despressurização gradativa do biorreator e uma conseqüente variação na concentração de oxigênio dissolvido, tanto pela variação da pressão parcial de oxigênio, quanto pelo possível efeito da pressão sobre a membrana do sensor. O resultado é como se houvesse um consumo adicional de oxigênio. Para o cultivo de fungos com baixa velocidade de respiração, esses valores podem ser significativos, necessitando de correção. Para isso, manteve-se o biorreator sob aeração por 20 min (APÊNDICE C) e, decorrido esse tempo, a vazão foi interrompida registrando-se as leituras da queda da concentração de oxigênio dissolvido devido à despressurização. Foram realizados ensaios apenas em água a 25 °C e nas três vazões específicas de ar definidas para os estudos de transferência de oxigênio (0,20, 0,36 e 0,52 vvm), em duplicatas. O valor do consumo aparente, obtido para cada vazão, foi utilizado para corrigir os valores de  $Q_{O_2}$ .

## 4.8 Transferência de massa

### 4.8.1 Determinação da solubilidade do oxigênio em meio de cultura

A medida da concentração de oxigênio dissolvido é baseada na equação que relaciona a concentração de OD no equilíbrio à pressão parcial de oxigênio no gás:

$$C_s = H \cdot p_g \quad (4.16)$$

Onde:  $C_s$  = concentração de saturação do oxigênio no líquido ( $\text{mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ )  
 $H$  = constante de Henry ( $\text{mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{atm}^{-1}$ )  
 $p_g$  = pressão parcial de oxigênio no gás (atm)

A corrente de um eletrodo de oxigênio é proporcional a  $p_g$ . Como a constante de Henry ( $H$ ) é dependente de vários parâmetros físico-químicos, como temperatura, pressão e concentração de soluto, é impossível obter-se uma medida direta da concentração de oxigênio dissolvido com um sensor de oxigênio. Entretanto, é possível calibrar o sensor através da liberação de uma quantidade definida de oxigênio numa solução, onde o mesmo foi previamente removido pela injeção de nitrogênio. Desenvolvido por Kappeli e Fiechter (1981), esse método é uma alternativa prática e precisa em relação ao método titulométrico de Winkler (1888).

Utilizou-se um balão de vidro adaptado com três saídas. Numa delas foi instalado o mesmo sensor de oxigênio dissolvido utilizado no biorreator, a outra saída foi utilizada para entrada de nitrogênio para retirada dos gases, e a terceira serviu para entrada de reagentes e retirada de amostras. O sistema foi colocado em banho termostaticado e submetido à agitação magnética. O ensaio foi conduzido adicionando-se 360 mL de meio de cultura PGK e mantendo uma vazão de  $140 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  de  $\text{N}_2$  sobre o líquido, de forma a evitar transferência de oxigênio pela superfície. Primeiramente o oxigênio do meio foi removido pelo borbulhamento de  $\text{N}_2$ . Após o sensor atingir a corrente zero (cerca de 1% da corrente em ar ambiente, segundo a especificação do fabricante), a injeção de nitrogênio foi interrompida e adicionaram-se 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  1 M. O oxigênio foi liberado para a solução pela reação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  com catalase em excesso, fornecendo uma leitura através do eletrodo. A concentração exata do  $\text{H}_2\text{O}_2$  adicionada foi de 1,024 M, determinada por titulação com  $\text{KMnO}_4$  padronizado com oxalato de sódio (padrão primário). O processo foi repetido para diferentes volumes de  $\text{H}_2\text{O}_2$  adicionada (20, 50, 75, 100, 150  $\mu\text{L}$ ), obtendo-se diferentes respostas do eletrodo. Com o gráfico obtido, determinou-se a quantidade de  $\text{H}_2\text{O}_2$  necessária para a saturação do meio de cultura, onde a quantidade de oxigênio foi obtida pela estequiometria e volume da reação, sendo expresso em  $\text{mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ .

#### 4.8.2 Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio

Entre as teorias que permitem o equacionamento da transferência de oxigênio, a mais utilizada é a que considera a existência de duas películas (ou filmes) estagnadas e em equilíbrio entre a interface gás-líquido, como ilustra a Figura 4.1 (SCHMIDELL, 2001).

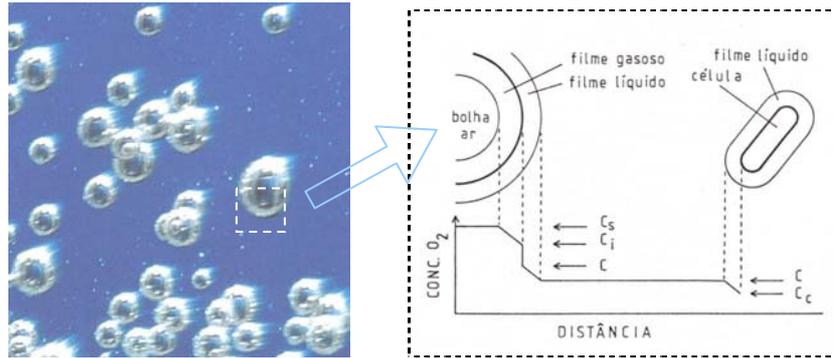


Figura 4.1 Representação da interface entre as bolhas de ar e o meio líquido com as películas estagnadas.

Por esse modelo, a transferência ocorre apenas por difusão, dependendo de um gradiente, na película gasosa, entre a pressão parcial de  $O_2$  no interior da bolha ( $p_g$ ) e na interface ( $p_i$ ), e na película líquida, um gradiente de concentração de  $O_2$  na interface ( $C_i$ ) e o seio do líquido. Admitindo que o sistema esteja em estado estacionário e que o perfil de concentração de oxigênio no interior das películas seja linear, pode-se definir o fluxo de oxigênio por unidade de área interfacial como:

$$n_{O_2} = k_g H(p_g - p_i) = k_L H(p_i - p_L) \quad \text{ou,} \quad (4.17)$$

$$n_{O_2} = k_g (C_s - C_i) = k_L (C_i - C) \quad (4.18)$$

Onde:  $n_{O_2}$  = fluxo de oxigênio ( $mgO_2 \cdot cm^{-2} \cdot h$ )

$k_g$  = coeficiente de transferência de massa da película gasosa ( $cm \cdot h^{-1}$ )

$k_L$  = coeficiente de transferência de massa da película líquida ( $cm \cdot h^{-1}$ )

$C$  = concentração de oxigênio no líquido ( $mgO_2 \cdot L^{-1}$ )

$C_i$  = concentração de oxigênio dissolvido na interface gás-líquido ( $mgO_2 \cdot L^{-1}$ )

Como não se podem estabelecer os valores relativos à interface gás-líquido, determinam-se os valores das concentrações no seio do gás e do líquido, trabalhando-se com o coeficiente global de transferência de oxigênio, que corresponde à soma das duas resistências. Entretanto, como a resistência devido ao filme gasoso é muito pequena frente à resistência do filme líquido, pode-se desconsiderá-la, resultando em  $p_g = p_i$  e  $C_i = C_s$ . Assim:

$$n_{O_2} = k_L H(p_g - p_i) = k_L (C_s - C) \quad (4.19)$$

A área interfacial de troca de massa é de difícil quantificação devido ao grande número de bolhas, podendo-se definir:

$$a = \frac{\text{área interfacial de transf. de massa}}{\text{volume total de líquido}}$$

Assim:

$$n_{O_2} a = k_L a H(p_g - p_l) = k_L a (C_s - C) \quad (4.20)$$

Onde:  $k_L a$  = coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $h^{-1}$ )

Não estando em estado estacionário em termos de transferência de  $O_2$ , a variação no tempo ( $t$ ) da concentração de oxigênio dissolvido ( $C$ ) é dada por  $n_{O_2} = dC/dt$ , ou seja:

$$\frac{dC}{dt} = k_L a (C_s - C) \quad (4.21)$$

Existem diversas técnicas para determinação do  $k_L a$ , sendo a técnica do sulfito, e suas variações, bastante tradicional. Neste trabalho foi utilizado um método que também é tradicional, e que utilizou apenas o sinal de resposta de um eletrodo imerso no líquido submetido à aeração, conhecido como método dinâmico (ou método direto) (HUMPHREY e TAGUCHI, 1966). Inicialmente, injetou-se nitrogênio no líquido para eliminar o  $O_2$  dissolvido, até a sonda indicar o valor de corrente zero. A seguir, iniciou-se a aeração do líquido, nas condições desejadas para determinação do  $k_L a$  (vazão, temperatura, etc.), passando-se a registrar o sinal da sonda a cada 10 s até o transmissor indicar o valor de 100% (o sensor foi previamente calibrado no líquido saturado de  $O_2$ ).

#### 4.8.2.1 Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio

O  $k_L a$  foi obtido através de um balanço de massa no sistema (Figura 4.2), considerando-se o *riser*, onde o ar foi injetado e ocorreu o contato gás-líquido numa mistura perfeita, e o *downcomer*, onde a fase gasosa foi desprezada e o escoamento considerado *plug-flow* (PEDRINI, 1997).

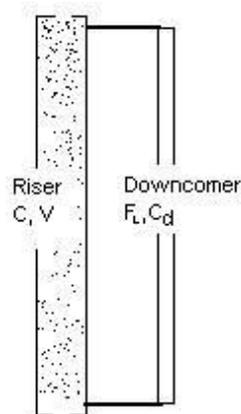


Figura 4.2 Esquema para o balanço de oxigênio na fase líquida em biorreator *airlift* com circulação externa.

O balanço de massa para o oxigênio na fase líquida no *riser* resultou em:

$$\frac{d(C.V_L^r)}{dt} = F_L.C_d - F_L.C + k_L a(C_S - C).V_L^r \quad (4.22)$$

Onde:  $V_L^r$  = volume de líquido no *riser* (L)  
 $F_L$  = vazão volumétrica de líquido ( $L.h^{-1}$ )  
 $C_d$  = concentração de oxigênio no *downcomer* ( $mgO_2.L^{-1}$ )

Na abordagem de Pedrini (1997), a concentração de oxigênio no *downcomer* foi expressa por:

$$C_{d(t)} = C(t - t_d) \quad (4.23)$$

Onde:  $t_d$  = tempo gasto para o líquido percorrer o *downcomer* (s)

Desde que não se alterem as condições hidrodinâmicas (item 4.9.2.1), o volume de líquido no *riser* permanece constante, e através das Equações 4.22 e 4.23, tem-se:

$$\frac{dC(t)}{dt} = \frac{F_L t_d}{V_L^r} \left( \frac{C(t - t_d) - C(t)}{t_d} \right) + k_L a(C_S - C) \quad (4.24)$$

Considerando-se que  $t_d$  seja suficientemente pequeno para que a diferença da Equação 4.24 possa ser aproximada pela sua derivada, pode-se escrever:

$$\frac{dC}{dt} \cong \frac{C(t) - C(t - t_d)}{t_d} \quad (4.25)$$

Re-arranjando a Equação 4.24 levando em consideração a Equação 4.25, tem-se:

$$\frac{dC}{dt} \left( 1 - \frac{F_L}{V_L^r} t_d \right) = k_L a(C_S - C) \quad (4.26)$$

Sendo que:

$$F_L = \frac{V_L^d}{t_d}; \quad V_L^d = V_d(1 - \varepsilon_d); \quad V_L^r = V_r(1 - \varepsilon_r)$$

Onde:  $V_r$  = volume do *riser* (L)  
 $V_d$  = volume do *downcomer* (L)

Entretanto, pela alta eficiência observada no separador de gás, foi considerado desprezível o valor de gás *holdup* no *downcomer* ( $\varepsilon_d$ ) e, que  $\varepsilon_r = \varepsilon$ . Então, a Equação 4.26 pode ser escrita como:

$$\frac{dC}{dt} \left( 1 - \frac{V_d}{V_r(1-\epsilon)} \right) = k_L a (C_S - C) \quad (4.27)$$

Integrando-se a Equação 4.27, conhecendo-se as condições iniciais ( $t = 0$ ;  $C = 0$ ), tem-se:

$$\ln \left( 1 - \frac{C}{C_S} \right) = -z k_L a \cdot t \quad (4.28)$$

sendo:  $z = \left( 1 - \frac{V_d}{V_r(1-\epsilon)} \right)^{-1}$ , que é constante para cada vazão de operação.

ou:

$$\frac{C}{C_S} = \left( 1 - e^{-z k_L a \cdot t} \right) \quad (4.29)$$

Devido à inexistência da fase gasosa no *downcomer*, seu volume, que representa cerca de 7% do volume útil do biorreator, não contribui para a transferência de oxigênio. O termo  $z$  representa essa perda devida ao menor volume disponível para essa transferência. Locando-se  $\ln(1 - C/C_S) \cdot z^{-1}$  em função do tempo, a partir dos dados experimentais obtidos através do ensaio dinâmico, obtém-se uma reta cuja inclinação fornece o valor de  $k_L a$ . A fração  $C/C_S$  é o próprio sinal do sensor calibrado no intervalo de 1 a 100%, não necessitando do conhecimento da concentração de saturação ( $C_S$ ). Esse ensaio para determinação de  $k_L a$  foi utilizado sem a presença do microrganismo, tendo importância principalmente para avaliar o desempenho do sistema de aeração e de diferentes tipos de biorreatores. Entretanto, como o  $k_L a$  é afetado durante o cultivo, seja pela alteração da viscosidade do meio de cultura (JIN *et al.*, 2001), ou pela presença da própria biomassa, a metodologia para sua determinação, nesse caso, é apresentada no item 4.8.3.

O valor de  $k_L a$  obtido ainda não é correto, porque o sensor não acompanha perfeitamente a variação na concentração de oxigênio, podendo necessitar de correção devido ao atraso de sinal.

#### 4.8.2.2 Correção do $k_L a$ em função do atraso na resposta do eletrodo

Para corrigir o atraso de sinal do sensor, segundo o procedimento proposto por Schmidell (2001), introduziu-se na Equação 4.13 o valor de  $C$  em função do tempo, obtido a partir da Equação 4.29, e a integração da equação resultante resultou em:

$$\frac{C_p}{C_S} = 1 + \frac{z k_L a}{k_p - z k_L a} e^{-k_p \cdot t} - \frac{k_p}{k_p - z k_L a} e^{-z k_L a \cdot t} \quad (4.30)$$

Ajustando-se a Equação 4.30 aos dados experimentais ( $C_p = f(t)$ ), utilizando uma rotina de cálculo, obtém-se o valor correto de  $k_L a$ . O valor da constante de atraso do sensor foi determinado conforme descrito no item 4.7.6.3.

#### 4.8.3 Transferência e consumo de oxigênio durante o cultivo: determinação do $k_L a$ e $Q_{O_2}$

Apesar de o método dinâmico ter sido utilizado para determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_L a$ ) sem a presença do fungo, a maior importância da aplicação do método foi na determinação do  $k_L a$  durante o cultivo e, também, da velocidade específica de respiração ( $Q_{O_2}$ ).

Durante o cultivo, enquanto o biorreator transfere oxigênio da fase gasosa para a fase líquida, o fungo consome o oxigênio dissolvido. O equacionamento através de um balanço de oxigênio no meio líquido, levando em conta o volume total do biorreator, pois o consumo também ocorre no *downcomer*, e a Equação 4.27 que já considera a ausência de transferência nesse trajeto, resulta em:

$$\frac{d(CV)}{dt} = zk_L a(C_S - C).V - Q_{O_2} X.V \quad (4.31)$$

Onde:  $Q_{O_2}$  = velocidade específica de respiração ( $\text{mgO}_2 \cdot \text{g}_{\text{cel}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ )  
 $V$  = volume do biorreator (L)

ou:

$$\frac{dC}{dt} = zk_L a(C_S - C) - Q_{O_2} X \quad (4.32)$$

A variação da concentração de oxigênio dissolvido no líquido é o resultado da diferença entre a quantidade que se consegue dissolver  $\{zk_L a(C_S - C)\}$  e o oxigênio consumido pelo fungo ( $Q_{O_2} X$ ). A cinética do cultivo está considerada pela equação anterior, pois  $X$  varia com o tempo e  $Q_{O_2}$  varia com  $\mu_X$ .

A determinação do  $k_L a$  e da  $Q_{O_2}$  também foi realizada com emprego do método dinâmico (SCHMIDELL, 2001). Em determinado instante, interrompe-se a aeração para anular a transferência de oxigênio. Conforme ilustra a Figura 4.3, a concentração de  $O_2$  dissolvido  $C_0$ , no instante inicial, começa a diminuir, e o sinal do sensor é registrado continuamente. Ao se atingir certo valor  $C_{01}$ , retoma-se a aeração nas condições normais e registra-se o aumento da concentração de  $O_2$  dissolvido até atingir novamente o valor anterior  $C_0$ . Este procedimento deve levar somente alguns minutos, dependendo muito do estágio do cultivo, sendo importante que a concentração não atinja valores críticos que

afetariam o metabolismo. Nesse curto espaço de tempo, pode se supor que não ocorre aumento de  $X$  e que  $Q_{O_2}$  se mantém constante.

Para o trecho sem aeração, resulta da Equação 4.32 que:

$$\frac{dC}{dt} = -Q_{O_2} X \quad (4.33)$$

Com a consideração anterior de que  $Q_{O_2}$  é constante, a Equação 4.33 pode ser integrada resultando:

$$C = C_0 - Q_{O_2} X(t - t_0) \quad (4.34)$$

A Equação 4.34 prevê uma variação linear com o tempo no trecho sem aeração. Assim, foi obtido o valor de  $Q_{O_2}$  através do coeficiente angular  $Q_{O_2}X$  e do valor de  $X$  obtido da análise da amostra retirada no momento da realização desse ensaio.

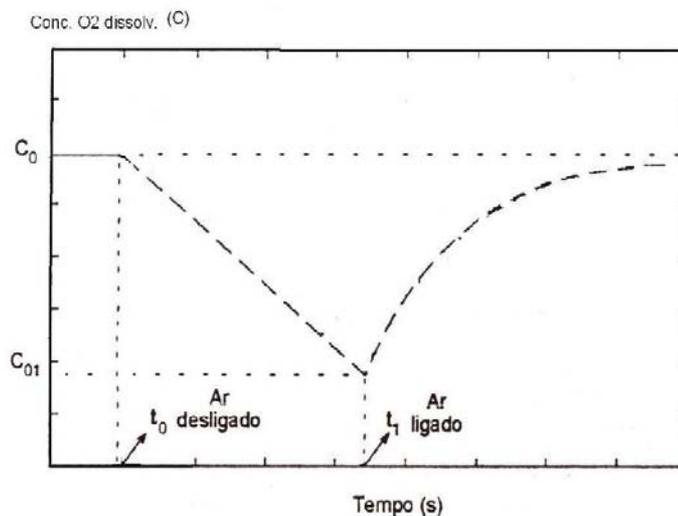


Figura 4.3 Ilustração para explicar o método dinâmico utilizado para determinar o  $k_L a$  e a  $Q_{O_2}$  (adaptada de SCHMIDELL, 2001).

O valor de  $k_L a$  foi determinado com a utilização dos dados obtidos durante o aumento da concentração do O<sub>2</sub> dissolvido, ilustrado pelo segundo trecho da Figura 4.3, onde a Equação 4.32 foi aplicada integralmente. Considerando estado estacionário no momento que antecede a interrupção da aeração ( $C = C_0$ ), verifica-se que:

$$C_0 = C_S - \frac{Q_{O_2} X}{z k_L a} \quad (4.35)$$

Re-arranjando a Equação 4.32, obtêm-se:

$$\frac{dC}{dt} = zk_L a \left( C_S - \frac{Q_{O_2} X}{zk_L a} \right) - zk_L a C \quad (4.36)$$

Introduzindo a Equação 4.35 na Equação 4.36, fica-se com:

$$\frac{dC}{dt} = zk_L a (C_0 - C) \quad (4.37)$$

A integração da Equação 4.37, onde para o instante inicial de retomada da aeração  $t = t_1$  tem-se  $C = C_{01}$ , fornece:

$$\ln \left( \frac{C_0 - C}{C_0 - C_{01}} \right) = -zk_L a (t - t_1) \quad (4.38)$$

Então, locando-se  $C = f(t)$ , conforme a Equação 4.38, obteve-se uma reta cujo coeficiente angular forneceu o valor de  $k_L a$ .

#### 4.8.3.1 Correção do $k_L a$ e $Q_{O_2}$ em função do atraso na resposta do eletrodo

Pela mesma razão apresentada no item 4.7.6.3, poderá ser necessária a correção do  $k_L a$  e da  $Q_{O_2}$ , neste caso na presença do fungo. Isso pode ser realizado, seguindo novamente o procedimento de Schmidell (2001). Retomando à Equação 4.34 e fazendo-se  $t_0 = 0$  (instante inicial da interrupção da aeração), e introduzindo o valor de  $C$  na Equação 4.13, fica-se com:

$$\frac{dC_p}{dt} = k_p (C_0 - Q_{O_2} X \cdot t - C_p) \quad (4.39)$$

Que após integração fornece:

$$C_p = C_0 - Q_{O_2} X \left( t - \frac{1}{k_p} + \frac{1}{k_p \cdot e^{k_p t}} \right) \quad (4.40)$$

Onde:  $C_0 = C_{P0}$  = concentração de  $O_2$  antes da interrupção da aeração, coincidente com o sinal do eletrodo.

Ajustando-se a Equação 4.40 aos dados experimentais ( $C_p = f(t)$ ), obtêm-se o valor correto de  $Q_{O_2}$ . Analogamente, para a correção  $k_L a$  levando em conta o atraso do sensor, retoma-se a Equação 4.37 e integra-se a partir de um instante  $t_2$  (atraso), cuja concentração de oxigênio dissolvido é  $C_{02}$ , resultando em:

$$C = C_0 - (C_0 - C_{O_2})e^{-zk_L at} \quad (4.41)$$

A substituição deste valor de C na Equação 4.13, e a integração da equação resultante fornecem:

$$C_p = C_{pO_2} e^{-k_p t} + C_0 (1 - e^{-k_p t}) + \frac{k_p (C_0 - C_{O_2})}{k_p - zk_L a} (e^{-k_p t} - e^{-zk_L at}) \quad (4.42)$$

Onde:  $C_{pO_2}$  = sinal do eletrodo no instante  $t_2 = 0$  considerado para integração  
 $C_{O_2}$  = concentração real de  $O_2$  no instante  $t_2 = 0$ .

Ajustando-se a Equação 4.42 aos dados experimentais ( $C_p = f(t)$ ), obtém-se o valor correto de  $k_L a$ .

#### 4.8.4 Concentração crítica de oxigênio

O valor da  $Q_{O_2}$ , para um determinado microrganismo é função da concentração de oxigênio dissolvido no meio líquido (C), seguindo um modelo tipo Monod (Figura 4.4-a).

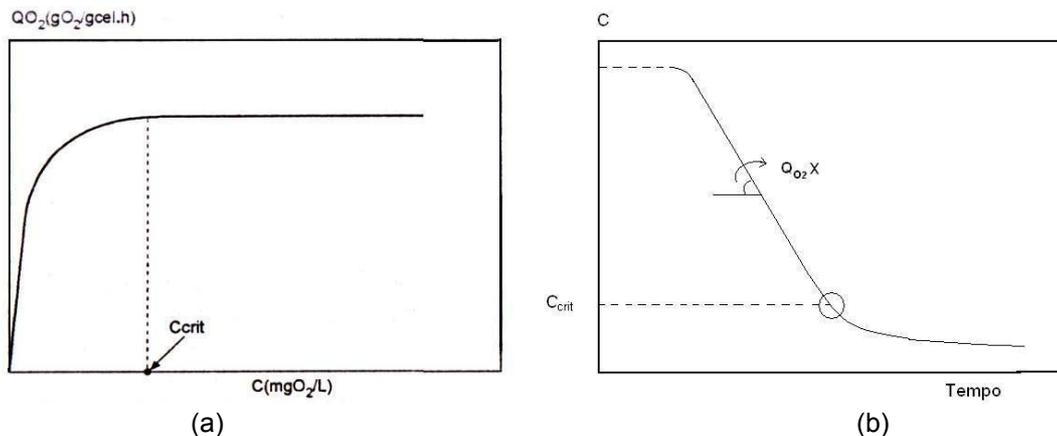


Figura 4.4 Modelo de Monod para o crescimento microbiano (a). Ilustração para explicar a determinação do  $C_{crit}$  com a utilização de um sensor de oxigênio dissolvido (b).

Nessa figura observa-se que abaixo de uma determinada concentração de oxigênio dissolvido, denominada de concentração crítica ( $C_{crit}$ ), a velocidade específica de respiração passa a ser limitada e, conseqüentemente, o crescimento celular. O  $C_{crit}$  foi determinado interrompendo-se a aeração em determinado momento do cultivo e anotando-se a queda do oxigênio lido pelo sensor (Figura 4.4b). Como a biomassa é considerada constante durante o curto tempo de realização do ensaio, a velocidade de respiração também permanece constante, enquanto houver oxigênio suficiente. A partir de certo ponto a concentração de oxigênio

dissolvido torna-se insuficiente e o momento que têm início a diminuição da velocidade de respiração revela o ponto crítico.

#### 4.8.5 Coeficiente de manutenção e fator de conversão de oxigênio para células

Microrganismos com alta velocidade específica de crescimento ( $\mu_x$ ) devem apresentar alta velocidade específica de respiração ( $Q_{O_2}$ ) (SCHMIDELL, 2001). Pirt (1975) sugeriu uma relação linear para relacionar as velocidades:

$$Q_{O_2} = m_O + \frac{1}{y_O} \mu_x \quad (4.43)$$

Onde:  $m_O$  = coeficiente de manutenção para o oxigênio ( $\text{mgO}_2 \cdot \text{g}_{\text{cel}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ )  
 $y_O$  = fator de conversão de oxigênio para células ( $\text{g}_{\text{cel}} \cdot \text{gO}_2^{-1}$ )

O coeficiente de manutenção ( $m_O$ ) significa a velocidade específica de respiração para  $\mu_x = 0$ , ou seja, a velocidade específica de consumo de  $O_2$  para manter as células viáveis. Locando-se os dados de  $Q_{O_2}$  em função de  $\mu_x$ , obteve-se o valor de  $m_O$  e  $y_O$  por meio do coeficiente linear e coeficiente angular da reta de ajuste obtida, respectivamente.

#### 4.9 Biorreatores utilizados

Foram utilizados dois biorreatores *airlift* com circulação externa. Um biorreator de volume útil de 2,3 L, construído anteriormente em vidro borossilicato (ROSSI, 2001), e o outro, construído durante a condução deste trabalho, com volume útil de 5 L, em aço inoxidável (Figura 4.5). Ambos possuíam aproximadamente as mesmas relações do biorreator projetado por Pedrini (1997), que correspondia especificamente a um biorreator *airlift* de circulação externa.

Como dispersor de ar na base do *riser* foi utilizado uma pedra porosa, do mesmo tipo utilizado em aquários, da qual foi substituída a peça plástica de acoplamento por uma peça semelhante em aço inox. Um bolhometro com dimensões apropriadas foi utilizado para medir a vazão de ar, e um banho termostaticado para controlar a temperatura do meio de cultura através de um trocador de calor no *downcomer*. O ar de entrada, proveniente de uma linha de ar comprimido, foi filtrado utilizando-se membranas de PTFE (teflon) da Millipore® com poros de  $\varnothing = 0,2 \mu\text{m}$ , hidrofóbicas e de diâmetro  $\varnothing = 50 \text{ mm}$ . Os gases de saída foram filtrados utilizando um cartucho de algodão para o biorreator em vidro, e um cartucho de lã de vidro para o biorreator em aço inox. A lã de vidro foi utilizada para permitir a esterilização do filtro pela passagem de vapor e, posteriormente, secagem pela passagem de ar.

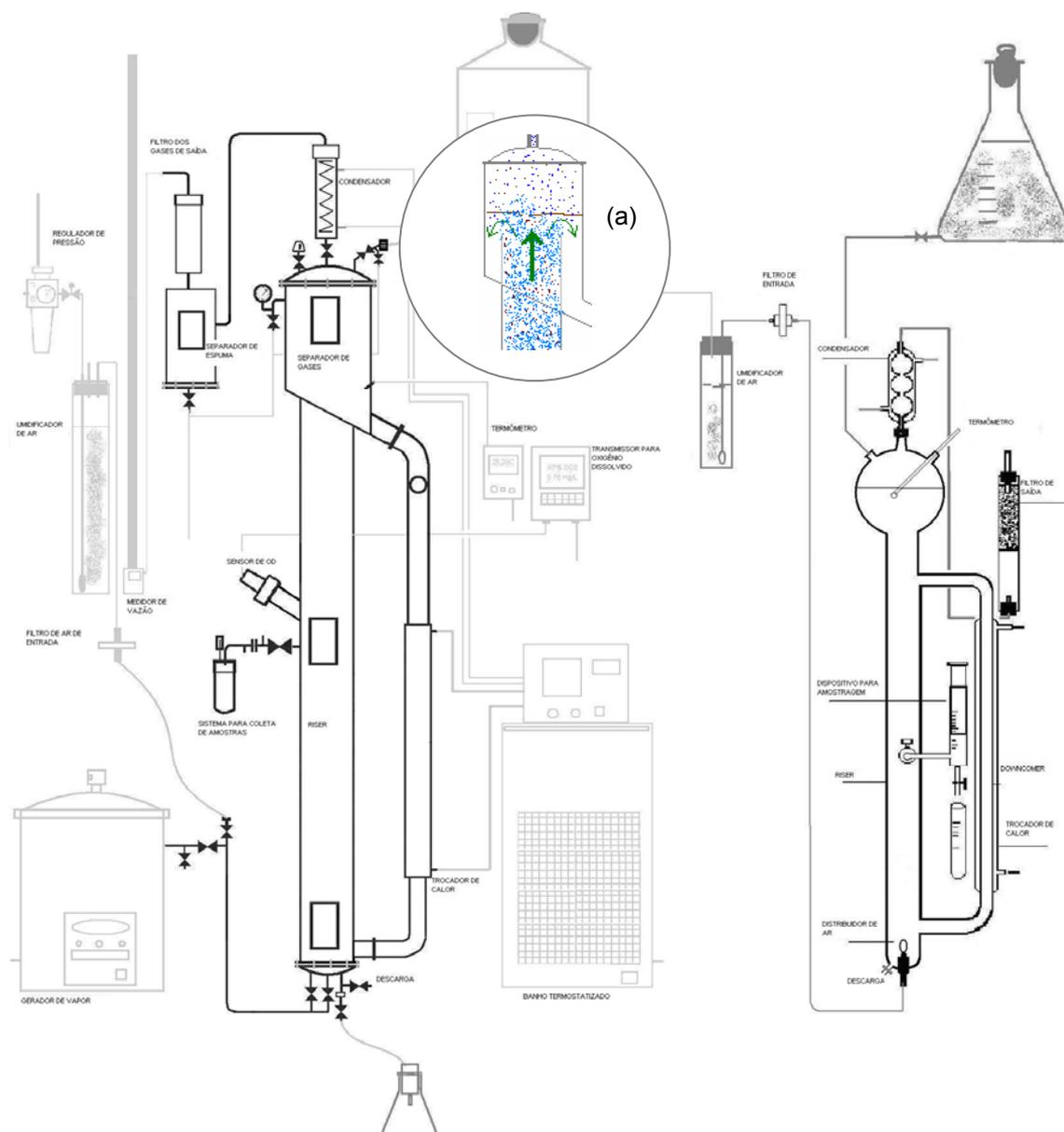


Figura 4.5 Esquema dos biorreatores construídos em aço inox (esquerda) e em vidro borossilicato (direita), com seus respectivos equipamentos acessórios (cinza). Detalhe (a): modificação feita no separador de gás.

#### 4.9.1 Construção do biorreator em aço inoxidável

O biorreator de 5 litros de capacidade foi totalmente construído com tecnologia local e com orçamento limitado em cerca 3 mil reais. Foi utilizado em sua construção aço austenítico (máximo de 0,08% de carbono), preferido para aplicações em biotecnologia, onde se utilizam meios corrosivos e precisam-se suportar temperaturas elevadas de esterilização (acima de 125 °C) e pressões de 1,5 atm, com a soldagem das peças realizada com sistema TIG. Todas as conexões foram construídas em aço inox, com as juntas rosqueadas vedadas com fita PTFE e as juntas planas seladas com *O-rings* elásticos e incompressíveis, posicionados axialmente. O

*downcomer* foi construído com dois flanges rosqueáveis e com *O-rings*, de forma a poder removê-lo para facilitar a limpeza.

Linhas de alimentação, retirada de amostras, descarga de material, entrada de ar e vapor e saída de gases foram construídas com selos de vapor, com a entrada utilizando engate rápido, e a saída para drenagem do condensado, após a união, utilizando uma válvula. As válvulas utilizadas foram do tipo esfera de  $\varnothing = 6,4$  mm, e do tipo agulha, de uso em sistemas de ar comprimido.

Foram construídos três visores retangulares, posicionados para observar o distribuidor de ar, o sensor de OD e o conduto de amostragem, e o separador de gás. Um visor cilíndrico foi posicionado após a curva de 45 graus do *downcomer*, para observar a ocorrência de entrada de gás e as condições de escoamento. Os visores eram de vidro comum de 4 mm de espessura, instalados longitudinalmente e selados através de recortes retangulares de borracha de 1,5 mm de espessura, exceto para o visor cilíndrico em que foram utilizados *O-rings*. Apesar de prejudicarem a circulação de líquido e representarem riscos de contaminação ao cultivo, os visores foram necessários para verificar as modificações fisiológicas no crescimento da cultura e a formação de espuma no topo do biorreator.

A principal modificação no projeto diz respeito ao desenho do topo do biorreator (Figura 4.1), onde, para separar melhor o gás do líquido o *riser*, prolongou-se além da entrada do *downcomer*. Além disso, a ampliação do diâmetro do *riser* no topo diminui a velocidade de retorno do líquido nessa região, impedindo o arraste de bolhas para o *downcomer*. A junção entre o *riser* e o *downcomer* foi construída num ângulo de 45° para diminuir o atrito e aumentar a velocidade de circulação de líquido.

Para medidas de oxigênio dissolvido, foi utilizado um eletrodo polarográfico esterilizável, modelo da série InPro6000, com transmissor modelo 4100e da Mettler Toledo, posicionado na metade da altura da coluna líquida. O sensor foi instalado numa porta inclinada a 45° devido à presença de eletrólito no corpo do eletrodo, com vedação realizada através de dois *O-rings* posicionados axial e radialmente, e com inserção mínima no *riser* de modo a não interferir na circulação do líquido. A calibração foi realizada seguindo as instruções do fabricante.

A saída dos gases foi protegida através de um cartucho com lã de vidro ( $0,10 \text{ g.cm}^{-3}$ ), para evitar que eventuais refluxos de ar, como na retirada de amostras, contaminassem o cultivo. Após a montagem, o biorreator foi submetido a testes de estanqueidade com pressões de 1,5 e 2 atm utilizando ar comprimido. Também foram realizados testes de esterilização e funcionamento durante 20 dias com meio de cultura não inoculado. Nesse período várias intervenções foram realizadas, como coleta de amostras, adição de produtos, desligamento da aeração, variação na vazão de ar, e testes com o trocador de calor na manutenção da temperatura. Após todos os testes, o biorreator foi submetido a estudos hidrodinâmicos, de transferência de oxigênio e cultivos diversos.

As relações de medidas do biorreator construído em aço, e do biorreator de vidro já existente, estão apresentadas no Quadro 4.4.

Parâmetro	un	Biorreator de vidro	Biorreator de aço
Diâmetro interno do <i>riser</i> (D)	mm	57	73
Diâmetro interno do <i>downcomer</i>	mm	20	24
Diâmetro interno separador de gás	mm	125	125
Altura do <i>riser</i> (H)	m	0,66	0,91
Altura do <i>downcomer</i>	m	0,56	0,79
Razão altura/diâmetro (H/D)	-	11,6	12,5
Razão área <i>downcomer/riser</i> ( $A_d/A_r$ )	-	0,12	0,11
$L_{cp}$	cm	11	13
Área do trocador de calor	cm <sup>2</sup>	251	328
Posição do sensor de OD	-	-	½ H
Posição do amostrador	-	½ H	½ H
Volume do separador de gás	L	-	0,84
Volume <i>downcomer</i>	L	0,18	0,36
Volume <i>riser</i>	L	2,12	3,80
Volume útil	L	2,3	5,00

Quadro 4.4 Dados de projeto utilizados na construção dos biorreatores.

Na definição do volume do biorreator, foram considerados vários aspectos, como a dificuldade de se trabalhar em bancada com grandes volumes de meio e o custo dos reagentes, o tamanho das válvulas disponíveis nas ferragens locais e os padrões de diâmetros de tubos existentes no mercado de modo a reduzir o custo de construção do *riser* e *downcomer*.

Outra questão esteve relacionada com a obtenção das curvas de biomassa, que devido à morfologia dos fungos filamentosos, onde podem se formar *pellets* até maiores que 4 mm, ocorrem dificuldades na distribuição e amostragem da biomassa. A dificuldade em se obter correlações para sua determinação (ROSSI, 2001), levou-se a considerar a utilização de balanço estequiométrico para essa finalidade. Entretanto, essa alternativa também não se revelou viável (APÊNDICE B). Assim, esse problema foi resolvido no dimensionamento do novo biorreator, que permitiu um maior volume de amostra e dutos de linhas que permitissem a passagem dos *pellets* de até 6 mm, fornecendo amostras mais homogêneas e representativas.

Também se considerou a biomassa potencialmente produzida nesse volume e a sua adequabilidade para produzir lotes de inoculantes suficientes para inocular um grande número de mudas em viveiros (mais de 25 mil mudas por batelada), podendo, para esta aplicação, ter caráter de um biorreator piloto.

#### 4.9.2 Estudos Hidrodinâmicos

Os estudos de transferência de oxigênio foram realizados no biorreator de 5 litros, que foi desenvolvido principalmente para esse propósito. Para a determinação correta da concentração

de oxigênio dissolvido foi necessária a manutenção de uma vazão de ar constante, pois a vazão de ar influencia no gás *holdup*, densidade do meio, e pressão interna devido à perda de carga no filtro de saída, e, conseqüentemente, na calibração do sensor de OD. ). Na caracterização hidrodinâmica do biorreator, o meio de cultura foi simulado com uma solução de 0,15 M de NaCl.

#### 4.9.2.1 Vazão de ar e gás *holdup*

A vazão de ar foi medida com a utilização de um bolhometro construído com um tubo de vidro e plástico PVC com as seguintes dimensões:  $\varnothing = 1,72$  cm,  $A = 2,32$  cm<sup>2</sup>,  $H = 95$  cm e  $V = 0,22$  L. As medidas foram realizadas utilizando o tempo necessário para o volume do tubo ser preenchido com os gases da saída do biorreator, o qual foi controlado através do deslocamento de uma bolha de sabão ao longo do tubo de vidro. Para a caracterização hidrodinâmica do biorreator, foi utilizada uma faixa de vazão específica de ar de 0,04 a 1,00 vvm (Quadro 4.5). Entretanto, para os cultivos foram estabelecidos três valores de vazão de ar, sendo a menor utilizada (0,20 vvm) a mínima necessária para uma boa mistura e manutenção da biomassa em suspensão durante o cultivo. A maior vazão (0,52 vvm) foi limitada pela forte turbulência gerada na área de desgasagem no topo do *riser*, e que provocava muita geração de espuma e arraste de material pela saída de gases. Também foi utilizada uma vazão média (0,36 vvm).

O gás *holdup* pode ser determinado através do método da expansão do volume (CHISTI, 1989), onde se utiliza a medida da altura da coluna de líquido estático no biorreator e da altura da dispersão gás-líquido sob aeração. Entretanto, como no biorreator deste estudo ocorre variação do diâmetro da coluna de líquido entre o *riser* e o separador de gás, o gás *holdup* foi medido através da retirada de volume de líquido sob aeração até atingir o nível do líquido antes da aeração. O volume de líquido equivalente à expansão ( $V_E$ ) foi medido com utilização de uma proveta e utilizado para o seguinte cálculo:

$$\varepsilon = \frac{V_E}{V_D} \quad (4.44)$$

Onde:  $\varepsilon$  = gás *holdup* (-)

$V_E$  = aumento do volume de líquido pela expansão do gás (L)

$V_D$  = volume da dispersão gás-líquido (L)

Esse método não permite a determinação do gás *holdup* individualmente no *riser* e no *downcomer*, tendo sido necessário recorrer a outros métodos, como o manométrico, para esse fim. Neste trabalho somente foi determinado o gás *holdup* total, que é equivalente ao gás *holdup* no *riser* quando a eficiência do separador de gás for alta.

Tempo de ascensão da bolha no bolhometro (s)	Vazão de ar	
	(L.min <sup>-1</sup> )	(vvm)
66,0	0,2	0,04
22,0	0,6	0,12
13,2	<b>1,0</b>	<b>0,20</b>
9,4	1,4	0,28
7,3	<b>1,8</b>	<b>0,36</b>
6,0	2,2	0,44
5,1	<b>2,6</b>	<b>0,52</b>
4,4	3,0	0,60
3,9	3,4	0,68
3,5	3,8	0,76
3,1	4,2	0,84
2,9	4,6	0,92
2,6	5,0	1,00

Quadro 4.5 Vazões de aeração para caracterização hidrodinâmica do biorreator *airlift* de 5 L. Os valores em destaque foram estabelecidos para os estudos de transferência de massa.

#### 4.9.2.2 Velocidade de circulação de líquido

A circulação do líquido em biorreatores *airlift* é devida à diferença de densidade do fluido entre o *riser* e o *downcomer*. O fluido circula ao longo de um caminho bem definido: subindo pelo *riser* e descendo pelo *downcomer*. A velocidade média de circulação ( $\bar{U}_{Lc}$ ) é definida (BLENKE, 1979) como:

$$\bar{U}_{Lc} = \frac{x_c}{t_c} \quad (4.45)$$

Onde:  $x_c$  = distância percorrida por um traçador durante uma circulação completa (m)  
 $t_c$  = tempo médio para uma circulação completa (s)

Técnicas utilizando traçadores têm sido utilizadas para determinar a velocidade média de circulação (BELLO *et al.*, 1984). Devido às variações de diâmetro entre o *riser* e o *downcomer*, os valores da velocidade superficial medida no *downcomer* ( $U_{Ld}$ ) ou no *riser* ( $U_{Lr}$ ) são mais expressivos, e o critério da continuidade pode ser utilizado para relacioná-las:

$$U_{Lr}A_r = U_{Ld}A_d \quad (4.46)$$

Onde:  $A_r$  = área da seção transversal do *riser* (cm<sup>2</sup>)  
 $A_d$  = área da seção transversal do *downcomer* (cm<sup>2</sup>)

Apesar de as técnicas que utilizam traçadores serem bastante precisas e relativamente simples (CHISTI, 1989; PEDRINI, 1997), utilizou-se neste trabalho uma esfera com densidade de aproximadamente  $1 \text{ g.cm}^{-3}$  (massa específica do líquido no *downcomer*), construída com poliestireno e massa epóxi, suspensa livremente no líquido. Nessa técnica, utilizada anteriormente por Kawase e Moo-Young (1986), foi medido o tempo necessário para a esfera percorrer a distância completa do *downcomer* para as diversas vazões de ar estabelecidas no Quadro 4.5, obtendo-se assim a velocidade superficial do líquido no *downcomer* para cada vazão de ar, em três repetições. A Equação 4.45 foi utilizada para se obter a velocidade superficial do líquido no *riser*.

#### 4.9.2.3 Tempo de mistura

Um bom índice qualitativo da mistura é representado pelo tempo de mistura, que é definido como o tempo para o biorreator alcançar um novo estado estacionário, após uma mudança na alimentação. Existem vários métodos para determinar o tempo de mistura, utilizando o calor, a condutância, o pH, além de corantes. Numa breve revisão, Fu *et al.* (2003), apresentam as vantagens da técnica que utiliza calor em relação às demais. Com o auxílio dessa técnica, água quente foi introduzida pelo topo do biorreator para servir como traçador. Foram utilizados termômetros digitais idênticos para medir a temperatura no topo e na base do biorreator, registrando-se os valores simultaneamente dos dois termômetros, até o momento em que as temperaturas se igualaram, obtendo-se, assim, o tempo de mistura. O atraso na resposta do sensor de temperatura (item 4.7.6.4) foi considerado nessa determinação.

#### 4.9.2.4 Coeficiente de atrito

Um balanço de energia em biorreator *airlift* fornece a Equação 4.47 que permite prever a velocidade do líquido, onde se considera que para os biorreatores com circulação externa as perdas de energia no topo e na base, devido ao atrito nas conexões entre o *riser* e o *downcomer*, sejam iguais em função da similaridade geométrica (CHISTI, 1989).

$$U_{Lr} = \left[ \frac{2gh_D(\varepsilon_r - \varepsilon_d)}{K_B \left( \frac{1}{(1-\varepsilon_r)^2} + \left( \frac{A_r}{A_d} \right)^2 \cdot \frac{1}{(1-\varepsilon_d)^2} \right)} \right]^{0,5} \quad (4.47)$$

Onde:  $\varepsilon_r$  = gás holdup no riser (-)  
 $\varepsilon_d$  = gás holdup no downcomer (-)  
 $g$  = aceleração devido à gravidade ( $\text{m.s}^{-2}$ )  
 $h_D$  = altura da dispersão gás-líquido (m)  
 $K_B$  = coeficiente de atrito (-)

A determinação do coeficiente de atrito foi realizada utilizando-se a Equação 4.47 e os dados experimentais de velocidade do líquido e do gás *holdup*, através da obtenção do coeficiente angular representado por  $(1/K_B)^{0.5}$  (PEDRINI *et al.*, 1996).

#### 4.9.2.5 Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio

A metodologia para determinação desse parâmetro é apresentada no item 4.8.2.1, e sua correção, em função do atraso no tempo de resposta do eletrodo, é apresentada no item 4.8.2.2.

#### 4.9.2.6 Determinação da pressão no topo do biorreator

Devido à perda de carga no filtro de saída dos gases do biorreator, e a conseqüente pressurização com efeitos sobre a resposta do sensor, avaliou-se a pressão formada no topo do biorreator para ter-se um elemento a mais para interpretações. A pressão foi determinada, para as diversas vazões de ar, com a utilização de um manômetro em U com água, instalado no topo do biorreator (Figura 4.6), sendo seu valor obtido pela equação:

$$P = \rho g h + P_{atm} \quad (4.48)$$

Onde:  $P$  = pressão (bar)  
 $P_{atm}$  = pressão atmosférica (bar)  
 $h$  = altura da coluna de líquido do manômetro (m)  
 $\rho$  = massa específica ( $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ )

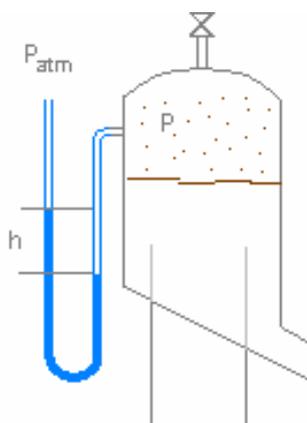


Figura 4.6 Esquema do manômetro em U instalado no biorreator para determinação da pressão formada no topo devido à perda de carga no filtro de saída de gases.

## 4.10 Produção dos inoculantes em biorreator

### 4.10.1 Preparação do inóculo

Para cultivos em biorreator, foram utilizadas suspensões micelianas obtidas a partir de culturas em meio líquido em frascos (10 a 18 dias de idade), ou de outros cultivos em biorreator. Para isso, o micélio foi fragmentado em solução salina (0,85% NaCl) em liquidificador durante 10 a 20 segundos e a suspensão recebeu 0,2 a 0,3% de carvão ativo neutralizado. Utilizaram-se cerca de 250 mL de suspensão para inocular 2,1 L de meio de cultura e 350 mL para 4,7 L, relativos aos volumes dos dois biorreatores, buscando-se, sempre que possível, uma concentração inicial de biomassa ( $X_0$ ) mínima de  $0,25 \text{ g.L}^{-1}$ . A metodologia está sintetizada na Figura 4.7.

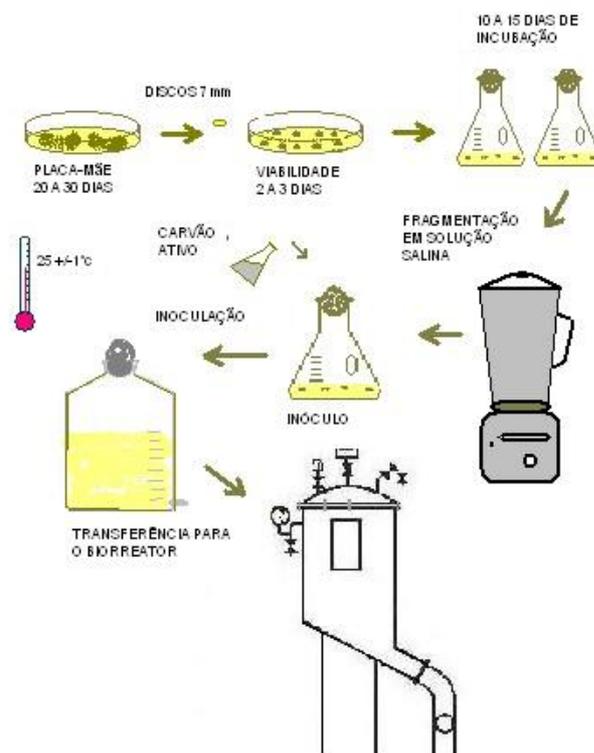


Figura 4.7 Metodologia para preparação de inóculo.

### 4.10.2 Cultivo em biorreator e estudos cinéticos

Os isolados fúngicos foram cultivados em biorreator *airlift*, nas condições descritas no item 4.3, sob pressão atmosférica e, também, sob pressão de 1,2 atm utilizando-se meios de cultura com base no MNM e PGK. A inoculação foi realizada em capela de fluxo laminar e a

transferência do meio já inoculado para o biorreator foi realizada por meio de conexões assépticas. Após a transferência, a vazão de ar foi ajustada (*cf.* item 4.9.2.1) e o meio foi aerado durante 20 min. (APÊNDICE C) para saturação com oxigênio e polarização do eletrodo. Uma vez estabilizada a temperatura, o eletrodo foi calibrado no ponto de saturação através do painel do transmissor e uma amostra inicial do cultivo foi retirada para determinação de  $X_0$ . Ocasionalmente, essa amostra foi retirada assepticamente para o controle microbiológico da pureza da cultura.

O cultivo foi monitorado diariamente com relação à variação da vazão causada por flutuações da pressão na linha de ar comprimido, com relação à temperatura, pois o sistema de controle obedece ao *set point* do banho termostaticado, e com relação à formação de espuma e visualização do crescimento. A decisão sobre a coleta de amostra foi tomada em função do progresso do cultivo, sendo o período mais espaçado no início (4, 3 ou 2 dias), tornando-se diário com o aumento progressivo da biomassa. Na fase final retirou-se mais de uma amostra no mesmo dia. Como já foi tratado no item 4.9.2, a vazão de ar foi mantida constante durante um cultivo e, quando do momento da retirada de uma amostra, poderia ser realizado um ensaio dinâmico para determinação de  $k_L a$  e  $Q_{O_2} X$ . Na amostra, determinaram-se, principalmente, o pH, a glicose residual, a biomassa e a coloração. Os valores de S e X permitiram determinar  $Y_{X/S}$ ,  $\mu_X$  e  $Q_{O_2}$ . O cultivo foi conduzido até que os substratos em maiores concentrações (glicose, nitrato, fosfato) fossem totalmente consumidos, fornecendo, dessa forma, alto rendimento.

#### 4.10.3 Inoculante para estudos de viabilidade e eficiência

A biomassa dos isolados fúngicos produzida em cultura líquida foi veiculada em gel de alginato de cálcio (MAUPÉRIN *et al.*, 1987). A metodologia utilizada no preparo do inoculante está representada na Figura 4.8. Todas as operações, desde a retirada da biomassa do biorreator até o encapsulamento, foram realizadas assepticamente.

*Pellets* de micélio, com aproximadamente 10 g de biomassa fresca, ou cerca de 0,5 g seca, foram fragmentados em 250 mL de solução salina em liquidificador durante 10 a 20 segundos. A suspensão resultante recebeu carvão ativo na proporção de 0,1 a 0,4%, conforme o isolado. Uma parte dessa suspensão (100 mL) foi separada para testes de viabilidade ao longo do período de armazenamento. Igual volume da mesma suspensão miceliana (150 mL) e de solução estéril de alginato de sódio (2%), foram misturados em agitador magnético. Essa mistura foi gotejada, sob agitação constante, em uma solução 0,6 M de  $CaCl_2$  para polimerização e formação de cápsulas de aproximadamente 4 mm, de gel de alginato de cálcio. O tempo necessário para polimerização completa foi de cerca de 30 min., durante o qual ocorreu uma diminuição de 40-45% do volume das cápsulas, fazendo com que precipitassem na solução em função do aumento da densidade.

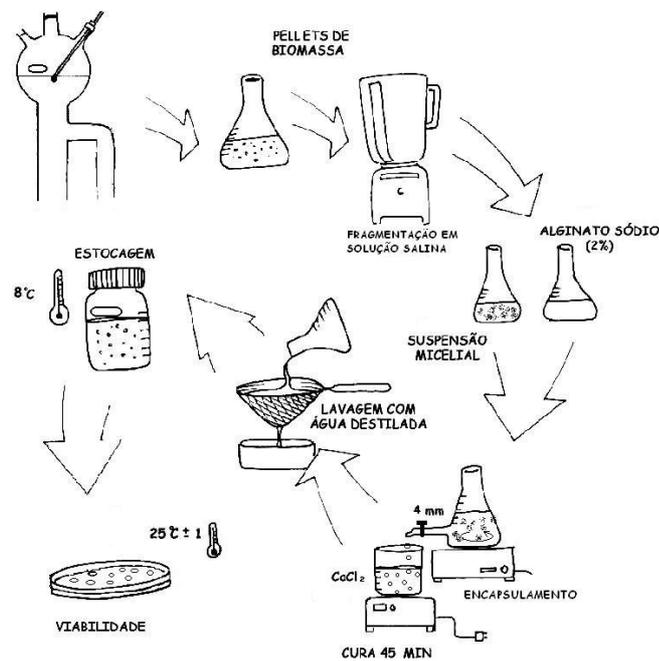


Figura 4.8 Metodologia de preparação de inoculante para estudos de viabilidade e eficiência.

Após a polimerização, as cápsulas foram brevemente lavadas e, em seguida, colocadas durante 2 min. com água destilada esterilizada (num total de 400 mL) para remoção de cloretos residuais, e armazenadas a 8 °C em solução salina em frascos hermeticamente fechados. Essas cápsulas foram testadas periodicamente quanto à sua viabilidade em meio de cultura sólido em placas de Petri, e utilizadas em testes de infectividade e eficiência em plantas. A viabilidade foi acompanhada por um período mínimo de 6 meses.

#### 4.10.4 Estudos de viabilidade

##### 4.10.4.1 Viabilidade dos inoculantes em meio de cultura

Para isso, cerca de 50 cápsulas de cada isolado foram colocadas sobre meio sólido em placas numa incubadora tipo BOD. A cada dois dias, por um período de até duas semanas, as placas foram observadas sob lupa binocular para verificar o crescimento de hifas a partir das cápsulas. Esse teste foi feito com um intervalo de 20 e 30 dias, dependendo do isolado.

Com exceção de alguns isolados que foram testados, a título de experiência, por períodos maiores que 12 meses, a viabilidade foi avaliada dentro de um período limite de 6 meses, prazo de viabilidade exigido pela legislação para inoculantes de uso agrícola. A resposta obtida foi o percentual de cápsulas com viabilidade em função do tempo de armazenamento.

#### 4.10.4.2 Viabilidade dos inoculantes em substrato de plantio

Para avaliar a viabilidade dos inoculantes no substrato de plantio, foram preparadas placas de Petri com 30 mL de substrato turfa:vermiculita (1:4) umedecido com água destilada (25% v/v), suficiente para a agregação e para formar uma camada plana compacta. Esse material foi esterilizado em autoclave e, em seguida, foram colocadas 10 cápsulas de inoculante por placa, distribuídas uniformemente e colocadas em incubadora. Dentro de um período de até três semanas observou-se a ocorrência de germinação de hifas, onde anotou-se o percentual de viabilidade nessas condições.

#### 4.10.4.3 Viabilidade dos inoculantes na presença de plantas

Para esse teste, sementes de plantas (eucalipto ou pínus) foram desinfetadas conforme descrito no item 4.4 e secadas em papel filtro estéril. Essas sementes foram colocadas em 25 ml de meio de germinação<sup>4</sup> sólido (THOMSON *et al.*, 1994), a  $25\pm 1$  °C, em incubadora BOD durante 5 dias, na obscuridade. Em seguida, 7 plântulas foram inseridas em substrato turfa:vermiculita (1:3, v:v) em placa de Petri de 9 cm de forma que este ocupasse somente metade da placa para que houvesse espaço para o crescimento da planta. O substrato continha 25% de umidade (v/v) e havia sido previamente esterilizado. Abaixo de cada plântula foi inserida uma cápsula de inoculante (Figura 4.9).

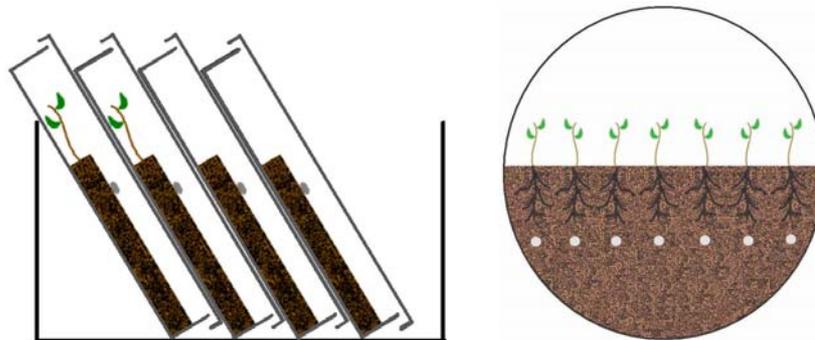


Figura 4.9 Dispositivo para estudos *in vitro* do efeito das plantas na germinação das cápsulas de inoculante.

Para efeito de comparação, foram preparadas 3 placas contendo cápsulas e plantas e 3 placas contendo somente cápsulas. A metade inferior de todas as placas foi coberta com papel alumínio para proteger o micélio e as raízes da luz direta. Esse material foi mantido nas condições ambientes do laboratório. A viabilidade das cápsulas foi testada em meio de cultura MNM, imediatamente antes dos estudos com as plantas. Periodicamente, durante 90 dias as placas foram observadas para verificar a emissão de hifas.

<sup>4</sup> Glicose 2 g.L<sup>-1</sup>, CaSO<sub>4</sub>. 2H<sub>2</sub>O 0,068 g.L<sup>-1</sup>, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0,186 mg.L<sup>-1</sup>, ágar 9 g.L<sup>-1</sup> e pH 5,7.

Para pinus, as sementes foram previamente submetidas a um tratamento de quebra de dormência que ocorreu em geladeira a 4 °C durante 30 dias. O experimento foi feito em placas de Petri maiores, com 15 cm de diâmetro.

#### 4.10.5 Efeito da composição do meio de cultura no pH e no crescimento dos fungos

Os fECM produzem muitos ácidos e alteram rapidamente as condições ideais do cultivo. Como não se dispunha de um sistema tipo ácido/base para controle do pH, buscou-se ajustar alguns componentes da formulação dos meios que exercessem efeito tamponante, de modo a se obter valores mais estáveis de pH sem inibir o aumento da biomassa. Alternativamente, testaram-se outros tampões como o fosfato e o acetato de sódio. Foram utilizados como modelo nesse estudo os isolados que apresentaram baixos valores para o pH final ou baixa velocidade de crescimento em cultivo estático.

Num experimento realizado em frascos (item 4.6), utilizando o isolado UFSC-Ch163, foram testadas modificações do meio PGKM diluído, conforme o Quadro 4.6. O pH inicial foi ajustado em 5,8 com uma solução equimolar de ácido cítrico e citrato de sódio.

NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> /Uréia: 05/05	Meio PGKM com 0,5 g.L <sup>-1</sup> de NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> e 0,5 g.L <sup>-1</sup> de uréia
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> /Uréia: 09/01	Meio PGKM com 0,9 g.L <sup>-1</sup> de NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> e 0,1 g.L <sup>-1</sup> de uréia
3PEP/1EM	Meio PGKM com 3 g.L <sup>-1</sup> de peptona e 1 g.L <sup>-1</sup> de extrato de malte
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> : 4x	Meio PGKM com 4 vezes mais fosfato mono e bi-básico

Quadro 4.6 Modificações do meio de cultura PGKM testadas em cultivo em meio líquido em frascos.

Num segundo experimento em frascos, utilizando-se os isolados UFSC-Sc42 e UFSC-Pt116, testaram-se 4 tampões preparados conforme descrito no APÊNDICE D. Para cada tratamento, foi utilizado apenas um tampão, sendo 40 mL.L<sup>-1</sup> para os tampões fosfato de K e Na, e 60 mL.L<sup>-1</sup> para os tampões citrato de Na e acetato de Na. Para os tratamentos com os tampões fosfato, o meio de cultura foi preparado sem a adição dos fosfatos da formulação.

### 4.11 Infectividade e eficiência de inoculante ectomicorrízico em relação à planta

#### 4.11.1 Forma de aplicação do inoculante

Para experimentos em condições de casa de vegetação com pequeno número de repetições, o inoculante foi aplicado individualmente em cada tubete e logo abaixo da semente. Diferentemente, a forma de aplicação do inoculante escolhida para utilização nos experimentos

em viveiros foi a simples mistura das cápsulas durante a preparação do composto utilizado como substrato. Para isso, realizou-se uma dosagem através da mistura manual de cápsulas em um substrato de uso tradicional em viveiros, constituído de casca de pínus compostada. Após a incorporação das cápsulas, amostras de 60 mL, equivalente ao volume de um tubete, foram retiradas, contando-se as cápsulas presentes. Aumentando-se progressivamente a quantidade de cápsulas adicionadas ao composto, obteve-se a dosagem de modo que num total de 25 amostras, 98% contiveram ao menos uma unidade. A dosagem foi expressa em cápsulas por litro (ou m<sup>3</sup>) de substrato.

#### 4.11.2 Tratamento das sementes

As sementes de *E. dunnii* foram fornecidas pela empresa RIGESA em 2002, sendo procedentes de coleta realizada no ano de 2000 na localidade de Três Barras - SC. Essas foram previamente desinfetadas conforme descrito no item 4.4 e postas a germinar em uma solução estéril de CaSO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O (0,068 g.L<sup>-1</sup>), H<sub>3</sub>B<sub>3</sub>O<sub>3</sub> (0,186 mg.L<sup>-1</sup>) e glicose (2 g.L<sup>-1</sup>), pH 5,7. A germinação ocorreu sob agitação durante 3 dias. Após esse período, foram retiradas da solução, lavadas em água destilada e transferidas para o substrato de plantio.

Para as sementes de *P. taeda*, foi realizada uma desinfecção com álcool (70%) durante 5 min. Antes do plantio foram submetidas à quebra de dormência conforme descrito no item 4.10.4.3. Essas sementes foram procedentes da região de Misiones na Argentina, onde a coleta foi realizada em abril de 2004, apresentando 92,12% de germinação.

#### 4.11.3. Experimentos em casa de vegetação

Esses estudos foram realizados na casa de vegetação do Depto. de Microbiologia e Parasitologia da UFSC e na casa de vegetação da Estação Experimental da EPAGRI, em Caçador-SC. Utilizou-se substrato esterilizado, constituído de uma mistura de turfa:vermiculita<sup>5</sup> (1:3, v:v), distribuído em tubetes cônicos de plástico PVC com 60 ml de volume. A esse substrato foram previamente incorporados 0,25 g.tubete<sup>-1</sup> de adubo<sup>6</sup> de liberação lenta (Osmocote<sup>®</sup>) com baixo teor de fósforo, equivalendo a 4 mg de P por planta. Para o pínus, também foi utilizada uma outra formulação de adubo (Nutricote<sup>®</sup>), na dosagem de 0,02 g.tubete<sup>-1</sup>. O primeiro produto continha, ainda, em sua formulação, micronutrientes. Após umidificação do substrato com água destilada e distribuição nos tubetes, foram adicionadas 4 a 5 cápsulas de inoculante por tubete à profundidade de 3 cm. Em seguida foi efetuado o plantio na proporção de 4-5 sementes de

<sup>5</sup> Vermiculita comercial de granulometria média.

<sup>6</sup> Composição em nutrientes: Osmocote 14-8-8 (N-P-K) e 2% de MgO, 0,15% de Fe, 0,06% de Mn, 0,05% Cu, 0,02% B, 0,02% Mo e 0,015% Zn; Nutricote 18-5-9 (N-P-K).

eucalipto pré-germinadas por tubete, colocadas cerca de 1 cm abaixo da superfície do substrato. Para o experimento com pínus foram utilizadas 2 sementes por tubete.

A viabilidade do inoculante foi confirmada previamente, observando-se o crescimento miceliano em meio de cultura MNM em placas a partir de uma amostra de 50 cápsulas. O tratamento testemunha (não inoculado) recebeu igual quantidade de cápsulas de alginato, sem micélio. Os tubetes foram colocados em bandejas e distribuídos ao acaso. Após 2 semanas, foi realizado o desbaste deixando-se somente uma planta por tubete. Foram feitas 10 repetições (plantas) por tratamento. No caso do experimento com pínus com duas adubações, foram preparadas cinco repetições para cada combinação adubo-dose de inoculante. Quando a montagem do experimento coincidiu com a época de inverno foi utilizada iluminação artificial para completar um fotoperíodo de 18 horas.

#### 4.11.4 Experimentos em viveiros

Nos estudos em viveiros foram adotados os procedimentos normais de rotina da empresa local, tomando-se somente o cuidado na manipulação, de utilizar luvas e utensílios desinfestados com álcool 70%, para evitar a contaminação entre os tratamentos. A inoculação foi realizada misturando-se uma dosagem (item 4.11.1) de cápsulas de inoculante em determinado volume de substrato, previamente umidificado.

Quando foram utilizados tubetes já usados, procedeu-se à desinfecção com solução de hipoclorito de sódio 1% durante 12 h. Nos casos em que o substrato foi desinfestado, utilizou-se a autoclavagem ou o fumigante comercial Dazomet<sup>®</sup> na dosagem de 17 mg.L<sup>-1</sup>. O tratamento fitossanitário foi realizado pela aplicação de 0,05% do fungicida não sistêmico Captan<sup>®</sup>, realizado na primeira irrigação por aspersão. O delineamento experimental consistiu de blocos casualizados, com 60 plantas por tratamento (3 fungos, 2 substratos ou doses, e testemunha) e 3 a 4 blocos, para cada espécie de planta, totalizando mais de 4 mil plantas em três experimentos.

#### 4.11.5 Condições experimentais e coleta dos dados

Em casa de vegetação as plantas foram mantidas sob condições controladas de temperatura (25±5 °C), durante um período de 120 dias, tendo a umidade do substrato sido assegurada pela adição diária de água destilada. Em viveiro, as plantas foram mantidas sob condições ambientais, permanecendo durante um período de 5 a 6 meses, onde foram diariamente irrigadas com água de torneira.

Para os experimentos em casa de vegetação, decorrido o período de crescimento, as plantas foram retiradas dos tubetes e o sistema radicular foi separado da parte aérea. Uma

amostra do sistema radicular foi conservada em solução FAA (5% formalina<sup>7</sup>, 5% ácido acético e 90% álcool) (KORMANIK e MCGRAW 1982) e utilizada para avaliar a colonização ectomicorrízica (Figura 4.10). A biomassa foi pesada após a secagem à temperatura de  $70 \pm 1^\circ\text{C}$ , até peso constante. Em seguida, a parte aérea foi utilizada para determinação do conteúdo de fósforo nos tecidos de acordo com Tedesco *et al.* (1995).

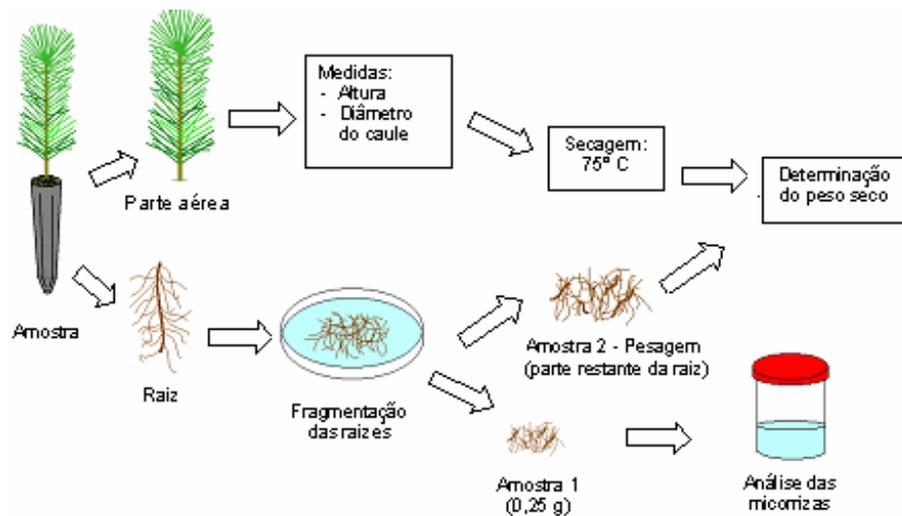


Figura 4.10 Metodologia para análise da infectividade e eficiência do inoculante em plantas.

Dos experimentos em casa de vegetação foram utilizadas 5 plantas de cada tratamento, das quais o sistema radicular foi examinado sob lupa binocular (10-30X) para estimar a intensidade de colonização micorrízica. Para isso, contou-se o número de pontas de raízes colonizadas (apresentando micorizas) num total de 500 pontas de raízes por planta, transformando-se os valores em porcentagem de colonização.

Para os experimentos em viveiros a avaliação da colonização radicular foi realizada utilizando uma escala arbitrária (GARBAYE, 1984). Examinaram-se as raízes da parte externa do torrão e atribuiu-se uma nota de acordo com a escala abaixo:

- 0 = sem colonização visível
- 1 = até 25% das raízes visíveis colonizadas
- 2 = 25 a 50% das raízes visíveis colonizadas
- 3 = 50 a 75% das raízes visíveis colonizadas
- 4 = 75 a 100% das raízes visíveis colonizadas

Também determinou-se o diâmetro do caule, a altura da planta e a matéria seca da parte aérea e raízes, o conteúdo de fósforo nos tecidos de amostras de 5 plantas para cada

<sup>7</sup> Solução de 35 a 40% de formol em água.

tratamento em cada bloco. As demais plantas foram transferidas para o campo e serão avaliadas anualmente quanto a sua sobrevivência e crescimento (altura e diâmetro) após transplântio.

#### 4.11.6 Avaliação dos resultados

Os dados de ambos os experimentos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), utilizando-se o programa Statgraphics®. Para a análise estatística, os dados de colonização ( $w$ ) foram transformados para  $(w)^{0,5}$ , ou  $(w+0,5)^{0,5}$ , ou ainda  $\arcsen(w+0,5)^{0,5}$ .

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O desenvolvimento de tecnologia para a produção de inoculantes de fungos ectomicorrízicos é fator chave para o uso da tecnologia de inoculação micorrízica. Neste tópico são discutidos os resultados obtidos visando esse objetivo, e a apresentação seguirá a mesma ordenação anterior. Alguns dos resultados apresentados, e outros que foram suprimidos devido ao grande volume de informações, foram publicados na forma de resumos ou artigos, sendo referenciados ao longo do texto.

### 5.1 Estudos preliminares

Esses estudos foram importantes para testar e adaptar diversas metodologias, além da determinação de parâmetros. Também serviram para avaliar a veiculação dos inoculantes produzidos e realizar prospecções com relação ao crescimento dos isolados em meio líquido, verificando o pH, consumo de glicose, tempo de cultivo, produção de pigmentos, entre outras. Uma descoberta notável esteve relacionada com a manutenção e expressão da viabilidade dos fungos, etapa importante deste trabalho, que abriu espaço para uma nova proposta de Tese.

A questão relacionada com a preparação do inóculo para cultivo já foi abordada anteriormente e permanecem nessa metodologia os mesmos procedimentos de Rossi (2001). Uma nova observação diz respeito à questão de como a fragmentação e o estado fisiológico do fungo podem interferir na velocidade de crescimento.

#### 5.1.1 Viabilidade do inoculante produzido pelo sistema tradicional - FES

A Figura 5.1 apresenta os inoculantes produzidos pelo método tradicional de fermentação no estado sólido (FES), em frascos tipo conserva, durante dois meses. Além de determinar a viabilidade desse tipo de inoculante em relação ao tempo de armazenamento, esse estudo serviu para avaliar as dificuldades relacionadas ao processo FES.

Além de ser muito lento, favorecendo as contaminações microbianas, o processo FES em frascos ou sacos revelou um nível maior de dificuldade prática em relação ao cultivo submerso. A etapa de lavagem do micélio foi delicada, com alto risco de contaminação, além da perda de biomassa. Outro ponto negativo observado nessa etapa foi a separação de grande parte das partículas de turfa perdendo-se, juntamente com elas, quantidades significativas de

biomassa. Entretanto, a lavagem revelou um ponto importante para a conservação da viabilidade, que foi uma melhor distribuição da umidade.

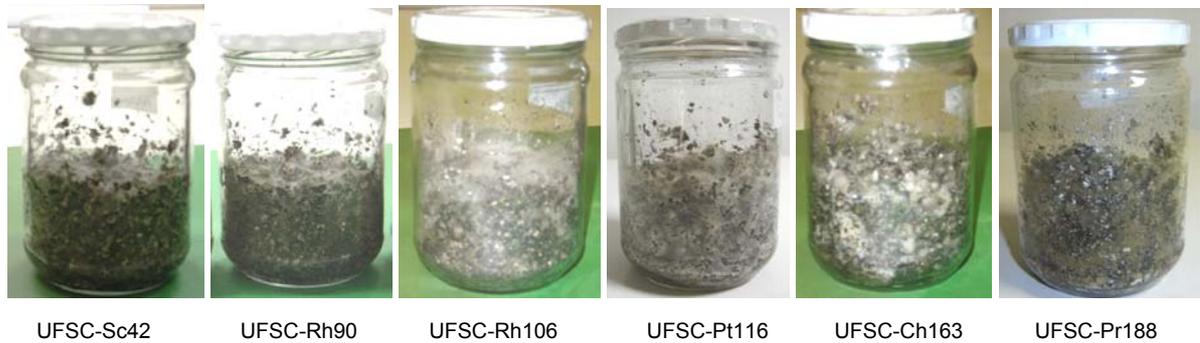


Figura 5.1 Aspecto dos inoculantes de fungos ectomicorrízicos produzidos pelo processo FES, em frascos tipo conserva. A incubação foi feita em incubadora BOD, a  $25\pm 1$  °C, durante dois meses, na obscuridade.

Foi observada uma grande variação na umidade desses inoculantes quando não lavados, com conseqüente perda da viabilidade. Entretanto, a lavagem, embora favorável quanto à manutenção da umidade do inoculante, pode promover uma remoção excessiva do micélio, dependendo da morfologia de cada fungo e do grau de fixação no substrato. Na Figura 5.2 é apresentado um dos inoculantes após lavagem onde se pode observar que o micélio já não é mais visível na superfície do substrato.



Figura 5.2 Inoculante produzido pelo processo FES, após lavagem para remover resíduos do meio de cultura.

A viabilidade dos inoculantes foi acompanhada mensalmente durante um período de 6 meses. Durante esse período, todos os isolados apresentaram mais de 95% de viabilidade (Figura 5.3). Com o aumento da idade a viabilidade do inoculante passou a se manifestar mais tardiamente quando amostras do inoculante eram testadas.

A viabilidade desse tipo de inoculante é favorecida pela absorção dos metabólitos e estabilização do pH promovidas pela turfa e vermiculita, além da proteção física do micélio entre as lâminas de vermiculita (HACSKAYLO, 1953; MARX e ZAK, 1965).

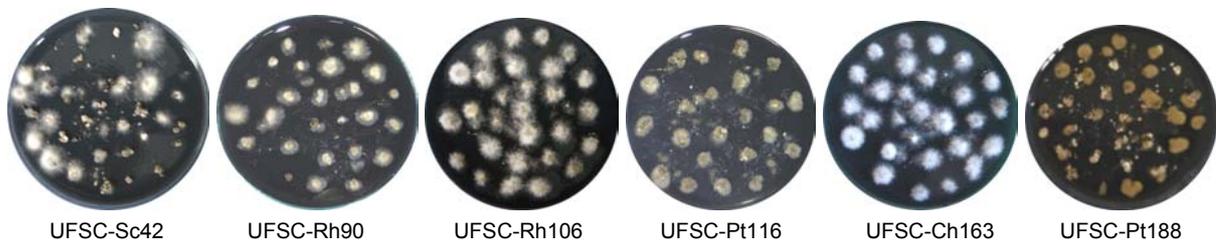


Figura 5.3 Teste de viabilidade de amostras do inoculante produzido pelo processo FES em meio de cultura sólido, com idade variando entre 1 e 6 meses.

Com relação à viabilidade, o inoculante produzido em turfa e vermiculita demonstrou ter condições de atender futuras especificações para comercialização quanto ao prazo de validade. Alves *et al.* (2001) e Souza *et al.* (2004) testaram a infectividade e eficiência micorrízica de inoculantes produzidos por esse processo de fermentação tendo obtido significativo grau de sucesso na colonização e promoção do crescimento de plantas. No primeiro caso, o inoculante foi mantido por mais de seis meses sob refrigeração antes de ser usado na inoculação das plantas.

#### 5.1.2 Efeito do carvão ativo na viabilidade do micélio

Na rotina do preparo de inóculo para o biorreator, verificou-se uma dificuldade na expressão e/ou manutenção da viabilidade das suspensões micelianas. A necessidade de um período mínimo de espera de 2 a 3 dias para a confirmação da viabilidade em meio sólido em placas criava uma incerteza quanto à qualidade do micélio que estava sendo verificado, pois durante esse tempo a suspensão sofria alterações, com conseqüente perda da viabilidade. A fragmentação das hifas pode liberar substâncias como compostos fenólicos, e também lipídios e proteínas constituintes das membranas, além de enzimas intracelulares (IWASE, 1992). A oxidação dessas substâncias, ou ainda outras reações não conhecidas, podem gerar condições tóxicas que se intensificam com o tempo, à medida que essas substâncias se acumulam no meio. Muitas vezes, por razões operacionais, o preparo do inóculo não coincidia com o momento da inoculação, o que podia promover aumento nos níveis dessas substâncias e comprometer todas as etapas subseqüentes do processo. Suspensões micelianas também foram preparadas para o encapsulamento, e a viabilidade das cápsulas podia ser influenciada pela qualidade da suspensão.

A utilização de carvão ativo com o objetivo de remover metabólitos tóxicos nas suspensões micelianas e, também, nas cápsulas de inoculante, proporcionou resultados bastante positivos. A presença do carvão permitiu a manutenção da viabilidade dos fungos ectomicorrízicos, mesmo após longos períodos de armazenamento em solução salina e sob refrigeração. Todos os isolados, mesmo aqueles que não apresentavam problemas de perda rápida de viabilidade, como os isolados do gênero *Rhizopogon* (UFSC-Rh90 e UFSC-Rh106), foram beneficiados pela incorporação do carvão.

Para ilustrar esse efeito, nas Figuras 5.4 e 5.6 são apresentadas imagens do crescimento dos isolados, o UFSC-Pt116 e UFSC-Ch163, respectivamente, na presença e ausência de carvão na suspensão. Como se pode notar, o crescimento na presença de carvão (cc) é muito mais vigoroso que aquele apresentado na suspensão sem carvão (sc). Com o carvão na suspensão, a viabilidade permaneceu alta, mesmo após 4 meses de armazenamento.

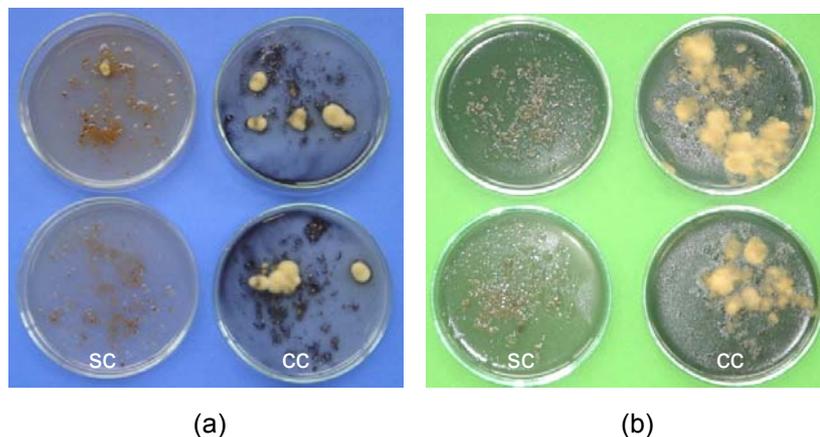


Figura 5.4 Viabilidade de suspensão miceliana do isolado UFSC-Pt116 sem carvão (sc) e com carvão (cc), no momento da fragmentação (a), e 12 dias após o armazenamento sob refrigeração (b).

Vale ressaltar que mesmo as suspensões com carvão, após certo tempo, tiveram sua viabilidade aparentemente afetada quando eram testadas em meio sólido sem carvão (Figura 5.5a). Entretanto, quando essas mesmas suspensões eram plaqueadas em meio de cultura contendo carvão ativo, a viabilidade se expressava de maneira excelente (Figura 5.5b), mesmo em fragmentos com tamanhos abaixo do limite de resolução da lupa binocular (30X). O mesmo efeito foi verificado em cápsulas de inoculante (Figura 5.6b). Isso sugere que quando os propágulos estão na fase inicial de crescimento, adaptando-se às condições de transição de uma condição sem nutrientes para uma rica em nutrientes, eles possam ser mais sensíveis a metabólitos e, também, por componentes do meio de cultura.

Uma observação que corrobora essa hipótese foi que quando cápsulas de inoculante em meio de cultura sólido iniciavam o crescimento antes que outras, seus metabólitos podiam limitar a germinação das cápsulas adjacentes, dando a impressão de diminuição da viabilidade. Isso foi

observado em inoculante com mais de um mês de idade, colocado em meio de cultura sólido sem carvão. Também é possível que os propágulos em crescimento provoquem a exaustão de nutrientes ao seu redor, criando uma zona pobre, o que dificultaria o crescimento dos propágulos adjacentes.

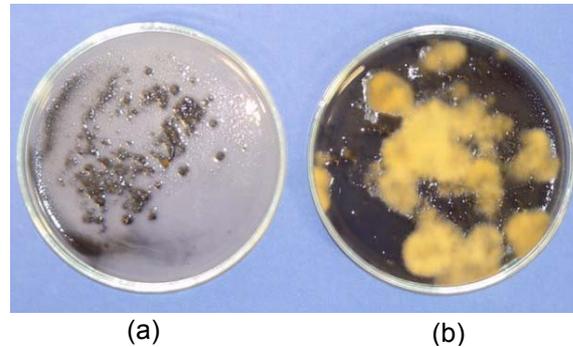


Figura 5.5 Viabilidade de suspensão miceliana com carvão do isolado UFSC-Pt116, em meio de cultura sem carvão (a), e em meio de cultura com carvão (b), após 30 dias de armazenamento sob refrigeração.

A inoculação de cápsulas desses lotes em meio líquido permitiu verificar a viabilidade em 100% das cápsulas (Figura 5.7). O meio líquido dispersa mais rapidamente os metabólitos, além de difundir mais rapidamente os nutrientes nas cápsulas. Ou ainda, no meio líquido os nutrientes se difundiriam mais rapidamente que no meio sólido e não se estabeleceria uma zona de depleção ao redor dos propágulos em crescimento. Assim, optou-se por fazer o teste de viabilidade em meio líquido, quando a viabilidade em placas parecia estar diminuindo.

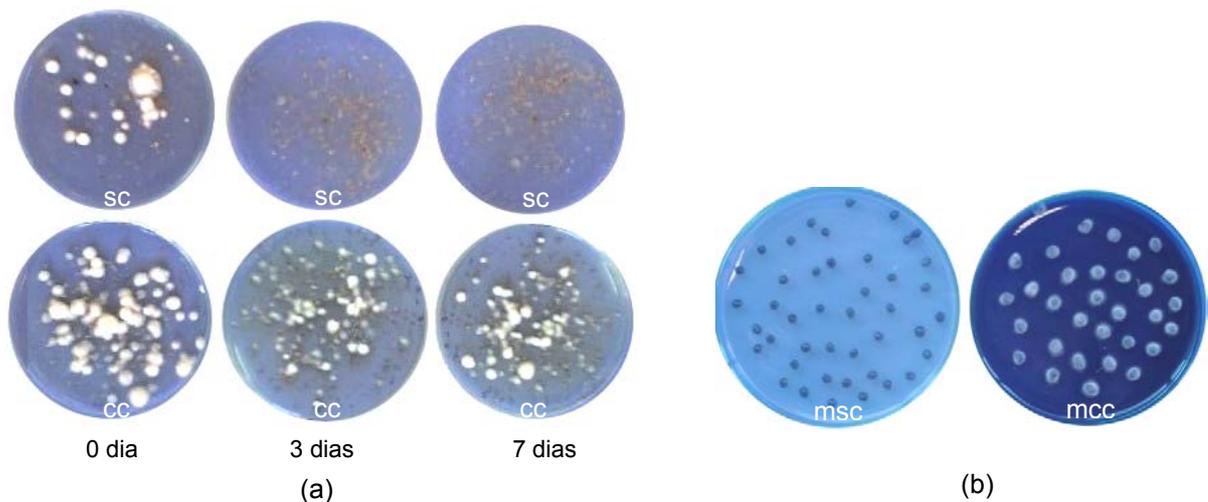


Figura 5.6 Viabilidade de suspensão miceliana sem carvão (sc) e com carvão (cc) do isolado UFSC-Ch163, testada com diferentes idades (a), e viabilidade das cápsulas desse inoculante com 15 dias de idade em meio de cultura sem (msc) e com (mcc) carvão ativo, no quarto dia de incubação (b).

Suspensões micelianas e cápsulas de inoculante da maioria dos isolados (exceto *Rhizopogon* spp.), perdem a viabilidade rapidamente, geralmente em menos de 24 h, na ausência de carvão. A perda de viabilidade é irreversível, indicando que o emprego do carvão deve ser realizado imediatamente após a fragmentação, ou na etapa de acondicionamento de *pellets* de biomassa para preservação.

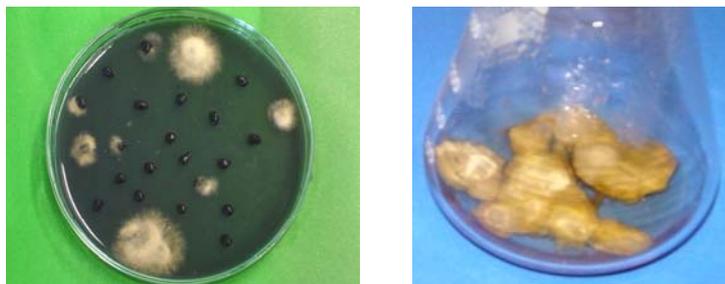


Figura 5.7 Viabilidade de um mesmo lote de cápsulas do isolado UFSC-Pt116 em meio de cultura sólido e em meio de cultura líquido.

A utilização do carvão ativo foi de extrema importância para o desenvolvimento deste trabalho. Pode-se dizer que existiu no trabalho experimental uma fase antes e uma fase depois do carvão. Na primeira, resultados significativos somente foram obtidos para isolados como UFSC-Rh90 e UFSC-Rh106, que são mais tolerantes aos efeitos negativos dos metabólitos. A presença de carvão permitiu expressar o potencial de viabilidade e a importância de estudos fisiológicos e bioquímicos desses fungos. A utilização de carvão ativo foi padronizada para uso no inóculo, no inoculante e em meio de cultura sólido. Atualmente, também está sendo utilizado na manutenção das culturas da coleção do Laboratório de Ectomicorrizas da UFSC. Apesar dos benefícios, o carvão não é apropriado para utilização em cultivo submerso, pois, por não ser seletivo, retira nutrientes do meio, podendo limitar o crescimento. Mas principalmente por questões práticas, pois quando na forma de pó, o carvão impossibilita acompanhar visualmente o cultivo. Na Figura 5.8 é demonstrado o efeito limitante do carvão quando em proporções elevadas, recomendando-se utilizá-lo em concentrações entre 0,2 e 0,3%.

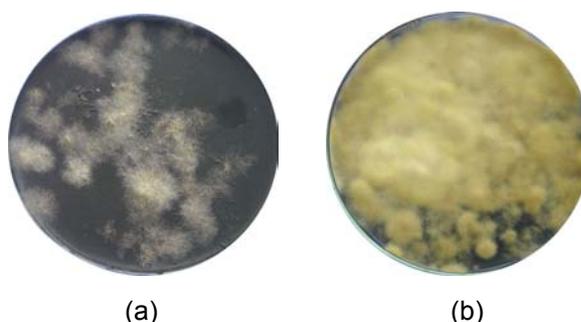


Figura 5.8 Crescimento miceliano do isolado UFSC-Pt116 em meio de cultura sólido adicionado de 1% (a) e 0,3% de carvão ativo (b). Placas com 30 dias de incubação.

Embora não seja adequado conservar biomassa na forma de suspensão miceliana, foi possível, com o carvão, manter a viabilidade dessas suspensões por vários meses. Assim mesmo, o ideal é a utilização de uma matriz sólida, como o alginato de cálcio, pois, além das vantagens de proteção do micélio, o gel mantém o carvão distribuído de forma homogênea. Por outro lado, em meio líquido o carvão sedimenta e exerce um efeito desuniforme.

### 5.1.3 Tempo de fragmentação do micélio

Quanto ao tempo de fragmentação do micélio, a literatura apresenta valores na faixa de 1 a 60 segundos (LAPEYRIE e BRUCHET, 1985; MAUPÉRIN *et al.* 1987; PRADELLA *et al.*, 1991a; KUEK, 1996; ROSSI, 2001; ROSSI *et al.*, 2002), e indica estar relacionados com os diferentes equipamentos utilizados e à resistência do micélio, além dos objetivos de cada estudo. Muitas discussões sugerem que a fragmentação seja a causa da perda da viabilidade do micélio. Entretanto, um nível de fragmentação adequado é muito importante para a cinética de crescimento e, na etapa de veiculação da biomassa em gel, para evitar entupimento do dispositivo encapsulador e para formação de cápsulas com distribuição homogênea do micélio.

Esse estudo revelou que um maior tempo de fragmentação não prejudica a viabilidade do micélio (Figura 5.9). Foi possível, inclusive, a obtenção de propágulos menores, resultando na formação de *pellets* menores e mais homogêneos em cultivo no biorreator. A hipótese que conduziu a esse estudo foi de que a fragmentação em equipamentos tipo *blender* deveria produzir um perfil assintótico para a curva de destruição das hifas. Tal hipótese surgiu através da observação de suspensões ao microscópio, onde o efeito destrutivo aparentemente não era expressivo, frente à quantidade de hifas que permaneciam intactas. Esse estudo foi realizado cronologicamente depois dos avanços obtidos com a utilização do carvão, pois até então efetuava-se uma fragmentação por períodos muito curtos, poucos segundos, acreditando-se que esse processo fosse prejudicial à viabilidade do micélio (LAPEYRIE e BRUCHET, 1985). Embora a fragmentação destrua, efetivamente, um certo volume das hifas, seu efeito não se compara ao efeito inibidor dos metabólitos, quando não se utiliza carvão no meio de cultura. Finalmente, cabe ressaltar que apesar da destruição de algumas hifas a fragmentação proporciona a quebra dos aglomerados de hifas, minimizando, assim, a limitação por difusão.

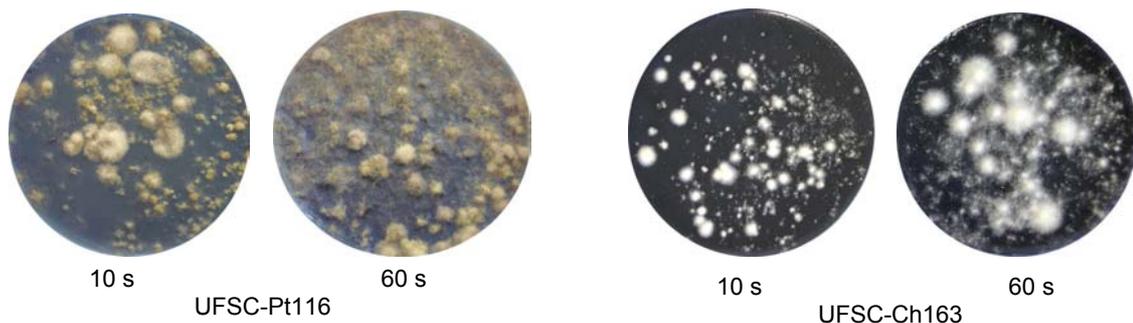


Figura 5.9 Viabilidade de suspensões micelianas preparadas com diferentes tempos de fragmentação.

Um tempo de fragmentação de 20 segundos em liquidificador a 3600 rpm foi considerado suficiente para fornecer uma suspensão bastante fina de todos os isolados, adequada para todas as aplicações (inóculo e inoculante). Quando necessário, outros tempos poderão ser aplicados, desde que se faça a utilização de carvão ativo no meio onde essa suspensão vai ser inoculada ou armazenada.

#### 5.1.4 Estabilidade do gel de alginato de cálcio

A reação do alginato de sódio com o cloreto de cálcio, durante a encapsulação da biomassa fúngica, leva uma troca iônica com a formação de um gel de alginato de cálcio e liberação de NaCl na solução, reduzindo o volume da cápsula durante a polimerização e concentrando todos os elementos constituintes. Neste estudo, verificou-se que, se as cápsulas forem armazenadas em solução salina, o NaCl dessa solução provoca uma reação de despolimerização, desestabilizando o gel. O mesmo ocorria se as cápsulas fossem colocadas em meio de cultura onde há, também, NaCl.

Assim, nos ensaios em meio líquido, a despolimerização, seguida de desintegração das cápsulas através de rápida agitação, afetou a viabilidade do inoculante (Figura 5.10a e b). Nos ensaios em placas, onde as cápsulas despolimerizadas não foram desintegradas, ocorrendo apenas absorção de água, o inoculante manteve a viabilidade (Figura 5.11a e b). O mesmo ocorreu em meio líquido quando as cápsulas não foram desintegradas (Figura 5.10b).

Uma hipótese para a perda da viabilidade da biomassa das cápsulas desintegradas seria a da elevada pressão osmótica em combinação com o estresse da agitação. Fosfatos, além de outros cátions monovalentes como o  $K^+$  e  $NH_4^+$ , também podem provocar a desestabilização do gel (KUEK *et al.*, 1992; KUEK, 1996). Apesar de pouco provável, não se pode descartar a ocorrência desse efeito em substrato de plantio adubado ou com excesso de sais, o que poderia provocar uma falha completa do programa de inoculação das plantas.

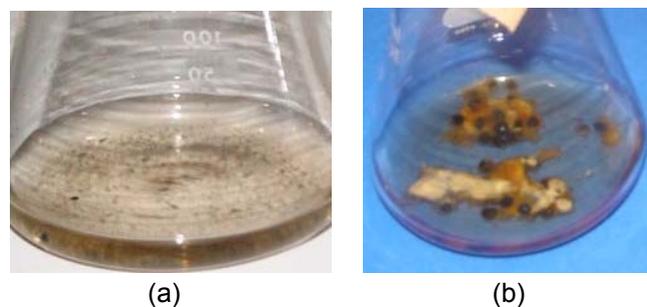


Figura 5.10 Viabilidade de cápsulas do inoculante UFSC-Pt116 em meio de cultura líquido. As cápsulas desintegradas por breve agitação não apresentaram viabilidade (a), cápsulas intactas, embora com despolimerização parcial, mantiveram a viabilidade (b).

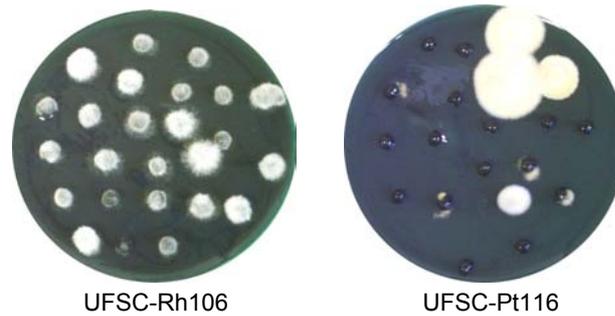


Figura 5.11 Viabilidade de cápsulas de inoculante de dois isolados em meio de cultura sólido apresentando desestabilização (intumescimento e perda da consistência) do gel.

A desestabilização do gel, observada em alguns lotes de cápsulas de inoculante, foi importante para se estabelecerem certos cuidados durante o encapsulamento, pois nem todos os detalhes da técnica foram descritos em estudos anteriores (LE TACON *et al.*, 1984; MAUPÉRIN *et al.*, 1987). Este estudo conduziu a diversos testes de encapsulamento, que permitiram padronizar tanto o volume de água, quanto o tempo de lavagem das cápsulas para remoção dos resíduos de cloreto de cálcio. Também reduziu-se a concentração original de  $\text{CaCl}_2$  de 0,7 M para 0,6 M. Como esse sal apresenta efeitos tóxicos para fungos ectomicorrízicos (KERNAGHAN *et al.*, 2002), deve-se evitar o acúmulo de resíduos nas cápsulas. Por outro lado, uma concentração muito baixa desse sal poderá resultar num gel fraco, e sem as propriedades de proteção física do micélio.

A ampliação da viabilidade do inoculante dos isolados mais sensíveis, UFSC-Sc42 e UFSC-Pt188, só foi possível após padronização da técnica de encapsulamento (item 5.4.2).

#### 5.1.5 Determinação das velocidades em cultivo estático

Os traçados das curvas a partir dos dados experimentais obtidos do cultivo em frascos para todos os isolados são apresentados nas Figuras 5.12 a 5.14. Observando o Quadro 5.1, o desempenho foi diferente para cada um deles, notadamente quando se comparam isolados de mesmo gênero (UFSC-Rh90 e UFSC-Rh106), embora tenham havido diferenças mesmo entre isolados de uma mesma espécie (UFSC-Pt116 e UFSC-Pt188), nas mesmas condições de cultivo. Essas diferenças na cinética são marcantes no cultivo de fungos ectomicorrízicos e devem estar relacionadas com a fisiologia e a variabilidade genética. Diferenças marcantes também foram verificadas para um mesmo isolado, entre cultura em meio sólido e em meio líquido.

Ficou evidente, dessa forma, a necessidade de estudos nutricionais e fisiológicos específicos, além da temperatura mais adequada para cada isolado, para se obter o máximo de desempenho em cultivo. Entretanto, esses estudos somente serão viáveis se estiver disponível um sistema de controle de pH. Como pode ser observado, ocorrem grandes variações no pH e seu controle através do uso de tampões (ver item 5.4.4) não é eficaz para mantê-lo na faixa ótima que seria entre 5 e 6.

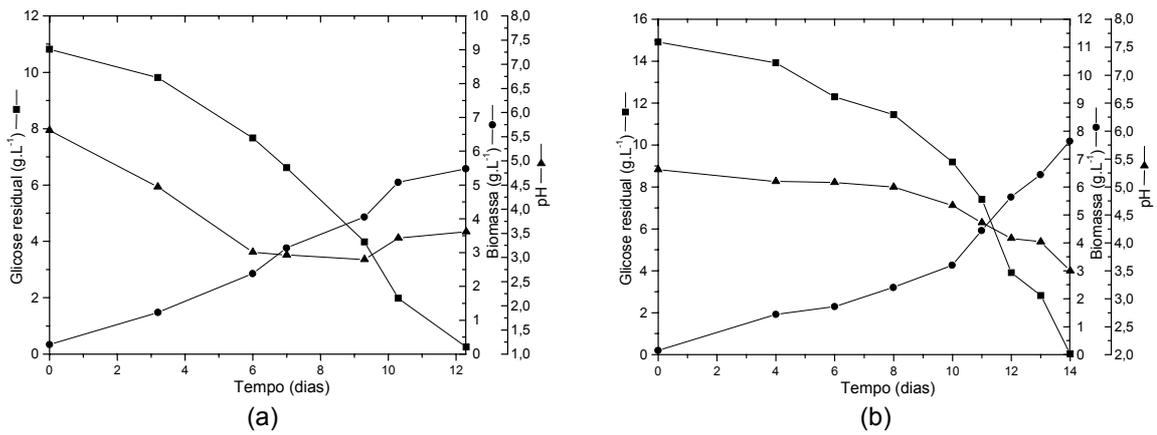


Figura 5.12 Produção de biomassa, consumo de glicose e variação do pH durante cultivo de *Sclerotinia* sp. (UFSC-Sc42) (STREIT *et al.*, 2005b) (a), e *Rhizopogon nigrescens* (UFSC-Rh90) (b), em frascos estáticos a 25±1 °C.

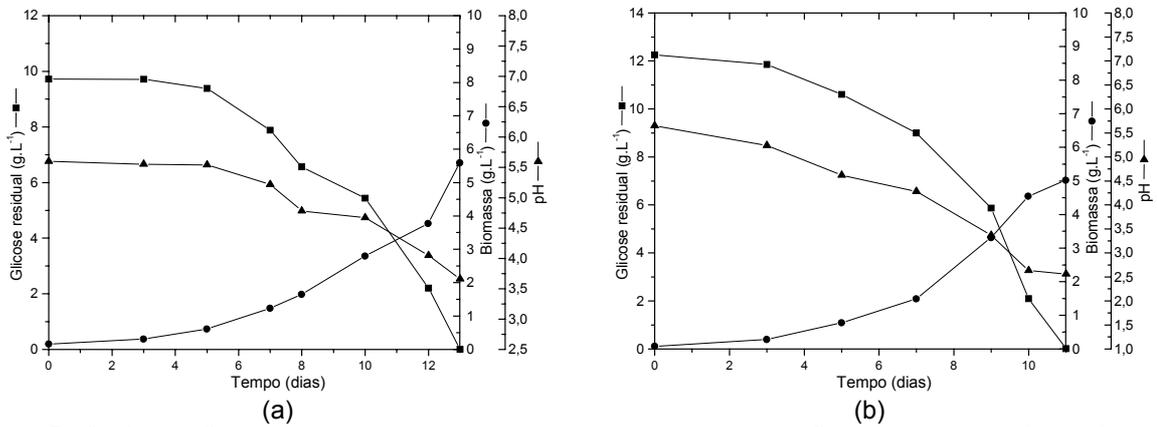


Figura 5.13 Produção de biomassa, consumo de glicose e variação do pH durante cultivo de *Rhizopogon vulgaris* (UFSC-Rh106) (a), e *Pisolithus microcarpus* (UFSC-Pt116) (b), em frascos estáticos a 25±1 °C.

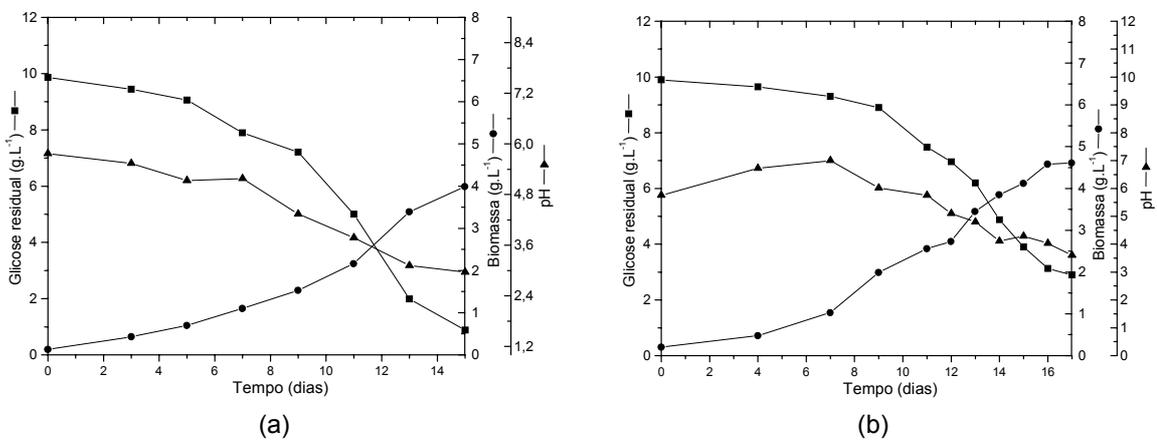


Figura 5.14 Produção de biomassa, consumo de glicose e variação do pH durante cultivo de *Chondrogaster angustisporus* (UFSC-Ch163) (a), e *Pisolithus microcarpus* (UFSC-Pt188) (b), em frascos estáticos a 25±1 °C.

Na Figura 5.15 é apresentado um exemplo da determinação da velocidade específica de crescimento e do fator de conversão de substrato em hifas, que são apresentados para todos os isolados no Quadro 5.1. Observa-se que a conversão apresenta relativa constância para os diferentes isolados, estando em torno de 43%.

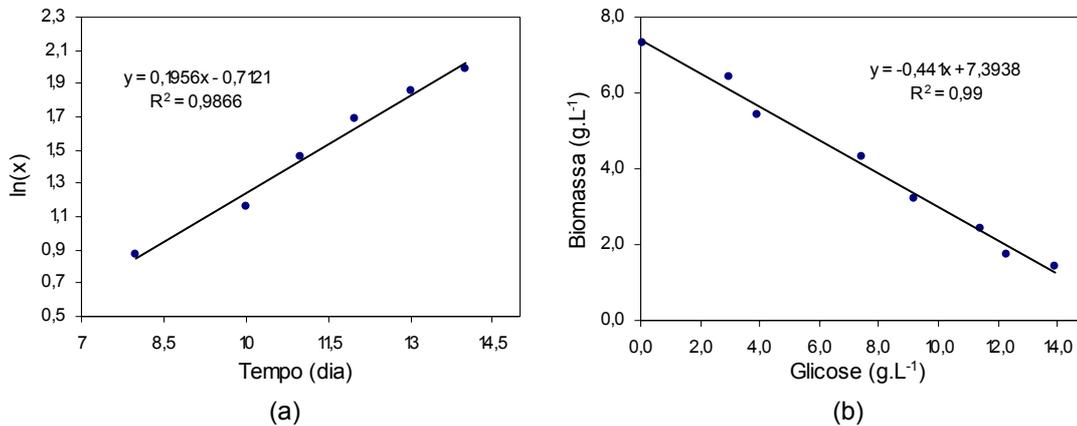


Figura 5.15 Determinação da velocidade específica de crescimento (a) e da conversão de substrato em biomassa (b), para o cultivo do isolado UFSC-Rh90 em frascos estáticos a 25±1 °C.

ISOLADO	$\mu_x$ (dia <sup>-1</sup> )	$P_x$ (g.L <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )	$Y_{x/s}$ (g <sub>cel.</sub> .g <sub>sub.</sub> <sup>-1</sup> )	pH <sub>f</sub>
UFSC-Sc42	0,19	0,42	0,43	3,8
UFSC-Rh90	0,20	<b>0,54</b>	0,44	<b>3,5</b>
UFSC-Rh106	0,28	0,42	0,44	3,7
UFSC-Pt116*	0,39	0,46	0,42	2,5
UFSC-Ch163	0,19	<b>0,26</b>	0,40	<b>3,0</b>
UFSC-Pt188	0,17	0,27	0,44	3,6

\*Fonte: Rossi (2001)

Quadro 5.1 Variáveis cinéticas e fator de conversão obtidos do cultivo em frascos estáticos a 25±1 °C. O valor do pH inicial médio foi 5,7.

### 5.1.6 Fatores que afetam o método dinâmico em biorreator *airlift*

Na execução do método dinâmico durante um cultivo, em certo instante, a aeração deve ser interrompida para se registrar a queda nos valores do oxigênio dissolvido e um balanço de massa possibilita a determinação de Q<sub>O2</sub>. Em instante posterior, retoma-se a aeração e novo balanço de massa possibilita a determinação do k<sub>L</sub>a. Para biorreatores *airlift*, que não possuem

sistemas de agitação, essa interrupção impede que se mantenha a biomassa em suspensão, ocorrendo, assim, sedimentação da biomassa no *riser* e *downcomer*.

A adaptação do método dinâmico, que considera os fatores discutidos a seguir, foi a forma encontrada para determinação da velocidade específica de consumo de oxigênio no presente trabalho. Biorreatores *airlift* híbridos, como aquele testado por Chisti e Jaureghi-Haza (2002), não apresentam todas essas dificuldades, pois a biomassa é mantida em suspensão pelo agitador. Outra forma de manter a biomassa em suspensão durante a interrupção da aeração poderia ser estabelecida com a utilização de um sistema externo de bombeamento para promover a circulação do líquido. Entretanto, é difícil de idealizar tal sistema em condições assépticas.

#### 5.1.6.1 Sedimentação da biomassa

Com a interrupção da aeração inicia-se a sedimentação gravitacional e a biomassa se acumula no fundo do biorreator. Nessa região, o consumo de oxigênio vai aumentando gradativamente com o acúmulo da biomassa e, em contrapartida, esse consumo vai diminuindo na região do topo. Entretanto, na região média onde está instalado o sensor de OD, pode-se imaginar uma velocidade de consumo de oxigênio constante enquanto a concentração de biomassa se mantiver aproximadamente constante. Pois, ao mesmo tempo em que certa quantidade de biomassa deixa a região do sensor, passa a ser substituída por outra vinda da parte superior. Assim, pode-se determinar um período de tempo em que a concentração de biomassa seja constante e, por consequência, a velocidade de respiração. Isso pode ser obtido medindo-se a velocidade de sedimentação.

A Figura 5.16 ilustra dois momentos do ensaio de determinação da velocidade de sedimentação. Em função do aumento da massa dos *pellets* ao longo do cultivo, os valores ficaram dentro da faixa de 0,2 a 0,3  $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ , para aqueles com diâmetro variando de 0,5 a 3 mm.

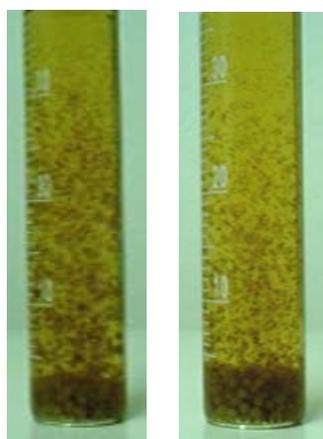


Figura 5.16 Ensaio em proveta para determinação da velocidade de sedimentação.

Considerando-se a distância de 45 cm da superfície do líquido no separador de gás até o sensor, tem-se um intervalo de cerca de 150 s com biomassa presente na região do sensor. Assim, com uma margem de segurança, pode-se dispor de 2 minutos para a realização das medidas. Com o tempo de 10 s entre as leituras, foi possível estabelecer 12 pontos experimentais para determinação da  $Q_{O_2}$ . Nesta fase do ensaio dinâmico, em que se determina a velocidade de respiração, foi importante avaliar o tempo de resposta do eletrodo, pois o meio permaneceu praticamente estático.

#### 5.1.6.2 Constantes de atraso do eletrodo de oxigênio dissolvido

O atraso na resposta é devido ao tempo necessário para que oxigênio dissolvido no líquido seja difundido através da membrana do eletrodo, que isola o meio líquido da superfície do cátodo (onde o oxigênio é reduzido gerando o fluxo de elétrons). Além disso, pode existir também uma película estagnada, dependendo das velocidades de passagem de líquido pela superfície do eletrodo (SCHMIDELL, 2001).

Na primeira etapa do ensaio dinâmico, o líquido fica praticamente estático, com somente pequenos movimentos devidos à sedimentação da biomassa. Na segunda etapa, devido à aeração, o líquido encontra-se em movimento e mistura plena. Como consequência, o atraso na resposta do sensor apresenta valores diferentes nas diferentes fases de execução do ensaio. O tempo de resposta no trecho que permite a determinação do  $Q_{O_2}$  deverá ser maior do que o da fase de determinação do  $k_L a$ .

A resposta do eletrodo, obtida de teste realizado em meio de cultura estático, apresentou, para a constante de atraso, o valor de  $106 \text{ h}^{-1}$  (Figura 5.17). Em meio de cultura sob agitação devida à aeração, o valor foi de  $389 \text{ h}^{-1}$  (Figura 5.18). O fabricante do eletrodo apresenta um tempo variando entre 45 e 90 s para 98% da resposta, que certamente foi determinado em condições de agitação. Como se observa, o resultado obtido sob agitação está de acordo com a especificação de fábrica.

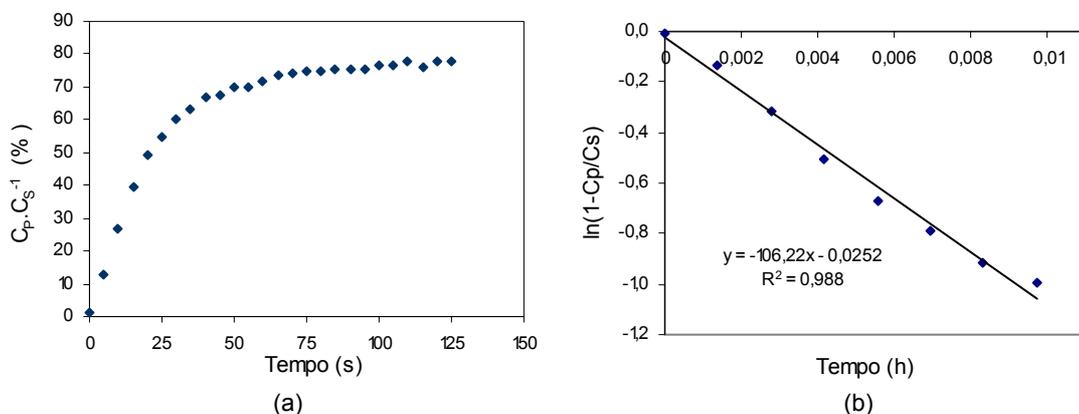


Figura 5.17 Teste degrau, com o eletrodo inicialmente zerado com  $N_2$ , colocado em meio de cultura estático saturado com  $O_2$ , a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ : resposta do eletrodo em função do tempo (a) e determinação do tempo de resposta (b).

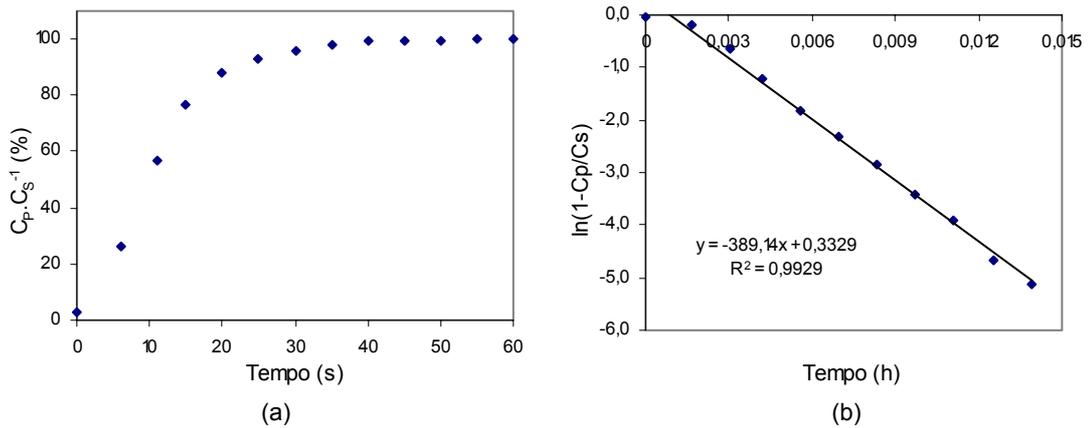


Figura 5.18 Teste degrau, com o eletrodo inicialmente zerado com  $N_2$ , colocado em meio de cultura saturado com  $O_2$  e sob agitação, a  $25\text{ }^\circ\text{C}$ : resposta do eletrodo em função do tempo (a) e determinação do tempo de resposta (b).

Segundo Schmidell (2001), são comuns sensores razoavelmente rápidos apresentarem 90% da resposta em 20 s, atendendo, também, a essa especificação. Entretanto, quando se trata de medidas em condições de líquido estático, como é o caso da primeira etapa do método dinâmico, para determinação da velocidade específica de respiração, o atraso é cerca de 4 vezes maior. O eletrodo é o mesmo, mas o que mudou foi a resistência à transferência do  $O_2$  na película estagnada entre o meio de cultura e a membrana do eletrodo.

### 5.1.6.3 Constante de atraso do sensor de temperatura

A constante de atraso na resposta do termômetro apresentou um valor de  $274\text{ h}^{-1}$  (Figura 5.19) e serviu para avaliar a necessidade de correção dos dados que forneceram o tempo de mistura (item 5.3.2.2).

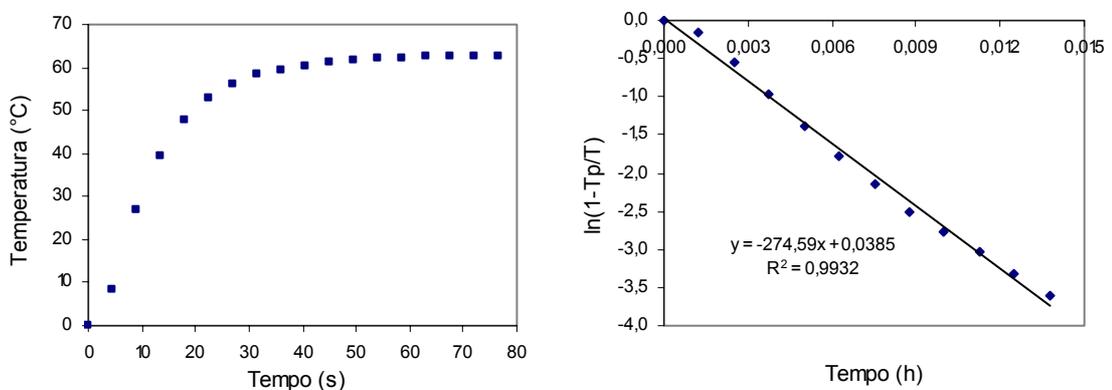


Figura 5.19 Teste degrau, com a temperatura ajustada inicialmente em zero, com água a  $0\text{ }^\circ\text{C}$ , e depois colocado em água a  $63\text{ }^\circ\text{C}$ : resposta do eletrodo em função do tempo (a) e determinação do tempo de resposta (b).

#### 5.1.6.4 Efeito da despressurização

Com a interrupção da aeração a 0,20 vvm, o efeito nas leituras do oxigênio dissolvido, devido somente à despressurização, é apresentado na Figura 5.20, equivalendo a um valor médio para  $Q_{O_2} \cdot X$  de  $2,90 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ .

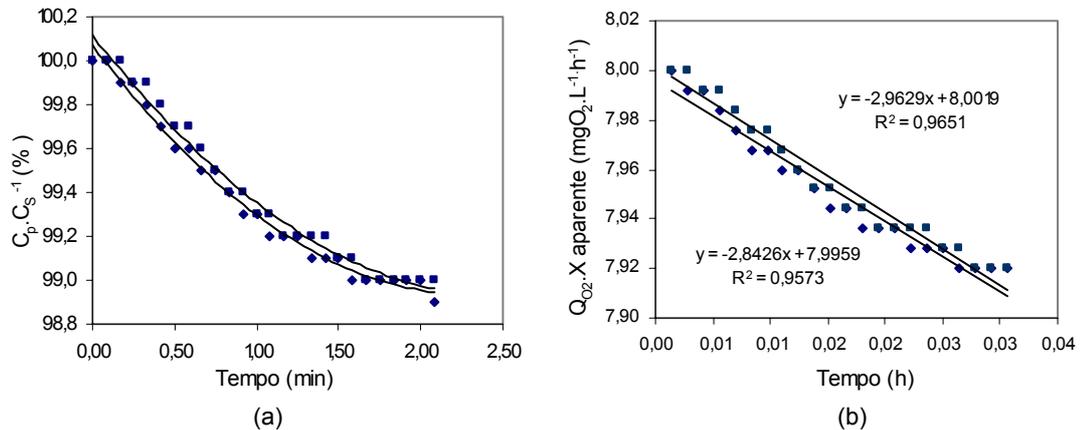


Figura 5.20 Variação da concentração de oxigênio dissolvido em função do tempo, devido à interrupção da aeração (0,20 vvm) e à conseqüente despressurização do biorreator (a). Determinação do efeito equivalente a  $Q_{O_2}X$  (b). Dados experimentais em duplicata.

Vazões mais elevadas geram maior pressurização (item 5.3.2.5) que, conseqüentemente geram um maior consumo aparente de  $O_2$  na despressurização. Assim, para 0,36 vvm, foram obtidos  $3,54 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . Para 0,52 vvm, foram obtidos  $3,86 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . A solubilidade máxima de  $O_2$  em água de torneira foi considerada como  $8,0 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$  a  $25^\circ \text{C}$  e ao nível do mar.

Para o caso deste trabalho, é considerável o efeito da variação da pressão sobre a leitura dos valores de  $C_p$ , podendo-se prever, também, esse efeito no segundo trecho onde ocorre pressurização gradual, na retomada da aeração, capaz de afetar as medidas de  $k_L a$ . Esse é um dos motivos pelos quais, no momento da troca, o material filtrante do cartucho do filtro de saída era pesado, de modo a não alterar a perda de carga.

Essa velocidade aparente de consumo de oxigênio, devida à despressurização e restauração do equilíbrio líquido-ar, foi considerada nos testes dinâmicos para determinação de  $Q_{O_2}$ . Essas considerações foram importantes porque os microrganismos utilizados neste estudo apresentam baixa velocidade específica de crescimento (Quadro 5.1) e, conseqüentemente, velocidade de respiração também muito baixa. O possível efeito sobre o  $k_L a$  durante a pressurização é, em parte, atenuado durante o tempo de mistura em que ocorre estabilização parcial da pressão, durante o qual os pontos são desconsiderados.

Uma solução para esse problema seria a construção de um dispositivo que fechasse a saída dos gases no mesmo instante da interrupção da aeração, mantendo o biorreator pressurizado, resolvendo-se, desse modo, as interferências nas leituras devidas tanto a despressurização quanto a pressurização.

## 5.2 Transferência de massa

Estudos sobre a transferência de massa durante o cultivo de fECM não foram encontrados na literatura, sendo poucos até os trabalhos que apresentam apenas dados de velocidade de crescimento. Esse tipo de estudo adquire uma dificuldade particular por se tratar de fungos de crescimento lento, onde a velocidade tem escala de medida em dias. A dificuldade é devida, também, ao tipo de biorreator utilizado que atualmente está em uso em apenas 5% dos processos, significando estágios iniciais no desenvolvimento das aplicações. No Apêndice B apresenta-se uma avaliação da estequiometria relacionada ao crescimento dos fungos onde se verificou a impossibilidade de utilização do método do balanço gasoso (BADINO Jr. *et al.*, 2000 e 2001) para os estudos de transferência de oxigênio, devido à diferença da concentração de oxigênio entre a entrada e a saída ser da ordem do erro na medida. Então, nesse trabalho utilizou-se o método dinâmico para essas determinações, observando-se as considerações e correções discutidas nos estudos preliminares.

Para efeitos de transferência de massa, a composição da fase gasosa foi considerada constante ao longo do *riser*, pois apenas uma fração muito pequena do oxigênio total do ar de entrada do biorreator é transferida para o líquido (CHISTI, 1989). Entretanto, a existência de um  $C_S$  variável axialmente em função da variação da pressão hidrostática deverá ser considerada em biorreatores *airlift* com alturas elevadas, como também é considerado em qualquer biorreator de grande porte.

### 5.2.1 Determinação da solubilidade do oxigênio em meio de cultura

A solubilidade do  $O_2$  em meio de cultura, determinada pela correlação obtida da Figura 5.21 e a estequiometria da reação, foi de aproximadamente  $7,5 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ , a  $25^\circ \text{C}$  e à pressão atmosférica ao nível do mar (ROSSI *et al.*, 2005c). Esse valor foi cerca de 8% inferior à valor de solubilidade da água pura nas mesmas condições. A presença da glicose e de sais diminuiu a solubilidade do oxigênio no líquido, como já observado por outros pesquisadores (KAPPELI e FIECHTER, 1981; SCHMIDELL, 2001).

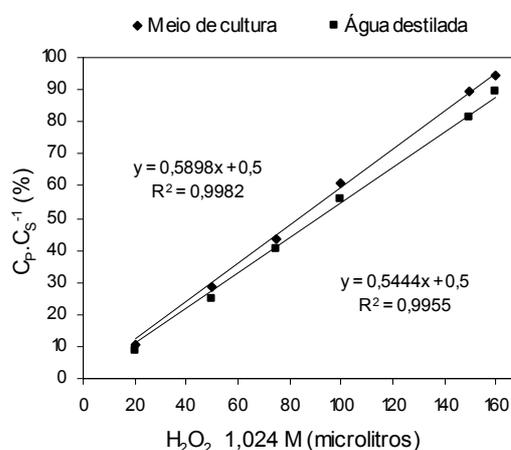


Figura 5.21 Resposta do eletrodo de oxigênio dissolvido em relação a quantidades crescentes de  $H_2O_2$  na presença de catalase.

### 5.2.2 Determinação da viscosidade

A medida da viscosidade foi de difícil realização devido ao fato de o tamanho dos *pellets* de biomassa ser da mesma ordem do espaçamento entre os cilindros do viscosímetro, modelo este, necessário para medidas de baixas viscosidades. Na Figura 5.22 apresenta-se a variação da viscosidade em função do tempo de cultivo. O perfil da tensão de cisalhamento em função da rotação do cilindro interno teve o melhor ajuste pelo modelo de Newton, com coeficientes de correlação variando de 0,97, para a primeira amostra, e diminuindo até atingir 0,84 na penúltima amostra. A última amostra foi melhor ajustada pelo modelo da Potência, mas com erro na correlação. Também foi observado efeito tixotrópico durante a realização dos ensaios, provavelmente devido ao efeito de cisalhamento dos cilindros sobre os *pellets* de biomassa.

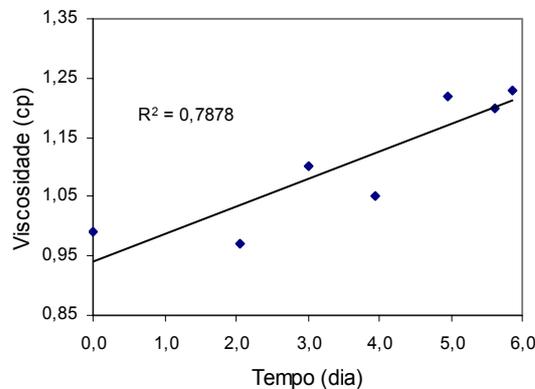


Figura 5.22 Variação da viscosidade durante o cultivo do isolado UFSC-Rh90 em biorreator *airlift*.

Em síntese, a viscosidade do meio de cultivo muda pouco, sendo basicamente newtoniana, pois, como o micélio não fica disperso a biomassa desses fungos em biorreator *airlift* tende a formar *pellets* que favorecem a manutenção de uma viscosidade mais baixa e, desse modo, as condições de transferência de massa no líquido (KIM *et al.*, 1983; MITARD e RIBA, 1988). Por outro lado, agravam-se as condições de transferência de massa para o interior dos *pellets*. É oportuno mencionar que nem todos os fungos ectomicorrízicos crescem na forma de *pellets*.

Num estudo paralelo de cultivo no *airlift*, utilizando o isolado UFSC-Am75 (*Amanita muscaria*), comumente encontrado em plantações de pinus, observou-se crescimento como micélio disperso, o que dispensou a etapa de fragmentação para o processo de encapsulamento. Esse fato indicou a possibilidade de se abreviar o processo de produção de inoculante, eliminando-se a etapa de fragmentação através do desenvolvimento de um processo de fragmentação dos *pellets* durante o cultivo. O objetivo seria, também, melhorar as condições gerais de transferência de massa, pois para as baixas concentrações celulares no cultivo de fungos ectomicorrízicos, a dispersão dos *pellets* não deverá afetar muito a viscosidade. Além

disso, esse procedimento poderia permitir um modo seguro e rápido de inoculação direta entre biorreatores em operações de aumento de escala.

Essa estratégia não foi implementada neste projeto por motivos apenas financeiros. Assim, esse assunto será mencionado brevemente no APÊNDICE E, servindo como sugestão para um trabalho futuro.

### 5.2.3 Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio

A determinação de valores do  $k_{L,a}$  em água foi importante para adequar o intervalo de tempo entre as medidas de OD, e para obtenção dos valores de referência, tanto para os resultados obtidos neste trabalho, quanto para comparação com outros estudos em biorreatores. A Figura 5.23 mostra os resultados do ensaio dinâmico para determinação do  $k_{L,a}$  na vazão de ar de 0,36 vvm, apresentando um valor de aproximadamente  $30 \text{ h}^{-1}$ . Para essa mesma vazão, o  $k_{L,a}$  obtido para uma solução fisiológica (0,15 M de NaCl) apresentou um valor cerca de 20% maior (item 5.3.2.4), possivelmente pela menor coalescência das bolhas de ar devido ao sal. É interessante ressaltar que embora a presença de sais diminua a solubilidade do oxigênio na água, ela aumenta, por outro lado, a área superficial de troca na interface líquido-ar. Para as vazões específicas de ar de 0,20 e 0,52 vvm foram obtidos valores de 15 e  $47 \text{ h}^{-1}$ .

Certamente, esses são valores de referência, pois apenas uma mudança no distribuidor de ar poderia alterar tais valores.

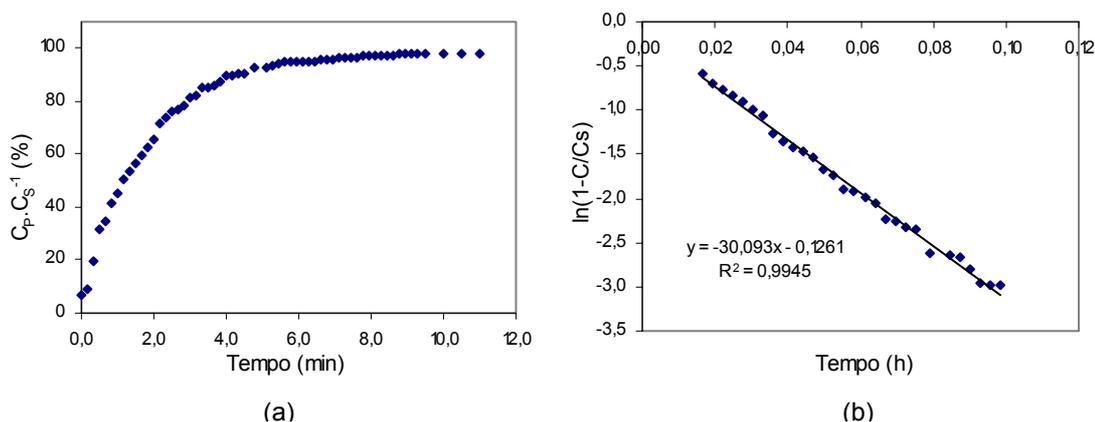


Figura 5.23 Método dinâmico realizado no biorreator *airlift* utilizando água pura ( $\text{O}_2$  removido pela injeção de  $\text{N}_2$ ) a  $25 \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$  e 0,36 vvm: resposta do eletrodo em função do tempo (a), e determinação do  $k_{L,a}$  (b).

### 5.2.4 Correção do $k_{L,a}$ em função do atraso na resposta do eletrodo

Para avaliar a necessidade de correção dos valores de  $k_{L,a}$  devido ao atraso na resposta do eletrodo, as Figuras 5.24a, b e c apresentam gráficos com a variação da concentração real de

oxigênio dissolvido (C) (Equação 4.29) e a concentração prevista pela sonda ( $C_p$ ) (Equação 4.30), em função do tempo, para os valores de  $k_{La}$  de 20, 37 e 50  $h^{-1}$  (nas vazões de 0,20, 0,36 e 0,52 vvm, respectivamente, conforme item 5.3.2.4), e para o  $k_p$  de 389  $h^{-1}$  (item 5.1.6.2). Nesses gráficos pode-se observar que o eletrodo acompanha muito bem os valores reais. A constante de atraso ( $k_p$ ) foi cerca de 8 vezes superior ao  $k_{La}$  na maior vazão utilizada para o estudo de transferência de oxigênio (0,52 vvm). Neste caso, conforme indicado por Schmidell (2001), não há necessidade de correção dos valores de  $k_{La}$ .

Na Figura 5.24d foi feita uma simulação com um  $k_{La}$  de 300  $h^{-1}$  e um  $k_p$  de 150  $h^{-1}$ , para ilustrar uma situação onde seria necessária realizar a correção. Um limite com razoável precisão, sem a necessidade de correção seria para um valor de  $k_p$  duas vezes superior ao valor do  $k_{La}$  (SCHMIDELL, 2001), e essa condição cobre uma faixa bastante ampla de  $k_{La}$  para aplicação em biorreatores *airlift*, e tranqüilamente toda a faixa utilizada na caracterização hidrodinâmica do biorreator, que foi até 1,0 vvm.

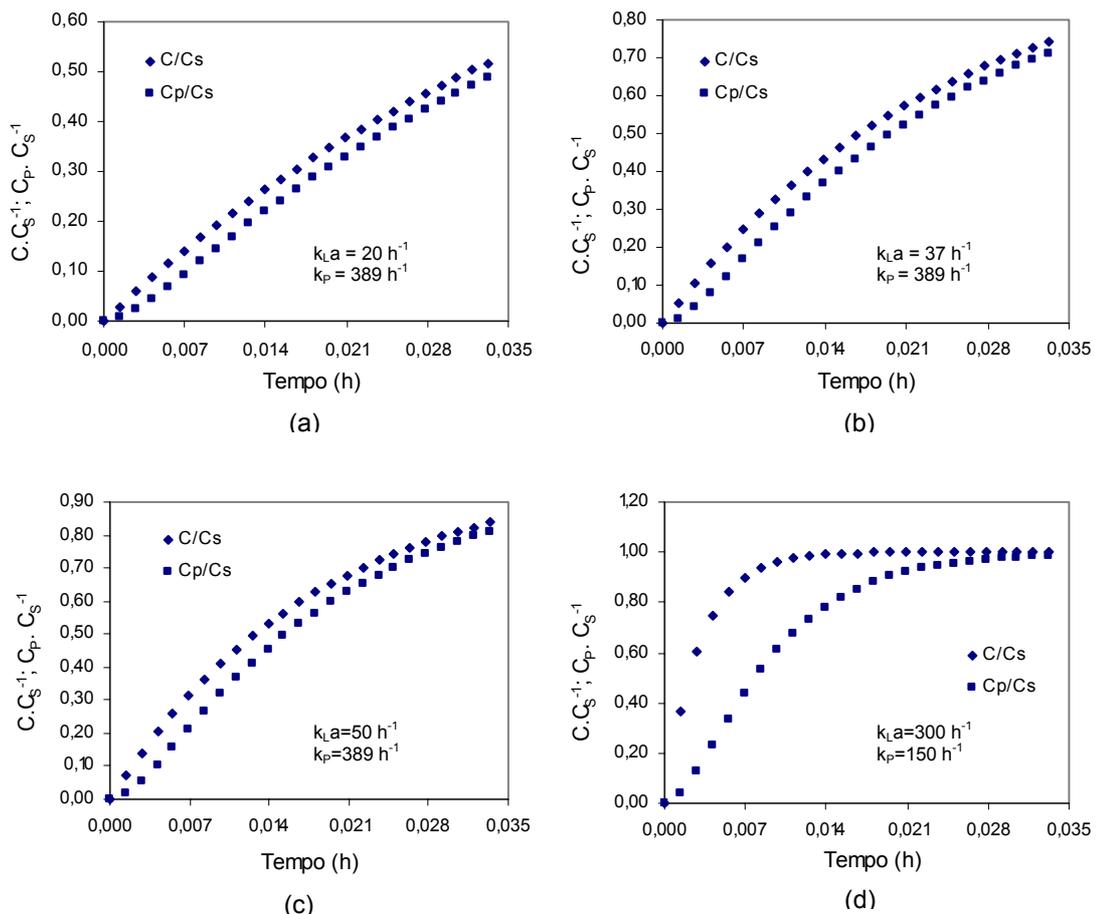


Figura 5.24 Variação da concentração real de oxigênio dissolvido ( $C.C_s^{-1}$ ) e sinal do eletrodo ( $C_p.C_s^{-1}$ ), durante execução do método dinâmico. Simulação da Equação 4.29 e Equação 4.30 para diferentes valores de  $k_{La}$  e  $k_p$ .

### 5.2.5 Determinação do $k_{L,a}$ e $Q_{O_2}$ durante o cultivo

Na Figura 5.25 são apresentadas duas curvas típicas obtidas durante a execução do método dinâmico, que foram utilizadas para determinar a velocidade específica de respiração ( $Q_{O_2}$ ) e o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_{L,a}$ ).

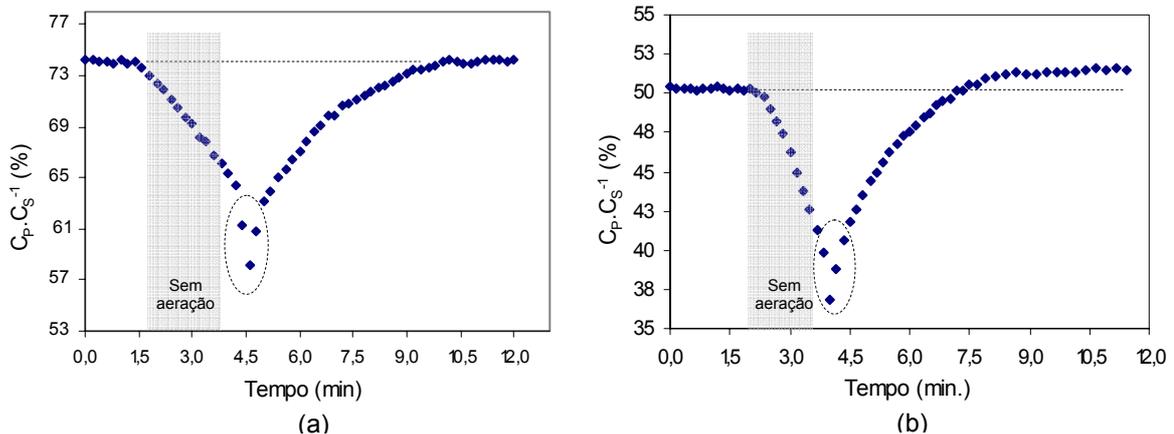


Figura 5.25 Variação percentual da concentração de OD em relação à saturação durante a realização do método dinâmico no oitavo (a) e décimo dia (b), durante o cultivo do isolado UFSC-Rh90 a  $25 \pm 1$  °C e 0,20 vvm em biorreator *airlift*.

Observou-se que em estágios mais avançados do cultivo, a execução do método dinâmico pode levar a concentração de OD a níveis críticos. Na Figura 5.25b pode-se observar que após a retomada da aeração a concentração de OD estabiliza-se num patamar superior ao do início do ensaio, indicando um consumo de  $O_2$  inferior ao que havia antes da interrupção da aeração, caracterizando um efeito prejudicial ao metabolismo. A diminuição nos níveis de OD somente foi verificada após várias horas, confundindo-se com o desenvolvimento do cultivo. Assim, como o nível de OD medido no meio ficou próximo dos 40% da saturação neste ensaio, pode ter atingido no interior dos *pellets* valores mais baixos ainda. Na retomada da aeração ocorre uma queda brusca na concentração de OD medida no eletrodo (ver elipse tracejada) devida ao início do processo de mistura do meio pobre em oxigênio da base do biorreator, onde a biomassa se acumulou, com o restante do meio da parte superior, durante o restabelecimento da hidrodinâmica. Esses pontos experimentais foram desconsiderados na determinação do  $k_{L,a}$  durante esse período de instabilidade, determinado pelo tempo de mistura (item 5.3.2.2).

O problema agravou-se ao longo do cultivo pelo aumento no tamanho e compactação dos *pellets*, que impõe limitações adicionais à transferência de oxigênio para o interior dos aglomerados de hifas (ROSSI *et al.*, 2002), além do aumento da concentração da biomassa e do conseqüente aumento no consumo de OD. Na Figura 5.26 pode-se observar *pellets* de biomassa de diferentes tamanhos seccionados após um ensaio de viabilidade com cloreto de trifênil tetrazolium (CTT), onde as regiões internas mais claras revelam-se afetadas com sua atividade diminuída, sendo a área afetada maior em *pellets* maiores. Células viáveis reagem com CTT formando um pigmento vermelho.

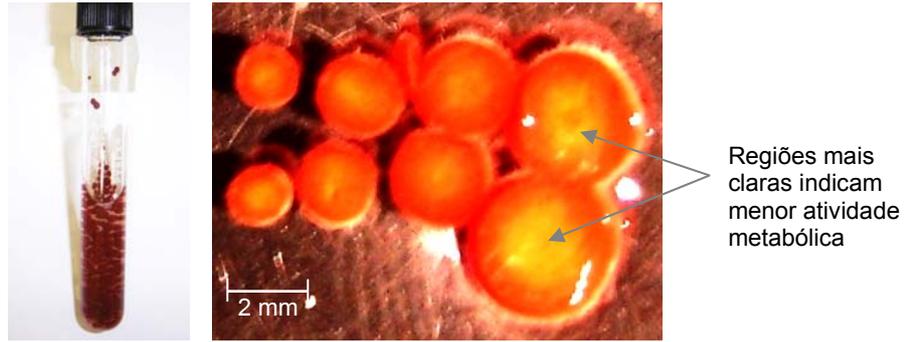


Figura 5.26 Ensaio de viabilidade com CTT onde hifas viáveis reagem formando um pigmento vermelho. No detalhe, *pellets* de biomassa com diâmetro variando entre 1,6 e 4 mm foram seccionados para mostrar o interior.

O coeficiente angular obtido no primeiro trecho da curva (Figura 5.25) permitiu a determinação de  $Q_{O_2}$ , e os pontos do segundo trecho aplicados na Equação 4.28 permitiram a determinação do  $k_{La}$ , também através do coeficiente angular.

Os valores obtidos para  $Q_{O_2}$  são muito baixos (Figura 5.27), sendo afetados pela despressurização. Assim, para cada valor de vazão de ar, dos resultados de  $Q_{O_2} \cdot X$  foi subtraído o valor obtido preliminarmente para o efeito da despressurização (item 5.1.5.4).

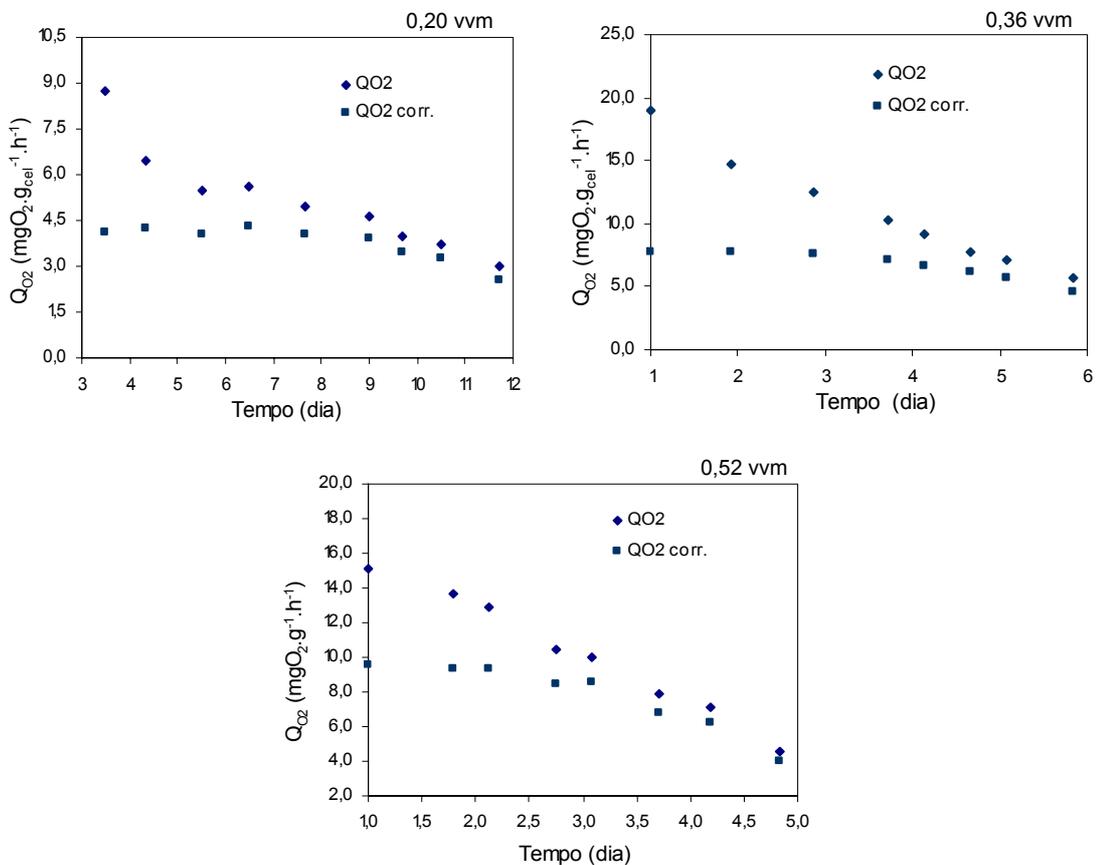


Figura 5.27 Variação experimental da velocidade específica de respiração ( $Q_{O_2}$ ) em função do tempo, e seu valor após corrigido o efeito da despressurização. Cultivo do isolado UFSC-Rh90 em biorreator *airlift* a  $25 \pm 1$  °C em diferentes vazões de ar.

Feito isso, um novo perfil é obtido para a velocidade específica de respiração, revelando um comportamento mais coerente. Sem a correção, essa grandeza demonstrou sempre uma queda muito acentuada desde os primeiros dias de cultivo, não condizendo com as condições do meio de cultura, que estavam mais apropriadas e as concentrações de OD mais altas. A despressurização afetou mais significativamente as medidas iniciais, devido à baixa concentração celular associada à baixa velocidade de consumo, motivo pelo qual não se observa esta correção em outros estudos com microrganismos de crescimento rápido.

A discussão do comportamento de  $Q_{O_2} = f(t)$  será realizada no item 5.4.1, onde as Figuras 5.45, 5.47 e 5.49, referentes a esses cultivos, apresentam também os dados de X e S.

### 5.2.6 Correção do $k_L a$ e $Q_{O_2}$ em função do atraso na resposta do eletrodo

Na Figura 5.28 apresentam-se os dados experimentais da concentração de  $O_2$  dissolvido de um ensaio dinâmico no quarto dia de cultivo do isolado UFSC-Rh90 a 0,52 vvm (item 5.4.1). Também estão locados, no primeiro trecho, a simulação dos pontos teóricos (Equação 4.33) e os dados experimentais corrigidos do atraso na resposta (Equação 4.39), utilizando o  $k_p$  para líquido estático ( $106 \text{ h}^{-1}$ ). No segundo trecho, estão também locados a simulação dos pontos teóricos (Equação 4.37) e os dados experimentais corrigidos para o atraso na resposta do sensor (Equação 4.41), utilizando o  $k_p$  para o líquido agitado ( $389 \text{ h}^{-1}$ ).

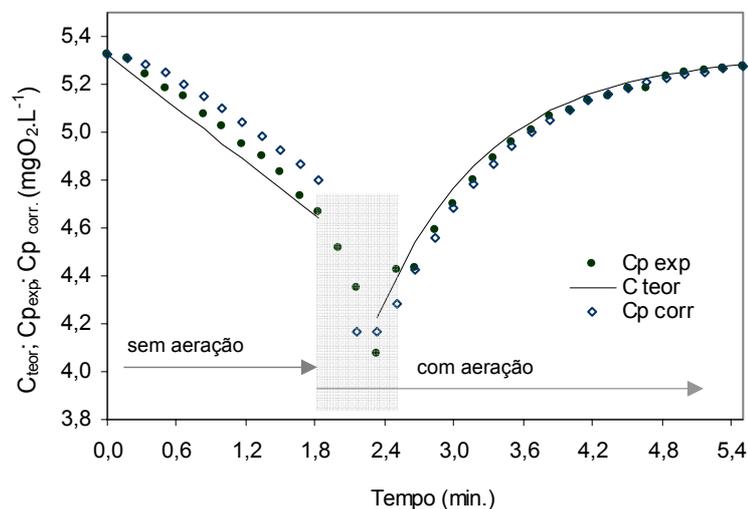


Figura 5.28 Dados experimentais do método dinâmico ( $C_p$ ) obtidos em cultivo do isolado UFSC-Rh90.

A curva corresponde aos dados teóricos ( $C_{teor}$ ) e os pontos vazados representam os valores de  $C_p$  corrigido o atraso devido ao tempo de resposta ( $C_{p,corr}$ ).

No primeiro trecho, verificou-se que a Equação 4.39 não ajustou bem os dados experimentais. O motivo para isso foi o valor muito baixo do  $k_p$ . Independente disso, desconsiderando-se os pontos iniciais do estado transiente devido à existência de bolhas de ar

em instantes seguidos à interrupção da aeração (não previstos pela Equação 4.39), tanto os dados experimentais, quanto os seus valores corrigidos, acompanham bem os valores de  $C$  teóricos. Para tempos elevados no ensaio, o termo  $(k_p \cdot e^{k_p \cdot t})^{-1}$  da Equação 4.39 torna-se desprezível, obtendo-se uma reta paralela à representada pelos pontos teóricos, podendo-se estimar o valor de  $Q_{O_2}X$  através do sinal do eletrodo  $\{C_p = f(t)\}$  (SCHMIDELL, 2001).

Na retoma da aeração (Figura 5.28), depois do estado transiente devido à mistura, já discutido (item 5.2.5), observa-se que tanto os dados experimentais ( $C_p$ ), quanto os corrigidos ( $C_{p,corr}$ ) acompanham bem os valores teóricos previstos pela Equação 4.37. Para valores de  $k_L a$  elevados, como é o caso em biorreatores agitados, a diferença entre  $C$  real e  $C_p$  lido pelo eletrodo é maior, como observado no trabalho de Badino Jr. *et al.* (2000).

No caso deste trabalho, o transiente definido pelo tempo de mistura abrange um tempo de 50 a 60 s, período em que os dados experimentais devem ser desconsiderados para o cálculo do  $k_L a$  (item 5.3.2.2). Neste espaço de tempo, as leituras do eletrodo conseguem estabilizar e acompanhar os valores reais. Assim, tanto os valores para  $Q_{O_2}$  quanto para  $k_L a$ , não necessitam de correção em função do atraso na resposta do eletrodo.

### 5.2.7 Concentração crítica de oxigênio

A Figura 5.29 apresenta o resultado de um ensaio para determinação da concentração crítica de oxigênio durante um cultivo do isolado UFSC-Rh90 a 0,20 vvm (ver também Figura 5.44). A retomada da aeração foi realizada aproximadamente 9 min. após a interrupção, mas, como mostra a figura, em menos da metade desse tempo já ocorreu uma desaceleração no consumo, indicando uma possível limitação. Com a retomada da aeração ocorreu uma queda brusca na concentração de oxigênio, como já observado antes (item 5.2.5), e depois começou a subir, estabilizando após cerca de 10 min. As variáveis avaliadas no momento do ensaio estão apresentadas no Quadro 5.2.

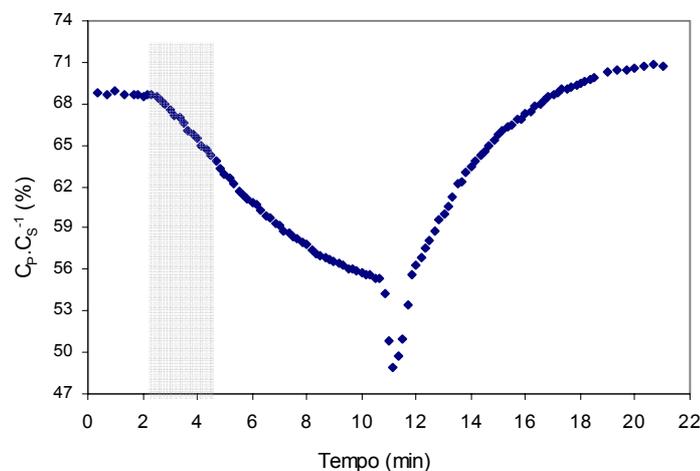


Figura 5.29 Variação na concentração de oxigênio dissolvido ao longo do tempo, devido ao consumo pelo microrganismo, durante interrupção e posterior retomada da aeração. Cultivo do isolado UFSC-Rh90 em biorreator *airlift* a  $25 \pm 1$  °C e 0,2 vvm.

Devido à limitação ocorrida no suprimento de  $O_2$  para o fungo, o estado estacionário (pois a biomassa praticamente não se altera no curto espaço de tempo do ensaio) foi atingido num patamar superior ao do início do ensaio. Pode-se deduzir que foi atingido um ponto crítico, indicado pela alteração no metabolismo, mas não se pode determinar em qual concentração de oxigênio dissolvido isso ocorreu. Devido à sedimentação da biomassa, o início da queda na velocidade de respiração se confunde com a diminuição da concentração de biomassa na região do sensor. Nos primeiros dias de um cultivo, a biomassa é suficientemente leve para permanecer longo tempo em suspensão, e nessa fase inicial o  $C_{crit}$  poderia ser determinado. Entretanto, como durante o cultivo os *pellets* aumentam de tamanho e densidade, agravando as condições de transferência de massa (Figura 5.26), decorre que uma maior concentração de oxigênio dissolvido é necessária para compensar o aumento na resistência ao transporte, tornando  $C_{crit}$  variável, e desse modo, indefinida em cultivo de fungos ectomicorrízicos que formam *pellets* compactos. A instalação de um fragmentador no biorreator poderia contribuir para o estabelecimento de  $C_{crit}$  (APÊNDICE E).

Tempo (dia)	$C_p.C_s^{-1}$ (%)	pH	Glicose residual ( $g.L^{-1}$ )	Biomassa ( $g.L^{-1}$ )	$\mu_x$ ( $dia^{-1}$ )	$Q_{O_2}$ ( $mgO_2.g_{cel}^{-1}.h^{-1}$ )
6,5	69,4	4,52	6,4	2,31	0,42	4,33

Quadro 5.2 Variáveis de cultivo avaliadas no momento da realização do ensaio para determinação de  $C_{crit}$ . O ensaio foi realizado na metade do tempo de cultivo total.

### 5.2.8 Coeficiente de manutenção e fator de conversão de oxigênio para células

O isolado ectomicorrízico UFSC-Rh90, apresentou um consumo de oxigênio variável, em função do nível de atividade observado, para manutenção das atividades vitais, durante o cultivo em biorreator. A Figura 5.30 apresenta os resultados dessa variável (Equação 4.42) para três cultivos, tendo sido obtidos os valores de 1,33, 2,23 e 2,36  $mgO_2.g_{cel}.h^{-1}$ , para vazões de ar de 0,20, 0,36 e 0,52 vvm, respectivamente. Esses valores representaram cerca de 35, 33 e 30% da velocidade específica média de consumo de oxigênio pelo fungo, 3,78, 6,67 e 7,78  $mgO_2.g_{cel}.h^{-1}$  (Figura 5.27). Em condições limitantes, uma proporção maior dos nutrientes é utilizada para manutenção das atividades vitais (manutenção dos gradientes iônicos, osmóticos e de pH, ciclagem de proteínas, ácidos nucléicos, etc.), e seu valor, nesses casos, varia com a velocidade específica de crescimento (PROSSER e TOUGH, 1991). O fator de conversão de oxigênio para células foi da ordem de  $2,4 g_{cel}.gO_2^{-1}$ , considerando-se a média entre os três cultivos.

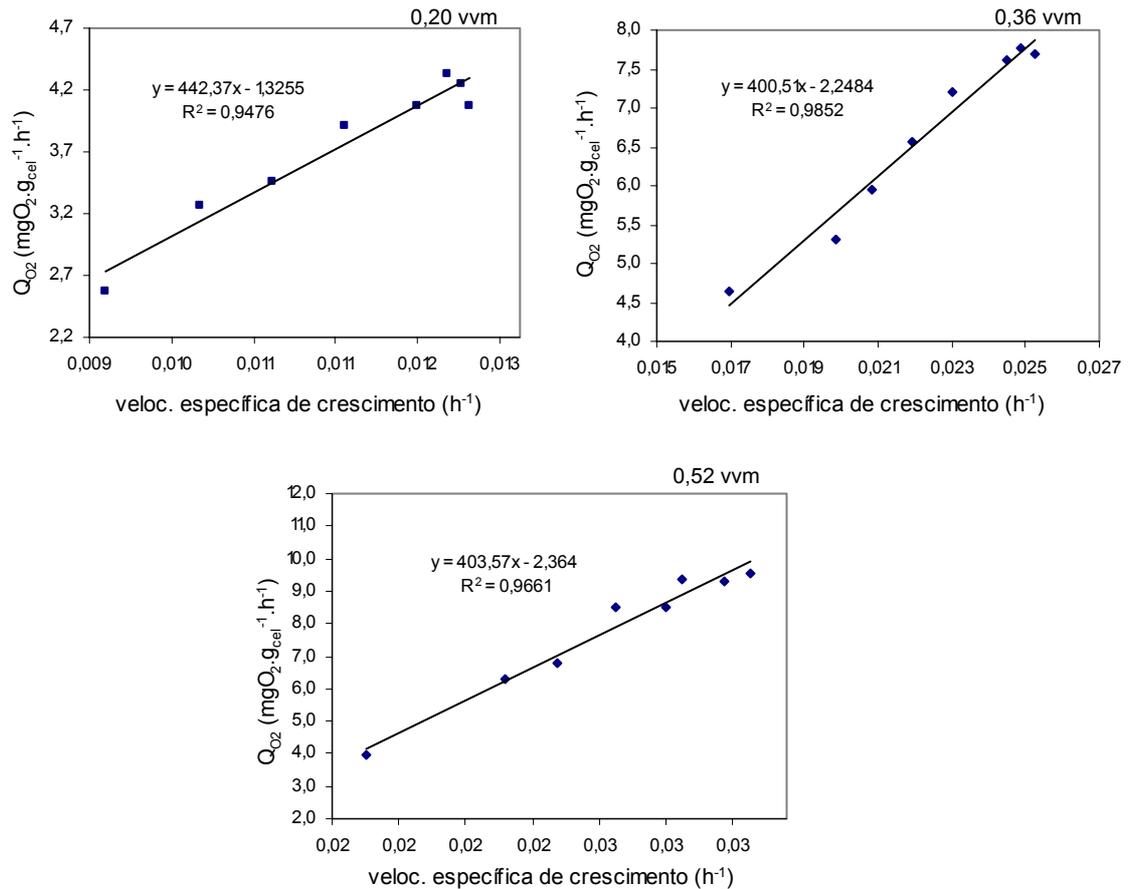


Figura 5.30 Determinação do coeficiente de manutenção para o oxigênio para o cultivo do isolado UFSC-Rh90 nas três vazões de aeração.

### 5.3 Construção do biorreator *airlift* em aço inox

#### 5.3.1 Funcionamento do biorreator

Após a confecção das peças e montagem do biorreator, foram realizados testes de integridade do equipamento. Nos testes de pressão com ar comprimido a 1,5 atm, todas as portas com selos de borracha e válvulas foram reguladas permitindo total vedação, o que foi confirmado durante 24 h sob pressurização. Pequenos vazamentos foram observados em poros de solda. Após a correção do problema, o biorreator foi submetido a testes de assepsia utilizando-se meio de cultivo esterilizado, sem inoculação. Já no primeiro teste, o biorreator foi operado durante 20 dias sem que qualquer contaminação tenha sido detectada. Nesse período, foram realizadas diversas manipulações, como coleta de amostras, variação da vazão e adição de meio de cultura, sem influência sobre a pureza do conteúdo.

Os selos de vapor funcionaram perfeitamente, permitindo total assepsia. Foi necessária a uniformização da massa filtrante para padronizar a perda de carga e seus efeitos na

transferência de oxigênio. O trocador de calor foi eficiente na manutenção da temperatura em todas as situações ambientais testadas e, apesar de o termômetro do *set point* controlar a temperatura da água, a temperatura do meio de cultivo variou entre  $\pm 1$  °C.

Devido às diversas fendas nos encaixes das peças com O-rings (Figura 5.31), foi necessário desmontar completamente e limpar todas as peças antes de cada esterilização, a fim de garantir a assepsia. Essa foi a única causa de contaminação que ocorreu no biorreator. Todas as coletas de amostras, cargas e descargas de meio ocorreram sempre sem contaminações. O orçamento não permitiu a instalação de válvulas de diafragma, mas as válvulas de esfera e de agulha que foram utilizadas funcionaram muito bem.

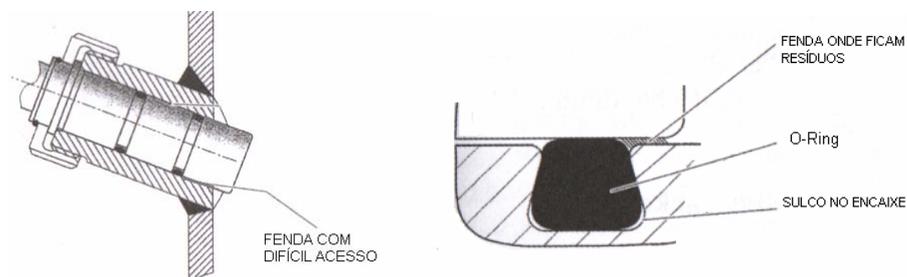


Figura 5.31 Exemplos de locais no biorreator, como portas de sensores e encaixes, que necessitam de desmonte para efetuar uma limpeza correta.

Comparado ao biorreator de vidro (ROSSI, 2001), o biorreator em aço proporcionou as seguintes melhorias:

- Corpo do biorreator durável;
- Operações mais seguras quanto ao aspecto de assepsia;
- O isolamento diminuiu as trocas de calor, permitindo mais economia de energia;
- Possibilitou a pressurização para aumentar a concentração de oxigênio dissolvido;
- Sensor de oxigênio dissolvido esterilizável;
- Esterilização do biorreator no próprio local;
- Selos de vapor nas portas de alimentação, descarga e coleta de amostras;
- Filtro de saída esterilizável de baixo custo, constituído de cartucho com lã de vidro;
- Registro de agulha para maior controle sobre a vazão de ar de entrada;
- Eficiência na amostragem;
- Eficiência na separação do gás, permitindo que as bolhas alcançassem a dispersão antes da entrada de líquido no *downcomer*.

A Figura 5.32 mostra os biorreatores e os equipamentos periféricos. Na imagem menor é possível observar o visor central, o eletrodo de OD e a saída para o coletor de amostras.



Figura 5.32 Arranjo experimental com visão em dois ângulos, mostrando os biorreatores *airlift* construídos em aço inox e em vidro borossilicato, e os equipamentos periféricos.

Uma deficiência no dispositivo experimental foi a falta de um sistema de controle de pH, pois a utilização de agentes tamponantes no meio de cultivo, como será visto, na maioria das vezes não foi satisfatória, devido à grande produção de ácidos pelos fungos ectomicorrízicos. No futuro, com a implementação desse sistema de controle, utilizando eletrodo esterilizável com corpo construído com materiais resistentes como o PTFE (ANEXO B), poderá ser desenvolvido a automação e controle para as principais variáveis de processo (OD, pH,  $pCO_2$ , T,  $U_g$ , P), sendo esta, também, uma sugestão para outro trabalho.

O diâmetro do duto de amostragem permitiu a coleta de amostras com distribuição uniforme da biomassa, para todos os tamanhos de *pellets* formados (Figura 5.33 e 5.34). A pressão hidrostática devido à altura da coluna de líquido, mais a pressão devida à resistência do filtro de saída dos gases, contribuíram para a eficiência da amostragem.



Figura 5.33 Seqüências de amostras de dois cultivos do isolado UFSC-Rh90 no biorreator *airlift*.



Figura 5.34 Biomassa de dois diferentes cultivos do isolado UFSC-Rh90 no biorreator *airlift* em inox, mostrando a diferença entre o tamanho dos *pellets*, resultantes de inóculos preparados com diferentes tempos de fragmentação.

É importante considerar os problemas que o vácuo gerado pelo rápido resfriamento pode causar em vasos sob pressão, dimensionando-se os filtros de entrada de ar de modo a suprir a vazão máxima requerida nessa situação. Por não permitir a passagem de vapor úmido, a membrana do filtro de ar de entrada era esterilizada separadamente em autoclave, juntamente com seus acessórios (mangueira de silicone e registro com encaixe para selo de vapor). Desse modo, não era possível com a devida rapidez injetar ar no biorreator logo após a interrupção do vapor direto ao término da esterilização. Entretanto, a robustez do filtro de saída permitiu a entrada de ar filtrado suficiente, compensando o vácuo gerado e eliminando o risco de danos à integridade do biorreator, e, também, a possibilidade de perda de assepsia pela entrada de ar contaminado.

### 5.3.2 Caracterização hidrodinâmica

Neste item são feitas algumas comparações com os resultados de Pedrini (1997), pois as relações geométricas de seu trabalho foram a base do projeto deste novo biorreator. Esse autor realizou estudos hidrodinâmicos preliminares num biorreator *airlift* construído com tubos e conexões de PVC, utilizando uma faixa de vazão específica de ar muito elevada, chegando a atingir aproximadamente 2,5 vvm, criando complicações para a obtenção dos dados experimentais. Posteriormente, construiu um biorreator em vidro borossilicato com 6,5 L de capacidade, o qual operou com vazões de 0,2 a 0,7 vvm, faixa que considerou, pelos resultados do protótipo em PVC, ser de escoamento homogêneo. As hidrodinâmicas do protótipo e do biorreator de vidro foram bem distintas, sendo tal diferença atribuída à geometria dos biorreatores (altura do protótipo cerca de 30% maior). Entretanto, uma diferença dessa ordem não poderia afetar em cerca de 100% a velocidade de circulação de líquido e nem 80% o gás *holdup*, como apontam seus resultados.

Outro resultado contraditório é o fato de a mudança do regime de bolhas, de homogêneo para heterogêneo (que se esperava ser apenas homogêneo), ocorrer no biorreator de vidro

numa velocidade de gás aproximadamente 3 vezes inferior a do protótipo. Assim, por coerência, todas as comparações feitas a seguir referem-se aos resultados obtidos por esse autor com o biorreator de vidro.

Muitos fluidos de fermentação podem ser simulados com analogia a suas propriedades reológicas e hidrodinâmicas. Soluções de açúcares, glicerol, glicóis, polímeros (CMC, poliacrilamida, goma xantana), proteínas e fibras, são utilizados para simular diversos sistemas microbiológicos de interesse. Também é bem conhecida a utilização de soluções salinas para simular diversos sistemas microbianos que se comportam como fluidos Newtonianos (HIKITA *et al.*, 1980; CHISTI, 1989). Para a caracterização hidrodinâmica do biorreator, o meio de cultura foi simulado com uma solução de 0,15 M de NaCl (com água de torneira), que reproduz a força iônica característica de sistemas fermentativos, simulando a coalescência de bolhas dos meios de cultura reais, além dos efeitos dos sais no coeficiente de transferência de massa.

Embora seja recomendado que a calibração do sensor de oxigênio dissolvido seja feita utilizando-se o ar, a mesma foi realizada no líquido ou meio de cultura, pois observaram-se pequenas diferenças, devidas, possivelmente, à pressão da coluna de líquido sobre a membrana do sensor.

Os parâmetros hidrodinâmicos obtidos para o biorreator *airlift* de inox com 5 L de capacidade, para uma faixa de vazão de ar entre 0,2 e 5 L.min<sup>-1</sup>, são apresentados no quadro 5.3. Os valores em destaque foram aqueles estabelecidos para os estudos de transferência de massa. Para a faixa de vazão estudada, a reprodutibilidade ficou abaixo de 9%. Para vazões elevadas podem ser obtidas variações de ±10% devido às flutuações mais pronunciadas no nível da dispersão no separador de gás (CHISTI, 1989).

Vazão de ar (L.min <sup>-1</sup> ) (vvm)		U <sub>g</sub> (m/s)	Gás-holdup (ε)	U <sub>Ld</sub> (m/s)	U <sub>Lr</sub> (m/s)	Erro (%)
0,2	0,04	0,001	0,006	0,17	0,018	<1,5
0,6	0,12	0,002	0,011	0,24	0,026	<1,5
<b>1,0</b>	<b>0,20</b>	<b>0,004</b>	<b>0,016</b>	<b>0,30</b>	<b>0,033</b>	<1,5
1,4	0,28	0,006	0,020	0,35	0,038	<1,5
<b>1,8</b>	<b>0,36</b>	<b>0,007</b>	<b>0,023</b>	<b>0,43</b>	<b>0,046</b>	±1,5
2,2	0,44	0,009	0,028	0,44	0,047	±2,3
<b>2,6</b>	<b>0,52</b>	<b>0,010</b>	<b>0,032</b>	<b>0,46</b>	<b>0,050</b>	±3,5
3,0	0,60	0,012	0,037	0,49	0,053	±4,5
3,4	0,68	0,014	0,039	0,47	0,051	±5,6
3,8	0,76	0,015	0,041	0,54	0,059	±6,7
4,2	0,84	0,017	0,044	0,59	0,064	±7,8
4,6	0,92	0,018	0,045	0,68	0,073	< 9,0
5,0	1,00	0,020	0,045	0,70	0,076	< 9,0

Quadro 5.3 Parâmetros hidrodinâmicos obtidos experimentalmente em solução fisiológica, para caracterização do biorreator *airlift* construído em aço inox.

### 5.3.2.1 Gás *holdup* e velocidade de circulação de líquido

A Figura 5.35 mostra a velocidade superficial do líquido no *riser* ( $U_{Lr}$ ) e o gás *holdup* ( $\epsilon$ ) em função da vazão de ar. Como esperado, o gás *holdup* aumentou com o aumento da velocidade superficial do gás ( $U_g$ ), em proporções tipicamente decrescentes. As inflexões no perfil da  $U_{Lr}$  (Figura 5.35a) podem indicar a transição entre os regimes de bolhas de homogêneo para heterogêneo (ROSSI *et al.*, 2005a).

O aumento do gás *holdup* associado ao aumento da turbulência no sistema favorece a coalescência das bolhas de ar, aumentando a velocidade de subida das bolhas e a velocidade de circulação que, por sua vez, afeta o gás *holdup*. Padrões semelhantes são comumente observados na literatura, mesmo para as mais diferentes geometrias (LI *et al.*, 1995; ABASHAR, *et al.*, 1998; ATENAS, *et al.*, 1999; CHISTI e JAUREGUI-HAZA, 2002; MENG, *et al.*, 2002; GOUVEIA *et al.*, 2003).

Na Figura 5.35b, o perfil da curva de gás *holdup* dos dados de Pedrini (1997) sugerem dificuldades para sua determinação em baixas vazões de ar utilizando diferenças da pressão manométrica.

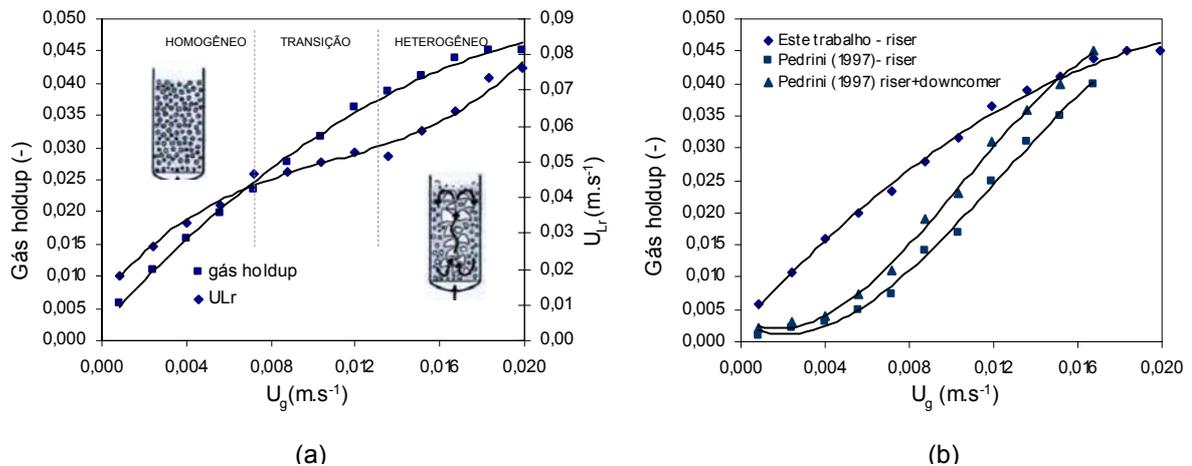


Figura 5.35 Comparação entre a velocidade superficial de líquido e gás *holdup* em diferentes vazões de ar (a). Comparação entre os valores de gás *holdup* obtidos neste trabalho e os obtidos por Pedrini (1997) (b).

A Figura 5.36a apresenta uma comparação de dados da velocidade de circulação de líquido com dados do trabalho de Pedrini (1997). Observa-se uma diferença média de 43%, evidenciando a considerável melhoria na desempenho do biorreator em função das modificações feitas no separador de gás. A entrada de gás no *downcomer* exerce um fluxo contrário prejudicial à circulação de líquido.

Existem correlações que permitem prever o gás *holdup* em função da velocidade superficial do gás, sendo a previsão delimitada pelo alcance de certos parâmetros como o

tipo de fluido,  $H$ ,  $L_{cp}$ ,  $A_d/A_r$  e  $U_g$ . Assim, as diferenças observadas entre os valores experimentais deste trabalho e os valores obtidos através de diferentes correlações teóricas propostas por outros autores (Figura 5.36b) devem-se ao fato de que nem todos os parâmetros do projeto do biorreator em análise terem seus valores dentro dos limites dos parâmetros dessas correlações.

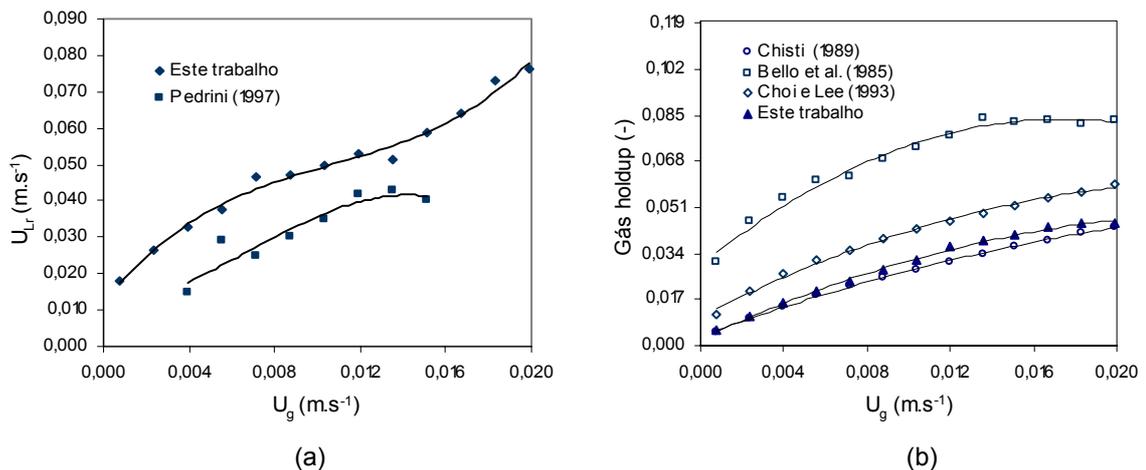


Figura 5.36 Velocidade de circulação do líquido no *riser* em função da velocidade superficial do gás (a). Comparação entre os valores de gás *holdup* experimentais e teóricos (b).

Apesar de ser remota a possibilidade de anoxia no *downcomer* (onde ocorre somente consumo de oxigênio) durante o uso de biorreatores *airlift* para cultivo de fungos ectomicorrízicos, é importante considerar a melhoria alcançada na velocidade de circulação do líquido quando esse sistema é empregado. Quando aplicado para microrganismos mais exigentes, e/ou em escalas maiores, deverá ser considerada a possibilidade de haver uma concentração de oxigênio abaixo da crítica no *downcomer*, devido ao comprimento do mesmo.

Em casos extremos de baixa transferência de massa, como em fluidos muito viscosos, deve-se considerar, inclusive, a possibilidade de fazer a injeção de ar no *downcomer* (JIN *et al.*, 2001) para evitar limitações nesse trajeto que poderiam afetar o metabolismo. Certamente a entrada de ar no *downcomer* alteraria a hidrodinâmica do biorreator e precisaria ser reavaliada.

### 5.3.2.2 Tempo de mistura

A qualidade da mistura é um fator crítico para o desempenho de um biorreator. Uma boa mistura deverá fornecer oxigênio e nutrientes suficientes, além de manter homogêneo o pH, evitando reações paralelas ao processo e a morte de células. A Figura 5.37 apresenta os resultados de um ensaio para determinação do tempo de mistura na vazão de ar de 0,20 vvm.

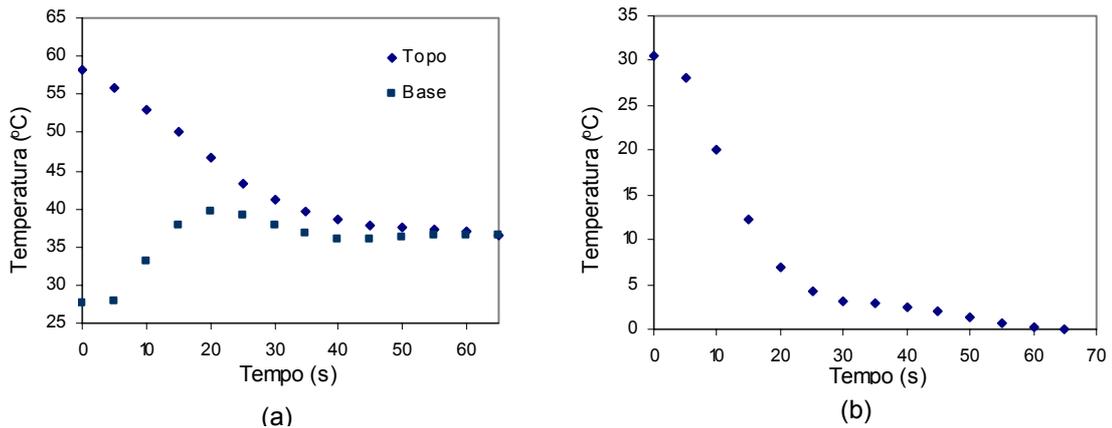


Figura 5.37 Determinação do tempo de mistura no biorreator *airlift* em inox para vazão de ar de 0,2 vvm. Perfil da temperatura do topo e da base (a) e diferença de temperatura entre o topo e a base (b).

Decorreram 50 s para atingir aproximadamente 95% da mistura a 0,20 vvm, 45 s a 0,36 vvm e 40 s a 0,52 vvm. Embora nenhum reator de batelada possa ser considerado um misturador perfeito, a suposição de mistura completa é justificada pelo fato de as medidas em diferentes pontos de amostragem não afetarem mais que  $\pm 10\%$  na reprodutibilidade de valores típicos do  $k_L a$  (CHISTI, 1989).

O resultado desse ensaio serviu para definir os pontos experimentais iniciais a desconsiderar para determinação dos valores de  $k_L a$ , uma vez que, até o desenvolvimento completo da hidrodinâmica, as leituras da concentração de oxigênio foram afetadas pela mistura. Por exemplo, num cultivo realizado a 0,20 vvm, ao se reiniciar a aeração durante a realização de um ensaio dinâmico, o estabelecimento da hidrodinâmica ocorre após 50 s (Figura 4.25). Assim, pelo menos 5 pontos experimentais iniciais foram desprezados para o cálculo do  $k_L a$ . Esse tempo também foi importante para o re-estabelecimento da pressão no biorreator e estabilização dos valores pelo eletrodo de OD, tornando-se desnecessária a correção em função do atraso na resposta (item 5.2.6).

### 5.3.2.3 Coeficiente de atrito

O coeficiente de atrito ( $K_B$ ) representa a perda de energia devido ao atrito nas conexões e devido às mudanças de direção do fluxo de líquido entre o *riser* e o *downcomer*. É um parâmetro importante para prever a velocidade do líquido no *riser* nos processos de aumento de escala (van BENTHUM *et al.*, 2000; BURRIS *et al.*, 2002).

Nos gráficos da figura 5.38 estão locados os valores da velocidade de circulação de líquido em função dos valores das variáveis independentes da Equação 4.47, fornecendo o valor do coeficiente angular  $K_B^{-0,5}$ . Assim, na Figura 5.38 obteve-se o valor do coeficiente de atrito ( $K_B$ )

igual a 2,15 para o biorreator em inox. Pedrini *et al.* (1996) apontam um valor de 4,3 para o  $K_B$ , obtido com os dados experimentais do *airlift* protótipo em PVC.

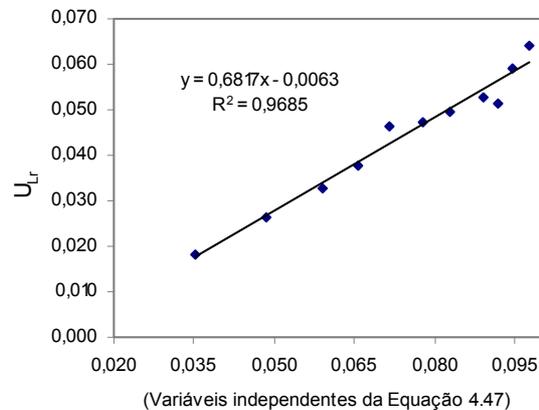


Figura 5.38 Determinação do coeficiente de atrito através da aplicação dos experimentais e da geometria do biorreator na Equação 4.47, tendo como coeficiente angular o valor de  $K_B^{-0,5}$ .

Essa diferença talvez seja resultante das modificações feitas no separador de gás e na inclinação da entrada do *downcomer* que reduziram o atrito e aumentaram a velocidade de circulação de líquido. O valor de  $K_B$  obtido por Verlaan (citado por CHISTI, 1989, p.209) foi de 1,81 para um *airlift* de circulação externa com altura cerca de 3 vezes maior que os biorreatores em discussão. Esse parâmetro, importante para prever a velocidade de circulação de líquido nas situações de aumento de escala, é dependente da geometria do biorreator, sendo esperado valores diferentes quando se procedem mudanças de projeto (ONKEN e WEILAND, 1980; CHISTI, 1989; van BENTHUM *et al.*, 2000; BURRIS *et al.*, 2002).

#### 5.3.2.4 Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio

O coeficiente de transferência de oxigênio ( $k_{L,a}$ ) foi coerente com os valores de gás *holdup* e sua correlação está apresentada na Figura 5.39-a. Os dados divergiram das correlações teóricas (Figura 5.39-b) pelos mesmos motivos já apontados para o gás *holdup*. Com relação aos dados de Pedrini (1997), as diferenças aumentam com o aumento da vazão e não devem estar somente relacionadas com a eficiência da separação do gás, mas, também, com o maior tamanho de bolha que se forma em água pura. A solução 0,15 M de NaCl, se, por um lado, diminuiu a solubilidade do oxigênio, por outro, diminuiu a coalescência das bolhas, melhorando a transferência de massa. O valor da constante de atraso do eletrodo ( $389 \text{ h}^{-1}$ ) foi 5 vezes superior ao maior valor para o  $k_{L,a}$ , obtido na vazão de 1,0 vvm, não havendo necessidade de correção dos valores de  $k_{L,a}$  em função do tempo de resposta do eletrodo (*cf.* já observado no item 5.2.4).

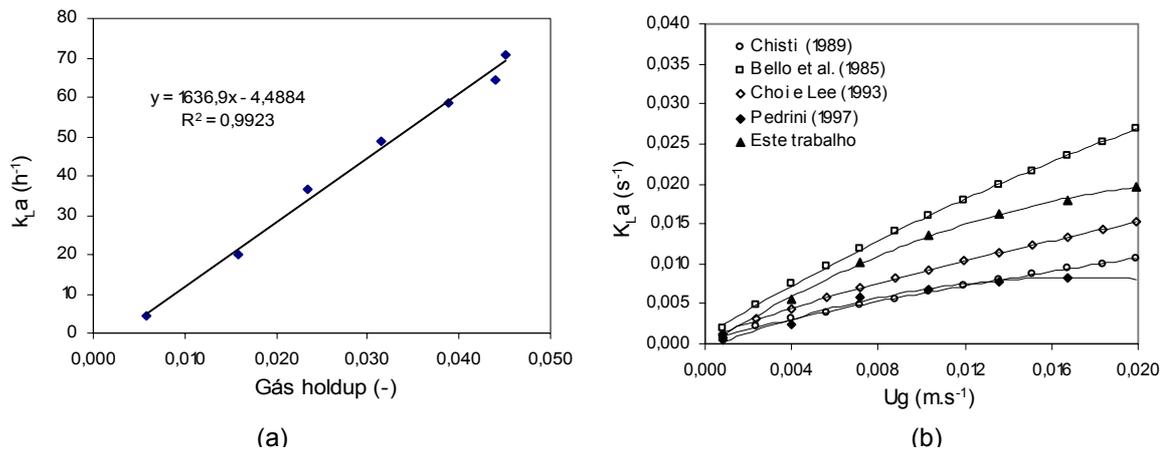


Figura 5.39 Variação do  $k_{L,a}$  em função do gás *holdup* (a). Valores do  $k_{L,a}$  experimentais e valores obtidos através de correlações teóricas (b).

No Quadro 5.4 são apresentados os valores de  $k_{L,a}$  retirados da literatura para diversos biorreatores, além de outros parâmetros hidrodinâmicos já discutidos. É interessante comparar os resultados deste projeto (ROSSI *et al.*, 2005a) com os de Gouveia *et al.* (2003), obtidos para um biorreator *airlift* de 6 L com circulação interna.

$\epsilon$ (-)	$U_{Lr}$ ( $m.s^{-1}$ )	$t_m$ (s)	$k_{L,a}$ ( $h^{-1}$ )	Tipo de biorreator	Composição da fase líquida	V (L)	Referência
0,020	0,20	-	2,5	<i>Airlift</i> circulação interna	Solução 2% CMC	55	Li <i>et al.</i> (1995)
0,075	0,015	-	33	<i>Airlift</i> circulação externa	Água torneira	6,5	Pedrini <i>et al.</i> (1996)
0,015	0,60	-	-	<i>Airlift</i> circulação externa	Água torneira	725	Abashar <i>et al.</i> (1998)
0,10	0,15	25	-	<i>Airlift</i> circulação externa	Água e cápsulas de alginato	60	Freitas <i>et al.</i> (2000)
-	-	-	250	Tanque agitado 700 rpm e 0,3 vvm	Meio cultura	9	Badino Jr. <i>et al.</i> (2001)
0,03	-	-	9	<i>Airlift</i> circulação interna híbrido (s/agit. mecânica)	Solução 2% fibra celulose	1200	Chisti e Jaureghi-Haza (2002)
0,03	-	-	15	<i>Airlift</i> circulação interna híbrido (170 rpm)	Solução 2% fibra celulose	1200	Chisti e Jaureghi-Haza (2002)
0,03	-	-	43	<i>Airlift</i> circulação interna híbrido (260 rpm)	Solução 2% fibra celulose	1200	Chisti e Jaureghi-Haza (2002)
0,025	0,20	-	-	<i>Airlift</i> circulação externa com leite em Nylon empacotado	Água torneira	12	Meng <i>et al.</i> (2002)
0,02	0,032	30	72	<i>Airlift</i> circulação interna	Solução sulfito	6	Gouveia <i>et al.</i> (2003)
0,045	0,076	25	71	<i>Airlift</i> circulação externa	Solução 0,15 M NaCl	5	Rossi <i>et al.</i> (2005a)

Quadro 5.4 Comparação dos parâmetros hidrodinâmicos de diversos trabalhos obtidos para diferentes biorreatores, para uma velocidade de gás ( $U_g$ ) igual a  $0,02 m.s^{-1}$ .

A diferença observada no gás *holdup* é porque no biorreator desenvolvido por Gouveia *et al.* (2003), o *downcomer* detém cerca de 30% do volume total, enquanto que no biorreator deste trabalho o volume do *downcomer* é de apenas 7%. Apesar dessa diferença, os valores de  $k_{L,a}$

foram semelhantes no dois reatores, apontando uma incoerência. Na determinação desse parâmetro esses autores utilizaram o método do sulfito, em vez de nitrogênio como foi utilizado no presente estudo. É provável que o valor real do  $k_{La}$  do biorreator estudado por esses autores seja inferior ao observado. É sabido que altas concentrações de sulfito, utilizado para remover o oxigênio, tornam o líquido não coalescente, o que não ocorre no meio de cultura. Tal fato pode levar a uma superestimação desse parâmetro (SCHMIDELL, 2001).

Outra correlação para o  $k_{La}$  pode ser obtida em função da velocidade superficial do gás, como a do tipo  $k_{La} \propto (U_g)^\beta$ , onde os parâmetros  $\propto$  e  $\beta$  podem ser ajustados através dos dados experimentais fornecendo a seguinte equação:

$$k_{La} = 2580 \cdot U_g^{0,9} \quad (5.1)$$

( $k_{La}$  em  $h^{-1}$  e  $U_g$  em  $m \cdot s^{-1}$ )

### 5.3.2.5 Determinação da pressão no topo do biorreator

A variação da pressão no topo do biorreator, causada pela resistência imposta à passagem dos gases pelo filtro de saída, obtida para diferentes velocidades superficiais do gás, é apresentada na Figura 5.40. Nessa figura, também está representada a velocidade superficial do líquido, podendo-se perceber a mesma tendência de comportamento que a pressão, indicando a provável mudança de regime de bolhas, de homogêneo para heterogêneo, a partir de  $U_g \approx 0,01 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ . Foi utilizado o valor de pressão, para cada vazão correspondente, para calibrar o sensor de OD, antes de cada cultivo.

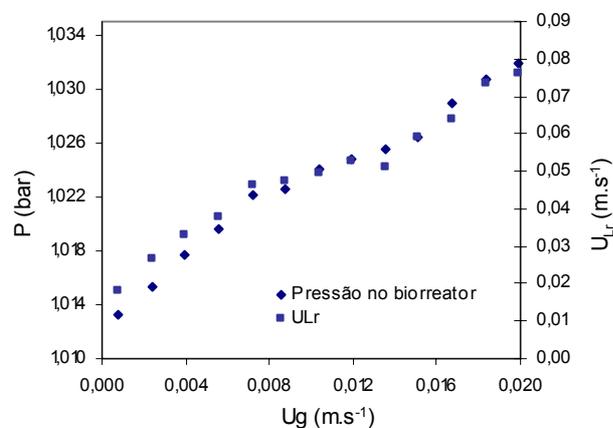


Figura 5.40 Pressão no topo do biorreator e velocidade superficial de líquido em relação à velocidade superficial do gás, a  $25 \pm 0,2 \text{ } ^\circ\text{C}$ .

O perfil da pressão, concordante com a velocidade de circulação de líquido, confirma a adequabilidade da metodologia simples que foi utilizada. A velocidade do líquido é o resultado da diferença de densidade entre o *riser* e o *downcomer* e, também, da velocidade de subida das bolhas de ar. O desprendimento dessas bolhas na dispersão é responsável, também, pela pressão formada no topo. Uma maior ou menor velocidade de circulação implica num maior ou menor efeito sobre a pressão.

O efeito da despressurização do biorreator sobre as medidas de oxigênio dissolvido, quando da interrupção da aeração para execução do método dinâmico, foi discutido no item 5.1.6.4.

## 5.4 Produção de inoculantes

Por definição, a velocidade específica de crescimento é a velocidade de crescimento de uma unidade de massa de células. Desta forma, a quantidade de biomassa não deve influenciar essa velocidade, a não ser que fenômenos como “quorum sensing” estejam envolvidos. Entretanto, para o crescimento na forma de aglomerados de hifas, ou *pellets*, que é o caso dos fungos estudados neste trabalho, observou-se que o tamanho do inóculo (concentração de biomassa vs. tamanho inicial dos propágulos) pode afetar a velocidade específica de crescimento.

Como observado nos resultados do estudo da viabilidade das suspensões micelianas (item 5.1.2), a perda da viabilidade parece estar relacionada a uma condição tóxica e não aos danos físicos da fragmentação. A padronização do inóculo torna-se uma tarefa difícil, devido a esses e outros fatores, como o estado fisiológico do fungo, mas é muito importante para a realização dos estudos de produção de inoculantes, principalmente em relação à cinética e transferência de massa.

### 5.4.1 Cultivo em biorreator e estudos cinéticos

Embora vários cultivos tenham sido realizados em biorreator *airlift* com diversos isolados de fECM, visando a produção de biomassa, os resultados apresentados a seguir referem-se somente ao isolado UFSC-Rh90. Esse isolado tem se mostrado um modelo adequado para os estudos de transferência de massa por apresentar grande tolerância às alterações de meio que ocorrem durante o cultivo.

A Figura 5.41a apresenta os resultados de um cultivo realizado no biorreator *airlift* de vidro, com uma vazão específica de ar de 0,40 vvm (ROSSI *et al.*, 2003). Durante o cultivo, formaram-se *pellets* esféricos com 0,5 a 3,0 mm de diâmetro (Figura 5.42). O pH caiu continuamente atingindo 3,9 ao final do cultivo. Aparentemente não houve inibição durante o cultivo, com a fase de maior crescimento aproximando-se de uma exponencial, com valor de

0,65 dia<sup>-1</sup> para a velocidade específica de crescimento (Figura 5.43). Essa velocidade é mais que 3 vezes superior à do cultivo em frascos estáticos.

A conversão de substrato em biomassa foi da ordem de 47% (Figura 5.41-b) e a produtividade do cultivo de 1,24 g.L<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>.

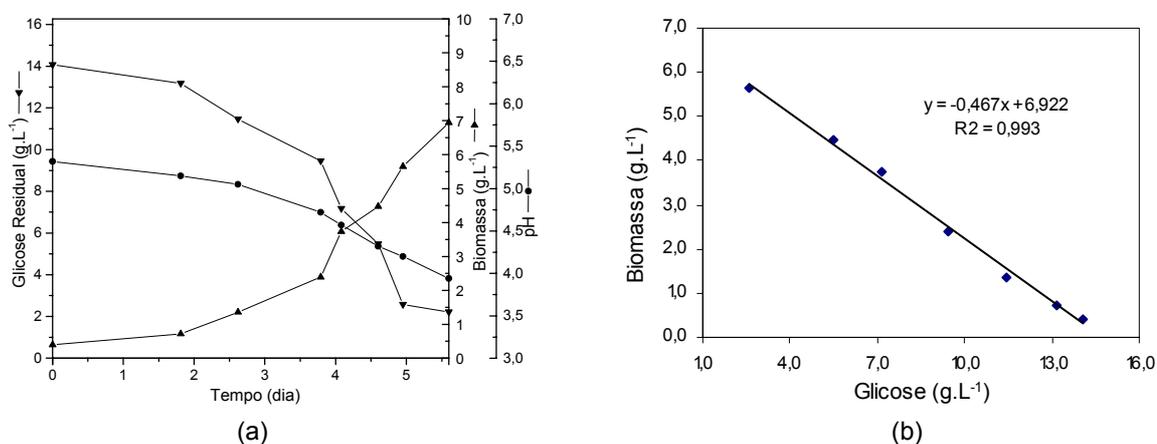


Figura 5.41 Produção de biomassa, consumo de glicose, variação do pH (a), e determinação da conversão de glicose em biomassa (b) o cultivo do isolado UFSC-Rh90 em biorreator *airlift* de vidro a 25±1 °C e 0,40 vvm.



Figura 5.42 Crescimento na forma de *pellets* densos em biorreator *airlift*.

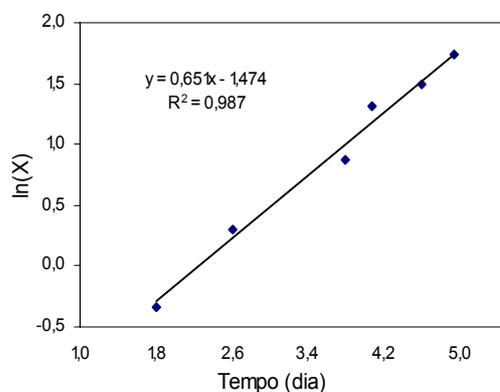


Figura 5.43 Determinação da velocidade específica de crescimento média durante o cultivo do isolado UFSC-Rh90 em biorreator *airlift* de vidro a 25±1 °C e 0,40 vvm.

Nas Figuras 5.44 a 5.50 estão os resultados de três cultivos do isolado UFSC-Rh90, em biorreator de aço inox de 5 L, nos três valores de vazão de ar estabelecidos para o estudo de transferência de oxigênio. Analisando esses resultados, observa-se, de modo geral, que os valores das variáveis cinéticas diminuem com o decorrer do cultivo. Como a viscosidade muda pouco, a pequena queda verificada nos valores de  $k_{La}$ , em média 5% (Quadro 5.5), deve-se, também, ao aumento da biomassa que favorece a coalescência das bolhas de ar (ROSSI *et al.*, 2005b), devido à redução do volume livre para tais bolhas ou, ainda, devido à fixação da biomassa no distribuidor de ar, alterando o padrão de formação de bolhas. De acordo com Jin *et al.* (2001), grandes variações para essa grandeza se verificam em líquidos viscosos.

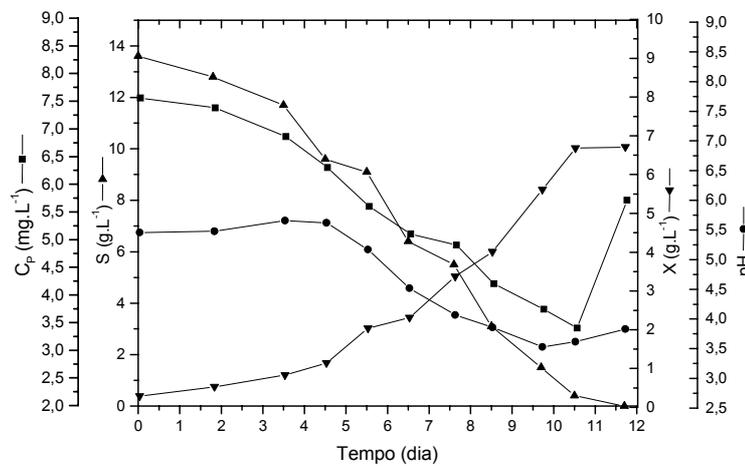


Figura 5.44 Consumo de glicose, produção de biomassa, variação do pH e do oxigênio dissolvido durante o cultivo do fungo *Rhizopogon nigrescens* (UFSC-Rh90) em biorreator *airlift* a  $25 \pm 1$  °C e 0,20 vvm.

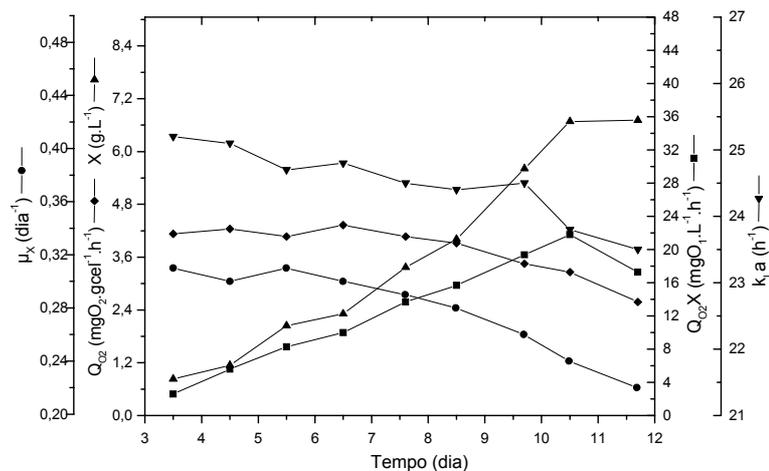


Figura 5.45 Perfis de velocidade específica de crescimento, velocidade específica de respiração, concentração de biomassa, velocidade de consumo de oxigênio e do coeficiente de transferência de oxigênio, em relação ao tempo, durante o cultivo do fungo *Rhizopogon nigrescens* (UFSC-Rh90) em biorreator *airlift* a  $25 \pm 1$  °C e 0,20 vvm.

A discussão dos resultados é dificultada devido à limitação do número de amostras. Entretanto, percebe-se que a partir da metade da concentração celular final, as variáveis  $\mu_x$  e  $Q_{O_2}$  diminuíram mais rapidamente (Figuras 5.45, 5.47 e 5.49), verificando-se um rápido aumento da pigmentação do meio de cultura até um valor máximo na absorbância de 0,675 nm (Figuras 5.46 e 5.48). Essa pigmentação foi muito menos intensa que a observada no cultivo de outros isolados, como os do gênero *Pisolithus* (ROSSI *et al.*, 2002), estando estreitamente relacionada com o aumento da biomassa. Após atingir esse valor máximo, a pigmentação passa a diminuir (veja-se também a Figura 5.51), podendo-se notar entre os dois cultivos que o ponto de inflexão do índice de cor não esteve associado a um valor específico de pH, nem à concentração de biomassa ou de oxigênio dissolvido, mas coincidindo para uma mesma concentração desses pigmentos. Observou-se, também, que ao mesmo tempo em que a pigmentação do meio diminuía, a dos *pellets* de biomassa aumentava.

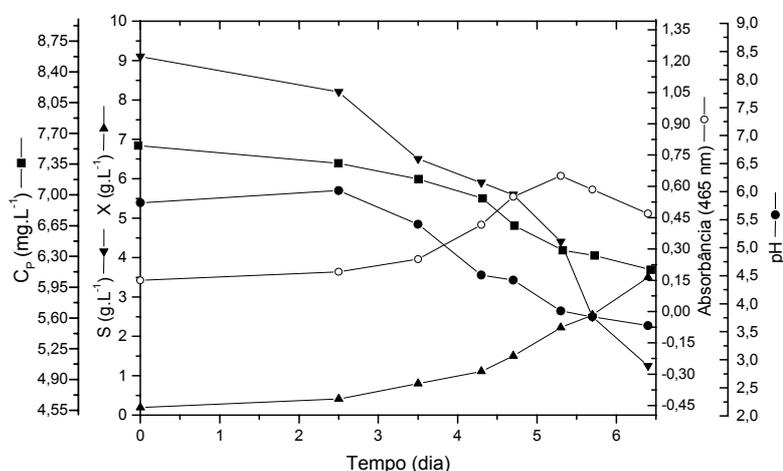


Figura 5.46 Consumo de glicose, produção de biomassa, variação do pH e do oxigênio dissolvido durante o cultivo do fungo *Rhizopogon nigrescens* (UFSC-Rh90) em biorreator *airlift* a  $25 \pm 1$  °C e 0,36 vvm.

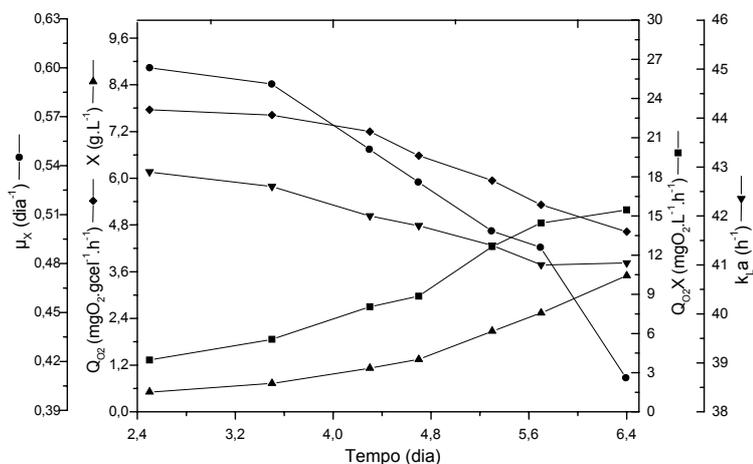


Figura 5.47 Perfis de velocidade específica de crescimento, velocidade específica de respiração, concentração de biomassa, velocidade de consumo de oxigênio e do coeficiente de transferência de oxigênio, em relação ao tempo, durante o cultivo do fungo *Rhizopogon nigrescens* (UFSC-Rh90) em biorreator *airlift* a  $25 \pm 1$  °C e 0,36 vvm.

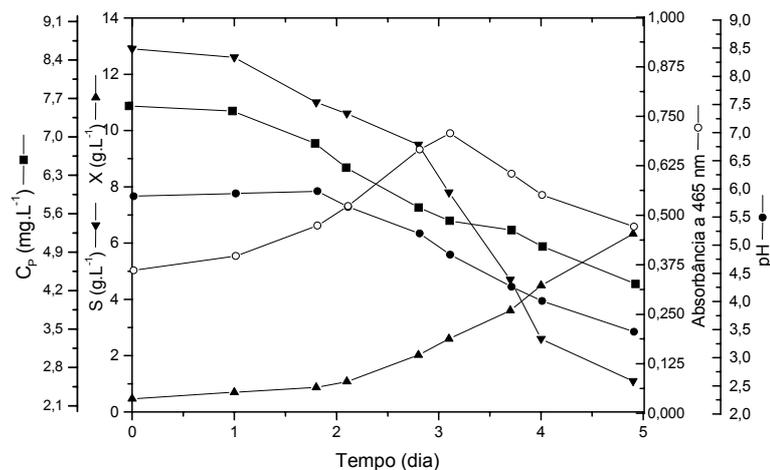


Figura 5.48 Consumo de glicose, produção de biomassa, variação do pH e do oxigênio dissolvido durante o cultivo do fungo *Rhizopogon nigrescens* (UFSC-Rh90) em biorreator *airlift* a  $25 \pm 1$  °C e 0,52 vvm.

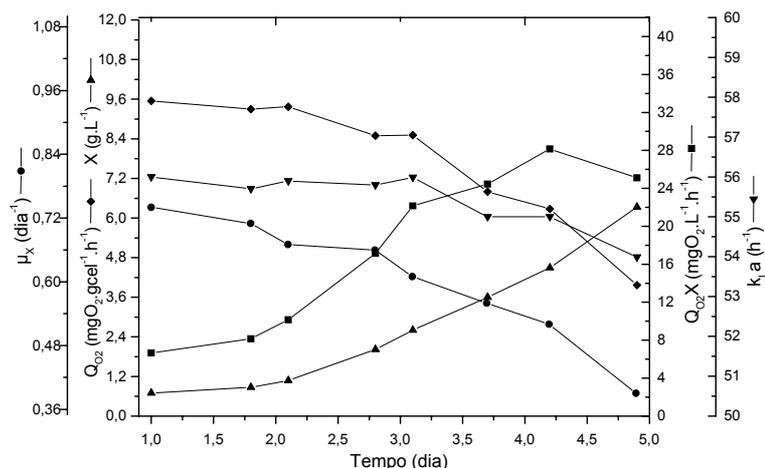


Figura 5.49 Perfis de velocidade específica de crescimento, velocidade específica de respiração, concentração de biomassa, velocidade de consumo de oxigênio e do coeficiente de transferência de oxigênio, em relação ao tempo, durante o cultivo do fungo *Rhizopogon nigrescens* (UFSC-Rh90) em biorreator *airlift* a  $25 \pm 1$  °C e 0,52 vvm.

Num teste de viabilidade com suspensões micelianas dos isolados UFSC-Ch163, que produz pouca pigmentação, e UFSC-Pt188, que produz muita pigmentação, a viabilidade das amostras foi mantida graças à adição de carvão. Um ensaio para verificar a presença de compostos fenólicos totais no extrato de cultivo, detectou, tanto nas amostras com carvão quanto naquelas sem carvão, concentrações elevadas de compostos fenólicos de alto peso molecular. Isso pode significar que esses fungos apresentam um mecanismo de proteção contra os compostos fenólicos por meio da polimerização desses. Assim a perda da viabilidade observada nas amostras sem carvão deve estar relacionada a outros tipos de metabólitos.

No caso do isolado UFSC-Rh90, sua escolha como modelo para esses estudos foi pela habilidade de manter a viabilidade por longos períodos e em diferentes condições de cultivo. Entretanto, a cinética de crescimento desse isolado foi afetada, seja em função das tolerância a condições de cultivo desfavoráveis, ou da grande variação no pH, ou limitações de  $O_2$  para o interior dos *pellets* ou, ainda, pela ação conjunta de todos esses fatores.

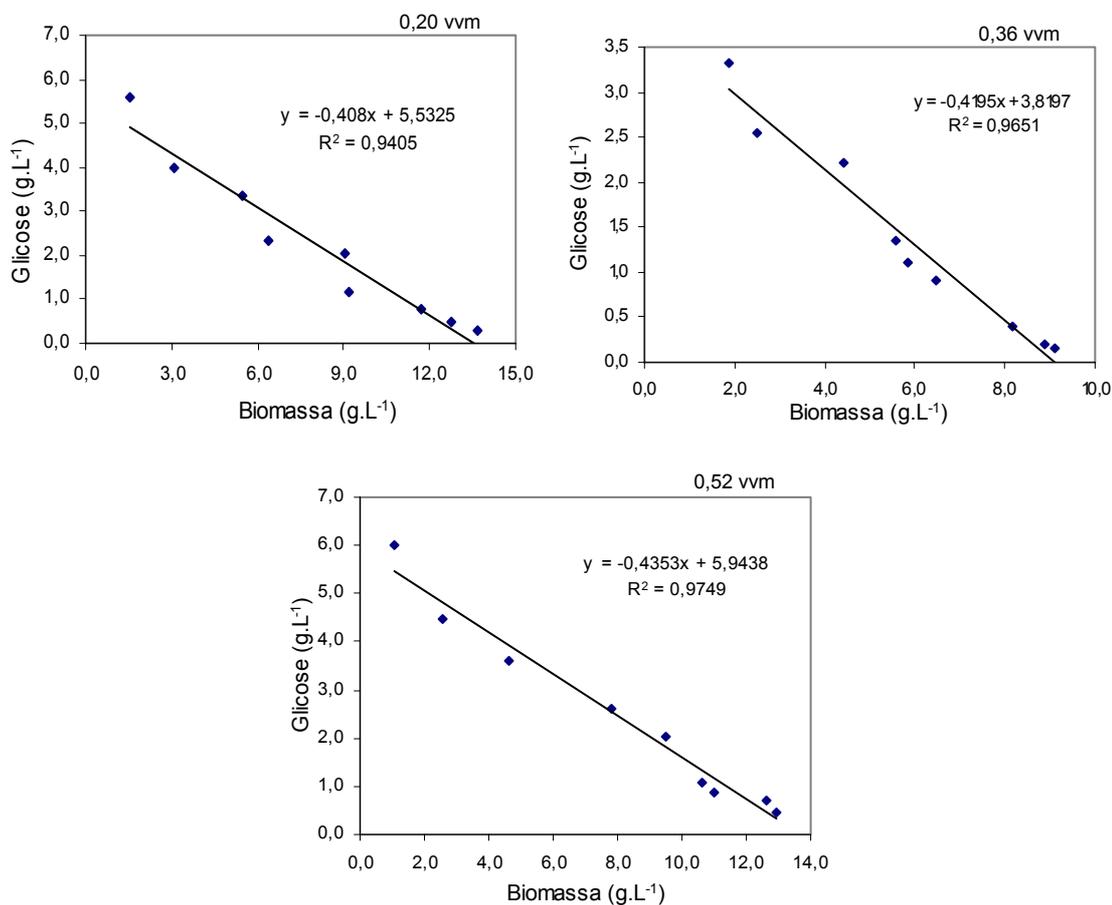


Figura 5.50 Determinação da conversão de glicose em biomassa para o cultivo do fungo *Rhizopogon nigrescens* (UFSC-Rh90) em biorreator *airlift* a  $25 \pm 1$  °C em diferentes vazões de ar.



Figura 5.51 Variação na coloração do extrato de cultivo do fungo *Rhizopogon nigrescens* (UFSC-Rh90) em biorreator *airlift* a  $25 \pm 1$  °C a 0,52 vvm em função do tempo de cultivo.

Observando os dados de  $Q_{O_2} = f(t)$  percebe-se a dificuldade para sua interpretação, uma vez que, variáveis como a concentração de metabólitos e o pH, além da hidrodinâmica,

estão simultaneamente envolvidas. As velocidades de respiração, que se observam para os três cultivos, são diferentes também nos primeiros dias onde as concentrações de OD são altas e a limitação por esse nutriente menos provável. Isso lembra as vantagens das vazões mais altas com relação à hidrodinâmica que favorece a mistura e a transferência de massa (nutrientes e metabólitos). Para o cultivo a 0,20 vvm os valores de  $Q_{O_2}$  permaneceram relativamente constantes até o sexto ou sétimo dia de cultivo, passando a diminuir a partir desse ponto. Essa queda pode estar associada ao crescimento dos *pellets* e à queda na concentração de OD, que atinge valores abaixo de 68% da saturação a partir desse ponto. Além disso, também pode estar associada a valores de pH que parecem se tornar limitantes a partir de 4,5, pois, uma queda mais acentuada se verifica aproximadamente a partir desse valor de pH para todos os cultivos, independente dos valores de OD (Figuras 5.44 a 5.49).

A constante variação da velocidade específica de consumo de oxigênio, juntamente com a velocidade específica de crescimento, também indica que não há uma fase exponencial. O consumo de oxigênio sempre aumentou ao longo do cultivo, mesmo com a diminuição da  $Q_{O_2}$ , e isso foi devido ao aumento progressivo da massa de células (X). É por isso, que para se manter um cultivo em condições não limitantes, deve-se dimensionar o sistema de transferência para atender o maior valor de  $Q_{O_2}X$  (SCHMIDELL, 2001).

Imaginando-se que a concentração crítica do  $O_2$  dissolvido para o crescimento do fungo fosse 50% do seu valor na saturação (SCHMIDELL, 2001), nos momentos finais do cultivo a 0,52 vvm, no caso de interrupção da aeração, em menos de 80 s já haveria limitação de oxigênio para as hifas na superfície dos *pellets*. No interior do *pellet*, devido à maior resistência à transferência, limitações devem ocorrer mesmo em níveis mais elevados de  $O_2$  dissolvido. Com o progresso do cultivo, o aumento da biomassa ocorre principalmente pelo aumento no tamanho dos *pellets*, diminuindo a relação área/volume, com conseqüente aumento na resistência à transferência de massa, afetando a velocidade específica de crescimento.

No Quadro 5.5 estão sintetizados os valores das variáveis de cultivo nas diferentes vazões de ar. Verifica-se que o aumento na vazão de ar proporcionou aumento considerável na velocidade específica média de crescimento e, conseqüentemente, na  $Q_{O_2}$ . Entretanto, para analisar essas diferenças com mais coerência, deve-se considerar as diferenças associadas ao inóculo, como a concentração, o grau de fragmentação e a idade.

A quantidade de biomassa inicial influencia diretamente o tempo de cultivo e, conseqüentemente, o tamanho dos *pellets* que, por sua vez, afeta diretamente a velocidade de crescimento devido a resistência à transferência de massa para o interior do *pellet*. Da mesma forma, o grau de fragmentação no momento do preparo do inóculo afeta o tamanho dos *pellets*, com os propágulos menores gerando *pellets* menores. Para os cultivos em discussão, o grau de fragmentação do inóculo foi semelhante. No cultivo de microrganismos unicelulares

a concentração inicial do inóculo influencia somente o tempo de cultivo. No caso dos fECM, além do tempo de cultivo, a velocidade específica de crescimento também pode ser afetada.

Vazão espec. ar (vvm)	$X_0$ (g.L <sup>-1</sup> )	$X_f$ (g.L <sup>-1</sup> )	pH <sub>f</sub>	$C_{Pf}$ (mgO <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> )	$\mu_x$ médio (dia <sup>-1</sup> )	$Q_{O_2}$ médio (mgO <sub>2</sub> .g <sub>cel</sub> <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	$Q_{O_2}X$ máximo (mgO <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	Varição $k_La$ (%)	$P_X$ (g.L <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup> )
0,20	0,29	6,60	3,6	3,44	0,31	3,78	22	7,0	0,60
0,36	0,19	3,50	3,8	6,15	0,53	6,67	16	4,3	0,52
0,52	0,47	6,00	3,5	4,32	0,62	7,78	28	3,6	1,13

Quadro 5.5 Valores das variáveis obtidas durante o cultivo do isolado UFSC-Rh90 no biorreator *airlift* em inox. O "f" subscrito refere-se ao último valor experimental.

A idade do inóculo está mais associada com os níveis de energia das células e, normalmente, reflete no tempo de adaptação inicial ou fase *lag* do cultivo. A biomassa do inóculo do cultivo a 0,36 vvm foi oriunda de um cultivo de 17 dias em frascos, enquanto que para os cultivos a 0,20 e 0,52 vvm, o inóculo foi obtido a partir de *pellets* provenientes de cultivo com duração de 12 e 4 dias em biorreator, respectivamente. Assim, poderia haver diferenças nos níveis de ATP do micélio como foi sugerido por Lapeyrie e Bruchet (1985). Entretanto, observando-se as curvas de biomassa das Figuras 5.44, 5.46 e 5.48, a fase *lag*, se existir, deve ser inferior ao tempo de duplicação da biomassa (2,24, 1,31 e 1,12 dias para 0,20, 0,36 e 0,52 vvm, respectivamente), e a idade do inóculo pode ter exercido pouca influência sobre as diferenças observadas na produtividade (Quadro 5.5).

Por outro lado, a concentração do inóculo sempre reflete na produtividade, por exigir um número maior ou menor de gerações para consumir os nutrientes do meio. Assim, considerando-se o cálculo da produtividade a partir do momento em que os três cultivos apresentavam a mesma concentração de biomassa (0,47 g.L<sup>-1</sup>), obtém-se 0,75 e 0,95 g.L<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup> para 0,20 e 0,36 vvm, respectivamente. Assim, a diferença de produtividade que continua a existir entre os cultivos, está relacionada com as diferentes velocidades de respiração proporcionadas pelos diferentes níveis de aeração do sistema, sugerindo limitação de oxigênio nos cultivos realizados nas vazões mais baixas.

É interessante observar que na vazão de 0,36 vvm foi utilizado meio de cultura diluído, resultando em baixas concentrações celulares e, por conseguinte, com menos limitação por oxigênio, visto que os níveis de OD estiveram acima de 5,7 mg.L<sup>-1</sup>. Entretanto, como a concentração do inóculo desse cultivo foi a mais baixa, gerando *pellets* maiores, deve ter ocorrido maior dificuldade na transferência de oxigênio para o interior desses *pellets*. A maior velocidade específica desse cultivo foi de 0,61 dia<sup>-1</sup>, semelhante à média do cultivo na vazão de 0,52 vvm (Quadro 5.5).

A utilização de meios de cultura diluídos, apesar de diminuir a produtividade, é uma alternativa para atenuar os efeitos dos produtos do metabolismo sobre o crescimento de

fungos mais sensíveis, pois, nessas condições, os metabólitos são produzidos em menor quantidade, como sugere o pH final mais elevado (Quadro 5.5). Com relação à concentração da fonte de carbono, além da questão dos metabólitos que são proporcionalmente produzidos, existe a limitação devido ao volume ocupado pela biomassa e a necessidade da manutenção da circulação do líquido em biorreator *airlift*. Como apontado em outros estudos (ROSSI, 2001), as concentrações máximas de carbono do meio de cultura no início de uma batelada devem ficar em torno de  $16 \text{ g.L}^{-1}$ , podendo variar um pouco em função da morfologia de cada isolado fúngico. Assim, a maior concentração celular razoável de se obter para cultivo de fungos ectomicorrízicos nas condições deste trabalho, é da ordem de  $7 \text{ g.L}^{-1}$ .

Considerando-se desde o início dos ensaios dinâmicos, o consumo médio de oxigênio, em relação ao total que entrou no biorreator, foi de 0,28, 0,12 e 0,15% para 0,20, 0,36 e 0,52 vvm, respectivamente. Esse baixo aproveitamento do oxigênio do ar injetado no biorreator deve ser uma característica de sistemas pneumáticos, em que se utilizam vazões de ar mais elevadas e os coeficientes de transferência de oxigênio ( $k_La$ ) são baixos, sendo o inverso do que ocorre em sistemas com agitação mecânica.

A operação do biorreator com pressão de 1,2 atm, cerca de apenas 0,19 atm acima da pressão normal dos cultivos anteriores, permitiu aumentar em mais de 18% a disponibilidade do oxigênio para o fungo. Apesar da dificuldade na determinação do  $Q_{O_2}$  nessas condições, pois ao despressurizar ocorreu grande perda de oxigênio dissolvido alterando as medidas de consumo, essa é uma forma simples para fornecer mais oxigênio e garantir concentrações acima da crítica para o crescimento fúngico.

A Figura 5.52 apresenta as fases de um dos cultivos discutidos anteriormente. Destaca-se nas imagens (e) e (f) a evolução do tamanho dos *pellets* entre a fase inicial e final do cultivo, percebendo-se, também a diferença na pigmentação. Nas imagens (d) e (g) observa-se o aumento da espuma e a conseqüente separação de parte da biomassa (j) no topo do biorreator (b). Na imagem h se observa a biomassa crescendo fixa no visor da entrada do *downcomer*, revelando uma das principais dificuldades que se apresentam em cultivos de fungos filamentosos, e que impede a operação por longos períodos. A imagem (i) mostra o momento de esterilização da conexão com selo de vapor (k) para descarga da produção (l). A imagem (c) mostra o distribuidor de ar onde se utilizou uma pedra porosa.

Diversas variáveis como o pH, tamanho dos propágulos do inóculo e nível de aeração podem afetar a velocidade de crescimento. O estudo de transferência de massa permitiu analisar as necessidades em relação ao oxigênio, demonstrando que cultivos com vazões de 0,5 vvm, operados com concentrações celulares iniciais da ordem de  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$  obtidas pela fragmentação do inóculo por 20 s em blender a 3600 rpm, podem suprir a demanda por oxigênio até concentrações celulares de  $6 \text{ g.L}^{-1}$ .

Apesar dos estudos sobre aplicação da simbiose ectomicorrízica estarem sendo desenvolvidos há mais de 40 anos, e do interesse pelo desenvolvimento industrial desses

inoculantes, a tecnologia para sua produção é ainda incipiente. Pouco foi publicado sobre esse assunto. Dentre os raros trabalhos abordando a produção de inoculantes de fECM em biorreatores, citam-se dois estudos realizados no Brasil para produção de *Pisolithus* spp. No primeiro, realizado por Pradella *et al.* (1991a), foram utilizados biorreatores de tanque agitado de 3 L de capacidade, operados em batelada repetida (a biomassa obtida na fase mais produtiva de um biorreator foi utilizada para inocular outro biorreator e assim sucessivamente) com vazão de ar de 0,27 vvm e agitação de 300 rpm. Os melhores resultados obtidos foram concentrações celulares máximas da ordem de 3,3 g.L<sup>-1</sup> e produtividades de 0,15 e 0,13 g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> para o segundo e terceiro ciclo, respectivamente. No segundo estudo, Rossi *et al.* (2002) utilizando um biorreator *airlift* com circulação externa, de 2,3 L de capacidade e operado com uma vazão de ar média de 0,34 vvm, obtiveram concentração celular máxima de cerca de 5,0 g.L<sup>-1</sup> e produtividade de 0,48 g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>.



Figura 5.52 Nessa seqüência observa-se algumas imagens desde o momento da inoculação (a) até a biomassa final já em solução salina com carvão (l), pronta para ser armazenada.

Comparando-se os resultados desses autores é possível constatar a superioridade de um biorreator *airlift* sobre um biorreator de tanque agitado para o cultivo desses fungos. Embora existam poucos dados para comparação, a alta eficiência do biorreator *airlift* no presente estudo confirma que esse tipo de biorreator é bastante adequado para o cultivo de fECM, podendo-se atingir níveis de produtividade superiores a  $1 \text{ g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ . Além disso, o ciclo de cultivo pode-se completar após 7 dias, representando um enorme avanço em relação ao sistema tradicional de cultivo no estado sólido.

#### 5.4.2 Inoculante para estudos de viabilidade e eficiência

Embora neste trabalho as atividades de produção do inoculante tenham sido feitas sob condições assépticas de fluxo laminar (Figura 5.53), para fins de produção do inoculante comercial isso não é necessário, uma vez que, além de a suspensão miceliana estar isenta de nutrientes, a inoculação se realiza em plantas e substrato não estéreis.



Figura 5.53 Dispositivo de encapsulamento da biomassa em gel de alginato de cálcio. A distribuição uniforme da biomassa foi garantida através da agitação constante.

Uma observação importante com relação ao processo de encapsulamento é que a concentração de cloreto de cálcio, e o volume gasto dessa solução, devem ser controlados, de modo a evitar ou reduzir o acúmulo de resíduos desse sal e que eles fiquem distribuídos uniformemente entre as cápsulas. Maupérin *et al.* (1987) não esclarecem esses aspectos, mas o efeito tóxico do  $\text{CaCl}_2$  para fungos ectomicorrízicos já foi demonstrado em outro estudo (KERNAGHAN *et al.*, 2002). Neste trabalho a utilização de uma menor concentração de  $\text{CaCl}_2$ , 15%, e o tempo de lavagem das cápsulas de 2 minutos, permitiram obter 100% de viabilidade inicial para todos os isolados. Esses procedimentos também evitaram o problema de despolimerização do gel. A substituição por outros sais de cálcio não permitiu a polimerização adequada do gel de alginato de sódio.

A Figura 5.54 apresenta diversos inoculantes encapsulados nesse gel e mantidos sob refrigeração em solução fisiológica. Esses inoculantes foram testados periodicamente quanto a sua viabilidade e utilizados em experimentos com plantas.



Figura 5.54 Lotes de inoculantes de fungos ectomicorrízicos encapsulados em gel de alginato de cálcio para estudos de viabilidade e eficiência.

Apesar desses cuidados, como as primeiras cápsulas formadas permaneciam mais tempo em contato com a solução de cloreto de cálcio, uma vez que a velocidade de formação era de 2,5 cápsulas por segundo, um lote de aproximadamente 4500 cápsulas levava cerca de 30 minutos para ser produzido. Assim, quando a última cápsula formada começava a gelificar, as primeiras ainda estavam em contato com o  $\text{CaCl}_2$ . Este pode ter sido um dos fatores responsáveis pela diferença de viabilidade entre as cápsulas de um mesmo lote. Por outro lado, a distribuição da biomassa de forma homogênea nas cápsulas foi garantida através da agitação constante da suspensão miceliana.

Como o tempo uniforme de gelificação para todas as cápsulas pode ser significativo para fungos sensíveis, esse parâmetro deverá ser considerado no projeto de um sistema para encapsulamento. Nesse sentido, como a densidade varia entre as cápsulas já polimerizadas e as não polimerizadas, a estratificação pela diferença de densidade poderá facilitar o desenvolvimento do equipamento para essa finalidade.

Além da possibilidade de utilizar aditivos como o carvão ativo, pode-se imaginar uma variedade de produtos que poderão ser incorporados ao gel, como antibióticos, hormônios vegetais e umectantes, visando atingir objetivos específicos.

### 5.4.3 Estudos de viabilidade

#### 5.4.3.1 Viabilidade dos inoculantes em meio sólido em placas

Com exceção dos inoculantes dos isolados UFSC-Sc42 e UFSC-Pt188, os demais ultrapassaram os 6 meses de armazenamento com viabilidade de 100% das cápsulas. (Figura

5.55). Um lote de inoculante do isolado UFSC-Rh90 manteve total viabilidade após mais de 24 meses de armazenamento.

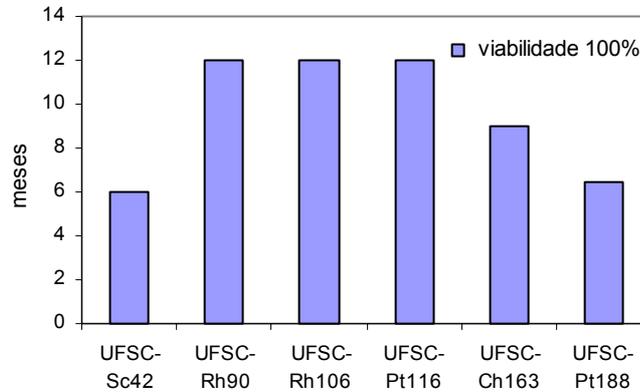


Figura 5.55 Viabilidade dos inoculantes em meio de cultura em placas.

A Figura 5.56 mostra o resultado de testes periódicos de acompanhamento da viabilidade em relação ao tempo de armazenamento. Esses resultados somente foram possíveis após a utilização de carvão ativo, tanto como carga nas cápsulas, como no meio de cultura das placas. Com o passar do tempo de armazenamento, a viabilidade de modo geral tende a se manifestar mais tardiamente, podendo demorar até mais de uma semana para iniciar a germinação das primeiras cápsulas.

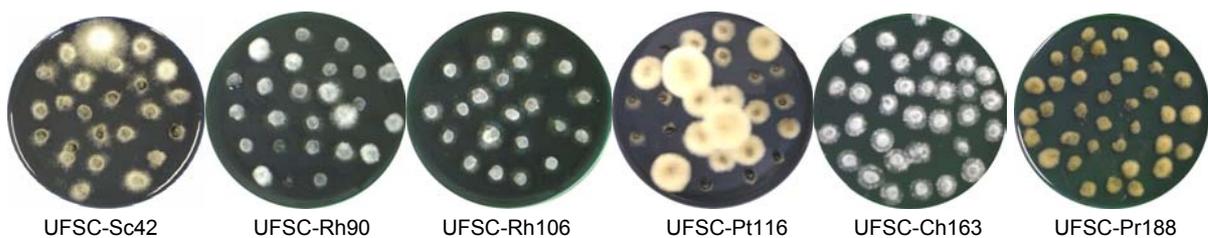


Figura 5.56 Viabilidade das cápsulas de inoculantes verificada em meio de cultura sólido.

Apesar da viabilidade também ter sido elevada para os inoculantes produzidos pelo sistema tradicional (item 5.1.1), os produzidos através do cultivo submerso e encapsulados em gel de alginato de cálcio apresentaram um potencial de viabilidade ainda maior. A principal hipótese para a superioridade desse último é que o micélio produzido em menos tempo, como ocorre através do cultivo submerso em biorreator, mantém níveis mais altos de ATP (LAPEYRIE e BRUCHET, 1985), sendo este fator responsável pelo potencial de infecção das raízes (LITCKE *et al.*, 1980; Le TACON *et al.*, 1985).

#### 5.4.3.2 Viabilidade dos inoculantes em substrato de plantio

A viabilidade das cápsulas de inoculante em meio de cultura sólido é uma informação não conclusiva, pois as condições são mais apropriadas para crescimento do que aquelas do substrato de plantio. Foi de grande interesse saber se o inoculante dispõe de suficiente energia armazenada nas hifas para iniciar o crescimento em condições de escassez de nutrientes, como é o caso do substrato de plantio. Além disso, pode ocorrer ressecamento das cápsulas, com conseqüente diminuição dos poros no gel, provocada pelas condições de baixa umidade livre no substrato, e que dificultaria a saída das hifas.

A redução de até 35% do diâmetro das cápsulas (mais de 70% em volume) quando inoculadas em substrato turfa-vermiculita, devida à perda de água para o substrato, não impediu a germinação dessas cápsulas. Entretanto o crescimento foi limitado em função da energia armazenada nas hifas, apresentando baixa densidade dessas (Figura 5.57). Essa habilidade de crescer num substrato pobre em nutrientes é interessante, pois permite que o fungo se mantenha até o momento do aparecimento das raízes curtas receptivas quando ocorrerá a formação da simbiose.



Figura 5.57 Viabilidade do inoculante UFSC-Pt188 em substrato turfa-vermiculita. Devido à baixa densidade das hifas, somente é possível ver a colonização através da ampliação.

#### 5.4.3.3 Viabilidade dos inoculantes em substrato de plantio na presença de plantas

A capacidade de germinação do inoculante em substrato de plantio em presença da planta hospedeira foi uma informação preliminar importante para os estudos de micorrização controlada, pois essa condição *in vitro* simula as condições ambientais.

Como não foi possível desinfetar as sementes de pínus para o estudo da germinação das cápsulas em substrato de plantio, esse estudo foi feito somente com inoculantes de fungos simbiossantes de eucalipto.

Para essa planta, utilizaram-se os primeiros lotes de inoculante dos isolados UFSC-Pt116 e UFSC-Ch163 (STREIT *et al.*, 2004). Apesar de as cápsulas de ambos apresentarem

100% de viabilidade em placas, somente as cápsulas do isolado UFSC-Ch163 apresentaram crescimento no experimento com as plantas. Esse crescimento apenas foi detectado aos 25 dias após a inoculação. Aos 45 dias, 90% das cápsulas apresentavam-se viáveis. Nas placas sem as plantas, somente uma cápsula apresentou viabilidade nesse período, e apenas 50% cresceram após mais de 45 dias. Visualmente, a abundância e o comprimento das hifas nas cápsulas foram superiores na presença das plantas.

Num segundo experimento, utilizando novos lotes dos isolados UFSC-Pt116, UFSC-Ch163 e UFSC-Pt188, produzidos seguindo os cuidados de padronização já discutidos (item 5.4.2), verificou-se que a presença das plantas estimulou a germinação das cápsulas dos três inoculantes. No caso do inoculante do isolado UFSC-Ch163, o crescimento teve início após 30 dias, e dos isolados UFSC-Pt116 e UFSC-Pt188, após 40 dias. Após 60 dias, nenhuma cápsula da testemunha, sem plantas, apresentou crescimento. Nas placas com as plantas, o percentual de cápsulas com crescimento foi acima de 90%. Observou-se que o crescimento das hifas foi mais abundante nas áreas próximas às raízes, o que pode indicar um efeito estimulante de substâncias produzidas pelas plantas (ROSSI *et al.*, 2005d).

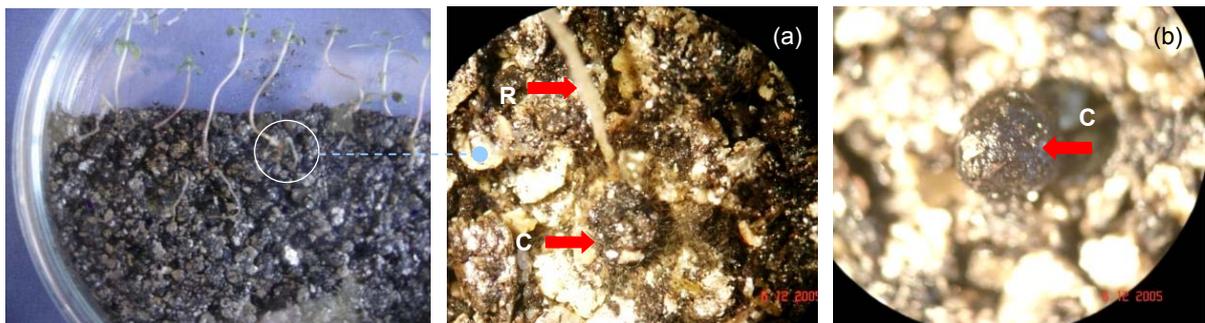


Figura 5.58 Cápsulas de inoculante do isolado UFSC-Pt188 em substrato turfa-vermiculita mostrando o crescimento de hifas na presença (a) e a falta de crescimento na ausência (b) de planta de *Eucalyptus dunnii*. (R = raiz; C = cápsula).

#### 5.4.4 Efeito da composição do meio de cultura no pH e no crescimento dos fungos

Devido à escassez de estudos sobre a fisiologia de crescimento de fECM, Rossi (2001) realizou diversas modificações no meio de cultura tentando identificar algum requerimento nutricional que pudesse contribuir para a melhoria do cultivo. Nesses estudos, utilizando os constituintes orgânicos do meio de cultura, evidenciaram-se os efeitos positivos da peptona na produção de biomassa. Esses resultados, em parte, estão relacionados com o efeito tamponante exercido pelas proteínas, como pode ser observado também nesse experimento (Figura 5.59), além da fácil assimilação desse substrato pelo fungo. Entretanto, existe a possibilidade de esse tipo de substrato, em função de sua complexa constituição, favorecer a formação de compostos prejudiciais à viabilidade dos fungos, quando em estágios mais avançados do cultivo. Por esse

motivo, neste trabalho, compostos como a peptona e o extrato de malte foram utilizados em concentrações mais baixas.

Das modificações testadas no meio de cultura PGKM, verificou-se que uma concentração de uréia da ordem de 0,5 g.L<sup>-1</sup> já causa inibição do crescimento. Por outro lado, concentrações menores, como 0,1 g.L<sup>-1</sup>, podem contribuir para manter um pH mais elevado e, dessa forma, aumentar a produção de biomassa (Figura 5.59). O aumento da concentração de fosfatos, a níveis semelhantes aos do meio original utilizado por Litchfield e Arthur (1983), também demonstrou efeito negativo sobre o crescimento fúngico (STREIT e ROSSI, 2004; STREIT *et al.*, 2005b).

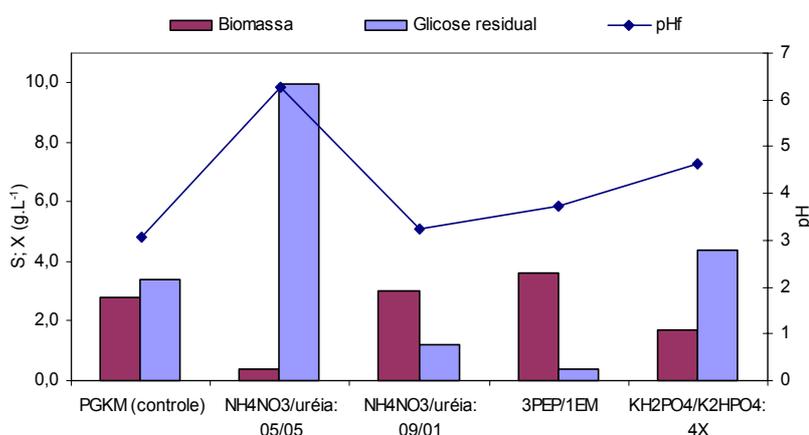


Figura 5.59 Resultado de glicose residual, biomassa e pH final para o cultivo do isolado UFSC-Ch163 em diferentes composições do meio de cultura PGKM. Média de triplicatas.

Os resultados obtidos no experimento utilizando tampões são mostrados na Figura 5.60, onde verifica-se que os tratamentos com tampão citrato foram aqueles que proporcionaram a melhor relação entre a maior produção de biomassa e a menor queda de pH, seguido pelo tampão fosfato de Na. Por outro lado, o acetato de sódio apesar de ter mantido um pH alto, inibiu significativamente o crescimento fúngico.

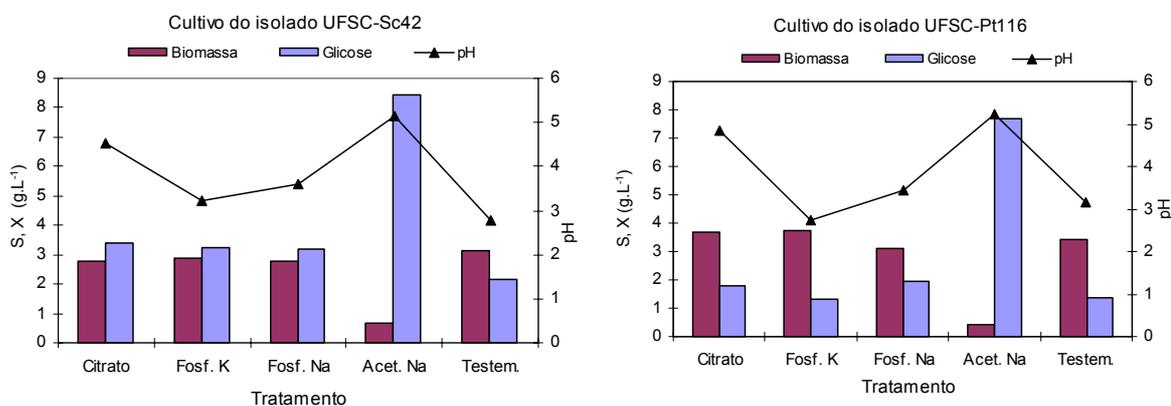


Figura 5.60 Efeito dos tampões no pH do meio de cultura e no crescimento dos fungos.

O tampão citrato foi mais efetivo que os tampões de fosfato, provavelmente devido ao fato de o  $pK_a$  do ácido cítrico estar mais próximo do pH do meio, do que o  $pK_a$  do ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ) (APÊNDICE D). Outro tampão que precisaria ser testado é o succinato de sódio, pois, um dos valores de  $pK_a$  do ácido succínico é 5,64, sendo bem próximo ao pH do meio de cultura. Esse tampão poderia ser mais eficiente na manutenção do pH, caso não seja inibitório como verificado com o acetato. Alternativa a ser estudada seria a utilização de carvão ativo peletizado para sustentação do pH.

Cuidados com o pH não se limitam apenas aos processos de produção de biomassa, mas a todas as etapas de produção de inoculante, evitando que variações bruscas de pH afetem a viabilidade. Assim, é necessário verificar, além do pH do meio de cultura, o pH da água de lavagem da biomassa, da solução de alginato utilizada para encapsulamento e, também, da solução salina utilizada para conservação da biomassa.

Apesar das melhorias, o pH durante o cultivo ainda variou muito, dificultando o estabelecimento das condições ótimas. Entretanto, essa questão é de simples solução, sendo um problema de ordem financeira. Para conseguirem-se melhores resultados e interpretações acerca do cultivo de fungos ectomicorrízicos, faz-se necessária a utilização de um sistema de controle de pH com ácido/base, que utiliza eletrodo esterilizável e transmissor como os exemplos mostrados nos ANEXOS A e B.

#### 5.4.5 Infectividade e eficiência de inoculante ectomicorrízico em relação à planta

Nos testes de inoculação das plantas, verificou-se que todos os isolados foram capazes de colonizar as raízes, mas com diferentes intensidades de colonização. A discussão é apresentada de maneira mais geral, pois não se trata da seleção de isolados mais eficientes, como foram os trabalhos de Souza (2003) e Oliveira (2004), e sim, de uma avaliação inicial dos inoculantes produzidos nas condições descritas neste trabalho. Nesse contexto, também foi importante para o grupo de pesquisa do LECM avaliar as dificuldades e problemas relacionados com a execução de experimentos nas condições dos viveiros comerciais, que permitirão estabelecer procedimentos para estudos futuros de modo a poder verificar melhor o desempenho de um programa de micorrização controlada.

A montagem de dois experimentos coincidiu com o início do inverno. Assim, devido a maior sensibilidade ao frio, o experimento com eucalipto foi mantido em casa de vegetação do MIP-UFSC e não foi conduzido em viveiro. Além disso, para compensar os dias mais curtos, foi utilizada iluminação artificial. Uma consequência negativa disso foi a proliferação de artrópodes (aranhas, ácaros, pulgões, colêmbolas) que provocaram contaminações cruzadas entre os tratamentos, inclusive para o tratamento testemunha, prejudicando a avaliação dos efeitos da inoculação.

#### 5.4.5.1 Forma de aplicação do inoculante

Uma questão importante a ser considerada refere-se à aplicação dos inoculantes nos viveiros comerciais, em que se deve utilizar uma técnica simples e de baixo custo, de forma a não onerar o processo de produção de mudas. A forma de aplicação com quase nenhum custo, escolhida para utilização nos experimentos em viveiros, foi a simples mistura das cápsulas durante a preparação do substrato.

O ensaio de dosagem das cápsulas de inoculante para mistura ao substrato de plantio determinou que devem ser colocadas pelo menos 100 cápsulas por litro de substrato para que 98% das amostras de 60 mL contenham pelo menos uma cápsula. Essa dosagem mínima resulta numa média de cerca de 6 cápsulas por tubete de 60 mL.

#### 5.4.5.2 Efeito do inoculante no crescimento de plantas de eucalipto

A Tabela 5.1 e 5.2 apresenta os resultados dos experimentos com mudas de *E. dunnii* (Figura 5.61) inoculadas com os três fungos selecionados em trabalhos anteriores (SOUZA *et al.*, 2004), mantidos em condições controladas de casa de vegetação. O experimento que gerou os dados da Tabela 5.2 é aquele que deveria ter sido conduzido num viveiro comercial na região de Caçador-SC.



Figura 5.61 Estudos de infectividade e eficiência do inoculante em mudas de *E. dunnii* sob condições de casa de vegetação.

Embora tenham sido obtidos efeitos positivos da inoculação em todos os parâmetros avaliados, nem todos foram significativos. Na Tabela 5.1 destacam-se os efeitos positivos do isolado UFSC-Pt188 no crescimento das plantas, com ganhos médios de 23% na altura e 16% no diâmetro do caule, em relação às plantas testemunhas não inoculadas. Também destaca-se o isolado UFSC-Pt116, com ganhos de 29% na matéria seca, e o isolado UFSC-Ch163, com ganhos de 18% no diâmetro.

São evidentes os valores muito baixos para a colonização radicular, que não condizem com os demais resultados. Souza (2003) também obteve baixos valores de colonização radicular para esses mesmos isolados, nesta mesma espécie vegetal. A explicação remete para a metodologia, onde a etapa de lavagem dos torrões para separar as raízes do substrato de plantio pode remover as ectomicorrizas, além das redes de micélio. Para agravar, a conservação das raízes em solução de FAA altera a coloração das hifas, dificultando a observação das micorrizas restantes. Esse problema não é crítico para pinus, cujas raízes e micorrizas, por serem mais robustas, não são tão afetadas durante a remoção do substrato.

Para a avaliação da colonização radicular de plantas de eucalipto em pequena escala, sugere-se a utilização da técnica de contagem de 500 pontas de raízes (ALVES *et al.*, 2001; OLIVEIRA, 2004), em que a lavagem pode ser evitada durante a etapa da avaliação da colonização.

Tabela 5.1 Crescimento e colonização radicular de mudas de *Eucalyptus dunnii* após 3,5 meses em casa de vegetação, inoculadas com fungos ectomicorrízicos produzidos em biorreator *airlift* e encapsulados em gel de alginato de cálcio. MIP/UFSC, abril de 2005.

Testemunha	UFSC-Pt116	UFSC-Ch163	UFSC-Pt188	Média
Altura (cm.planta <sup>-1</sup> )*				
23,47 <b>b</b>	27,65 <b>ab</b>	25,83 <b>ab</b>	28,87 <b>a</b>	26,46
Diâmetro do caule (mm.planta <sup>-1</sup> )*				
3,73 <b>c</b>	4,17 <b>bc</b>	4,43 <b>ab</b>	4,84 <b>a</b>	4,29
Massa seca total (g.planta <sup>-1</sup> )*				
1,91 <b>b</b>	2,46 <b>a</b>	2,28 <b>ab</b>	2,17 <b>ab</b>	2,21
Colonização radicular (%)*				
0,00 <b>b</b>	4,86 <b>a</b>	0,00 <b>b</b>	3,60 <b>ab</b>	2,11

\* Os valores representam a média de 10 repetições. Valores seguidos pela mesma letra na linha não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ )

No outro experimento realizado em escala de viveiro, utilizando os mesmos inoculantes, nenhum dos parâmetros avaliados apresentou variação significativa, apesar dos altos níveis de colonização radicular (Tabela 5.2). Observou-se durante os 5 meses em que as plantas ficaram na casa de vegetação, intensa proliferação de insetos e larvas que causaram a contaminação das plantas testemunhas com os fungos inoculados, além da contaminação por fungos proveniente de substratos não desinfetados de outros experimentos mantidos na mesma casa de vegetação.

A média geral para a colonização radicular foi de 2,12, equivalendo a uma colonização de cerca de 50%, com destaque para as plantas inoculadas com isolados do gênero *Pisolithus* (Figura 5.62). As plantas inoculadas com o isolado UFSC-Ch163 também foram contaminadas por esses inoculantes (UFSC-Pt116 e UFSC-Pt188).

Tabela 5.2 Crescimento e colonização radicular de mudas de *Eucalyptus dunnii* após 5 meses em casa de vegetação, inoculadas com duas doses de fungos ectomicorrízicos produzidos em biorreator *airlift* e encapsulados em gel de alginato de cálcio. MIP/UFSC, julho de 2005.

Dose**	Testemunha	UFSC-Pt116	UFSC-Ch163	UFSC-Pt188	Média
Altura (cm.planta <sup>-1</sup> )*					
1	34,50	35,95	36,27	36,28	35,75 <b>A</b>
2	34,50	35,55	35,65	36,45	35,54 <b>A</b>
Média	34,50 <b>a</b>	35,75 <b>a</b>	35,92 <b>a</b>	36,36 <b>a</b>	35,64
Diâmetro do caule (mm.planta <sup>-1</sup> )*					
1	3,05	3,10	3,33	3,05	3,13 <b>A</b>
2	3,05	3,25	2,98	3,10	3,09 <b>A</b>
Média	3,05 <b>a</b>	3,18 <b>a</b>	3,15 <b>a</b>	3,08 <b>a</b>	3,11
Colonização radicular (nota)*					
1	2,27	2,15	2,30	1,90	2,16 <b>A</b>
2	2,27	1,98	1,98	2,10	2,08 <b>A</b>
Média	2,27 <b>a</b>	2,06 <b>a</b>	2,14 <b>a</b>	1,99 <b>a</b>	2,12

\*Os valores representam a média de 240 repetições. Valores seguidos pela mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

\*\*Doses: 1 = 6 cápsulas de inoculante por planta; 2 = 10 cápsulas de inoculante por planta, em média.



Figura 5.62 Imagens de torrões com as raízes colonizadas e detalhes ampliados 30X mostrando as micorrizas formadas com os três isolados inoculados.

A Figura 5.63 revela um dos importantes benefícios das micorrizas para as plantas, que é a captação de nutrientes. No centro dessa figura observa-se uma cápsula do fertilizante

Osmocote<sup>®</sup>, que é constituída externamente por uma resina orgânica biodegradável, totalmente enredada pelas hifas ligadas às micorrizas.



Figura 5.63 Detalhe de um torrão mostrando as hifas envolvendo completamente uma cápsula do fertilizante Osmocote<sup>®</sup> para captar seus nutrientes e transferir para as raízes através das micorrizas.

#### 5.4.5.3 Efeito do inoculante no crescimento de plantas de pínus

Na Tabela 5.3 estão apresentados os resultados do experimento com plantas de pínus inoculadas com o fungo *R. nigrescens* (isolado UFSC-Rh90). Esse experimento foi realizado na casa de vegetação da Estação Experimental da Epagri em Caçador - SC. Os fertilizantes Osmocote<sup>®</sup> (14-8-8; N-P-K) e Nutricote<sup>®</sup> (18-5-9; N-P-K) são os mais utilizados pelos produtores de mudas em Santa Catarina.

O lote de inoculante utilizado havia sido armazenado sob refrigeração por um período de 8 meses, e como mostram os resultados, apresentou-se infectivo quando adicionado ao substrato de plantio de mudas de *P. taeda* (Tabela 5.3). A porcentagem média de colonização foi de 37%, não havendo influência da adubação sobre esse parâmetro. A intensidade de colonização observada mostrou-se compatível com os valores obtidos por outros autores utilizando outros tipos de inoculante (BOUGHER *et al.*, 1990; SOARES *et al.*, 1990, ALVES *et al.*, 2001; WALKER, 2001).

Embora os resultados mostrem um efeito positivo da inoculação no crescimento de *P. taeda* (Tabela 5.3), em apenas um dos parâmetros avaliados, diâmetro do caule, esse efeito foi significativo. É possível que o período de condução do experimento em casa de vegetação não tenha sido suficiente para que efeitos dos tratamentos fossem evidenciados sobre os demais parâmetros.

Houve interação significativa entre a inoculação do isolado UFSC-Rh90 e a adubação com fórmula N-P-K 14-8-8 (Tabela 5.3). Essa formulação apresenta maior teor de P e

micronutrientes do que a 18-5-9. As plantas que receberam a combinação desses tratamentos apresentaram um teor de P superior a todos os demais, observando-se um aumento de 42% em relação à testemunha não inoculada, indicando que a presença do fECM proporcionou uma maior absorção do P aplicado. Um aumento substancial no teor desse elemento poderá contribuir para diferenças significativas no crescimento das mudas quando transplantadas para o campo.

Tabela 5.3 Crescimento, colonização radicular e conteúdo de fósforo em mudas de *Pinus taeda* após 6 meses em casa de vegetação, inoculadas com fungo ectomicorrízico produzido em biorreator *airlift*, encapsulado em gel de alginato de cálcio e armazenado durante 8 meses sob refrigeração. Caçador – SC, maio de 2003.

Adução (N-P-K)	Testemunha	UFSC-Rh90	Média
Altura (cm.planta <sup>-1</sup> )*			
14-8-8	10,5	11,0	10,8 <b>A</b>
18-5-9	11,0	11,7	11,4 <b>A</b>
Média	10,8 <b>a</b>	11,4 <b>a</b>	11,1
Diâmetro do caule (mm.planta <sup>-1</sup> )*			
14-8-8	2,4	2,6	2,5 <b>A</b>
18-5-9	2,1	2,7	2,4 <b>A</b>
Média	2,3 <b>b</b>	2,7 <b>a</b>	2,5
Massa seca total (g.planta <sup>-1</sup> )*			
14-8-8	1,08	1,26	1,17 <b>A</b>
18-5-9	1,15	1,17	1,16 <b>A</b>
Média	1,12 <b>a</b>	1,21 <b>a</b>	1,17
Colonização radicular (%)*			
14-8-8	0	35 <b>A</b>	-
18-5-9	0	39 <b>A</b>	-
Média	-	37	-
Fósforo (µg planta <sup>-1</sup> )			
14-8-8	698 bA	993 aA	845 <b>A</b>
18-5-9	643 aA	518 aB	580 <b>B</b>
Média	670 <b>a</b>	755 <b>a</b>	

\*Os valores representam a média de 5 repetições. Valores seguidos pela mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Como mencionado anteriormente, os resultados de experimentos realizados em viveiros são apresentados apenas para pínus. Foram realizados dois experimentos com pínus, sendo um no viveiro Floko em Lages - SC, e outro num viveiro da Associação de Produtores de Mudanças de Caçador-SC.

No primeiro experimento, realizado em Lages - SC (Figura 5.64), além dos inoculantes, avaliou-se o efeito da desinfecção do substrato. É interessante observar que apenas esse tratamento apresentou efeito significativo no crescimento das plantas (Tabela 5.4), revelando um dos grandes problemas para o controle da micorrização nos viveiros, que é a ocorrência natural de fungos ectomicorrízicos menos eficientes, mas mais adaptados que aqueles introduzidos pelo inoculante.



Figura 5.64 Avaliação dos resultados de experimento de micorrização controlada em pinus em condições de viveiro comercial de mudas. Viveiro Floko em Lages-SC.

Tabela 5.4 Crescimento e colonização radicular de mudas de *Pinus taeda* após 6 meses em viveiro, inoculadas com fungos ectomicorrízicos produzidos em biorreator *airlift* e encapsulado em gel de alginato de cálcio. Lages – SC, novembro de 2004.

Solo	Testemunha	UFSC-Sc42	UFSC-Rh90	Média
Altura (cm.planta <sup>-1</sup> )				
Desinfetado	16,23	16,77	17,01	16,67 <b>A</b>
Não desinfetado	15,75	14,82	15,47	15,34 <b>B</b>
Média	15,99 <b>a</b>	15,80 <b>a</b>	16,24 <b>a</b>	16,01
Diâmetro do caule (mm.planta <sup>-1</sup> )				
Desinfetado	3,11	3,19	3,17	3,16 <b>A</b>
Não desinfetado	3,09	2,64	3,10	2,95 <b>B</b>
Média	3,10 <b>a</b>	2,92 <b>b</b>	3,14 <b>a</b>	3,05
Colonização radicular (nota)				
Desinfetado	2,56	2,84	2,74	2,71 <b>A</b>
Não desinfetado	2,45	2,86	2,74	2,68 <b>B</b>
Média	2,50 <b>b</b>	2,85 <b>a</b>	2,74 <b>b</b>	2,70

\*Os valores representam a média de 90 repetições. Valores seguidos pela mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Os substratos comerciais são geralmente constituídos de cascas e acículas de pinus, contendo muitos propágulos fúngicos, onde se destacam as espécies do gênero *Thelephora*. Esses substratos, ditos “com micorrizas”, na verdade contém apenas propágulos de fungos de eficiência desconhecida.

Houveram diferenças na colonização radicular entre as plantas inoculadas com isolado UFSC-Sc42 e plantas testemunhas. Essa diferença de 14% poderia ter sido maior se não houvesse a interferência dos fungos contaminantes que se perpetuam no ambiente desses viveiros. Para a efetivação de um programa de controle da micorrização, uma das primeiras providências deverá ser a desinfecção das áreas de produção de mudas e dos substratos.

As mudas produzidas através do experimento no viveiro Floko foram consideradas pelos técnicos da Epagri de Lages como saudáveis e dentro dos padrões para comercialização (Constâncio Bernardo dos Santos, comunicação pessoal, 2005).

No segundo experimento, realizado num viveiro em Caçador - SC, foi utilizado substrato desinfetado e, também, duas dosagens para o inoculante que em média foram de 6 (dose 1) e 10 (dose 2) cápsulas por planta (Tabela 5.5). Devido à distribuição das cápsulas através da mistura ao substrato antes do preenchimento dos tubetes, naturalmente alguns tubetes receberam mais e outros menos cápsulas que a dosagem especificada.

Tabela 5.5 Crescimento e colonização radicular de mudas de *Pinus taeda* após 6 meses em viveiro, inoculadas com fungos ectomicorrízicos produzidos em biorreator *airlift* e encapsulados em gel de alginato de cálcio. Caçador - SC, junho de 2005.

Dose**	Testemunha	UFSC-Sc42	UFSC-Rh90	UFSC-Rh106	Média
Altura (cm.planta <sup>-1</sup> )					
1	19,46	20,42	21,02	19,10	20,00 <b>A</b>
2	19,46	20,71	20,83	19,61	20,15 <b>A</b>
Média	19,46 <b>a</b>	20,56 <b>a</b>	20,93 <b>a</b>	19,36 <b>b</b>	20,08
Diâmetro do caule (mm.planta <sup>-1</sup> )					
1	2,28	2,42	2,22	2,29	2,30 <b>A</b>
2	2,28	2,41	2,38	2,38	2,36 <b>A</b>
Média	2,28 <b>b</b>	2,42 <b>a</b>	2,30 <b>b</b>	2,33 <b>ab</b>	2,33
Colonização radicular (nota)					
1	1,18	1,54	1,96	1,70	1,60 <b>A</b>
2	1,18	1,82	2,06	1,82	1,72 <b>B</b>
Média	1,18 <b>c</b>	1,68 <b>b</b>	2,01 <b>a</b>	1,76 <b>b</b>	1,66

\*Os valores representam a média de 50 repetições. Valores seguidos pela mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

\*\*Doses: 1 = 6 cápsulas de inoculante por planta; 2 = 10 cápsulas de inoculante por planta, em média.

Na Tabela 5.5 evidenciou-se uma colonização radicular média dos tratamentos inoculados de 54% superior à testemunha. Para as plantas inoculadas com o isolado UFSC-Rh90, a colonização chegou a valores 70% superiores à testemunha. Evidenciam-se, também, efeitos positivos na altura das plantas, porém, não significativos. Para o diâmetro do caule, o efeito positivo significativo foi de 6% para as plantas inoculadas com o isolado UFSC-Sc42. A dosagem apresentou efeito significativo apenas na colonização.

A Figura 5.65 mostra micorrizas de pinus formadas nos tratamentos inoculados do experimento realizado no viveiro em Caçador - SC. É importante observar que as notas atribuídas às plantas inoculadas foram próximas de 2, que equivalem a uma colonização entre 25 e 50% das raízes, semelhante à colonização observada no eucalipto (*cf.* item 5.4.5.2).



Figura 5.65 Aspecto de micorrizas observadas no experimento com pinus em viveiro.

Souza (2003) aponta que a altura da planta e o diâmetro do caule não são parâmetros adequados para avaliar a eficiência da inoculação, considerando a matéria seca total o parâmetro que revela as maiores diferenças relacionadas aos benefícios proporcionados pelos fungos às plantas, pois a resposta inicial parece refletir mais na produção de ramos e folhas, que está associada ao aumento da captação e ao aproveitamento de água e nutrientes (SMITH e READ, 1997). Segundo esse mesmo autor, a matéria seca deve ser considerada como prova da eficiência da inoculação. Porém, Garbaye (1990), ressalta que aumentos na altura das plantas refletirão sobre a produção de madeira mais tarde.

De qualquer modo, a taxa de colonização radicular é um dos principais parâmetros para avaliação da qualidade de uma muda, pois está relacionada ao vigor e à aptidão para o estabelecimento e crescimento no campo, aumentando as chances de sobrevivência à crise do transplântio (MIKOLA, 1989; GARBAYE, 1990).

Apesar de a prática de inoculação acarretar em aumento dos custos de produção, foi demonstrado que é possível atingir incrementos médios anuais de biomassa da ordem de 30%, com uma relação custo:benefício de 1:5 (KUEK, 1994). Isso mostra a viabilidade de adoção da prática de inoculação dentre as operações de rotina nos sistemas florestais.

Com esses resultados, fica demonstrado que é possível manter, além da viabilidade, a infectividade do inoculante durante um longo período de conservação em refrigerador graças à encapsulação do micélio em gel de alginato de cálcio. Os resultados vêm corroborar as observações de outros autores (Le TACON *et al.*, 1985; MAUPÉRIN *et al.*, 1987) sobre a vantagem de se produzir um inoculante encapsulado, não somente pela facilidade de armazenamento e transporte, como também, e principalmente, pela manutenção da taxa de viabilidade e infectividade por períodos prolongados.

## 6. CONCLUSÕES

1. O biorreator *airlift* com circulação externa, com os parâmetros geométricos adotados, apresenta alta eficiência para produção de inoculantes de fECM.
2. Os selos de vapor construídos com engates rápidos e com válvulas tipo esfera são eficientes para a manutenção da assepsia durante as operações de alimentação, descarga e coleta de amostras do biorreator, podendo substituir as caras válvulas de membrana, barateando ainda mais o custo do biorreator.
3. O desenho proposto para o separador de gás permite melhorar sua eficiência, aumentando em cerca de 43% a velocidade de circulação de líquido, melhorando expressivamente o *gás holdup* e o coeficiente de transferência de massa.
4. Tempos de fragmentação de até 60 s, utilizando equipamento tipo blender, não prejudicam a viabilidade do micélio. Além disso, o inóculo com maior número e menor tamanho dos propágulos resulta na formação de *pellets* menores e mais homogêneos em cultivo no biorreator, com amplificação da área para transferência de massa.
5. A utilização de carvão ativo na dosagem de 0,1 a 0,4% é fundamental para manutenção da viabilidade da biomassa fúngica, seja na forma de suspensão miceliana, seja na forma imobilizada em gel de alginato de cálcio. O uso de 0,2% de carvão em meio de cultura sólido também beneficia a manutenção das culturas por mais tempo.
6. A fragmentação do micélio, independentemente do tempo, libera substâncias que conferem toxidez à suspensão. A ausência de carvão ativo implica na perda irreversível da viabilidade em menos de 24 horas. É fundamental para essa tecnologia estudar a fisiologia e bioquímica do crescimento de fECM em cultivo submerso.
7. O grau de fragmentação e a concentração do inóculo são fundamentais para a cinética de crescimento de fECM, recomendando-se tempos de 20 s em homogeneizadores tipo *blender* a 3600 rpm e concentrações celulares iniciais de  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ .
8. O balanceamento dos nutrientes e a utilização de tampões é uma alternativa para a falta de um sistema de controle do pH. Deve-se utilizar tampões com o  $\text{pK}_a$  do ácido mais próximo possível do pH do meio de cultura. Além disso, o pH deve ser o mais estável possível em todas as etapas, desde a preparação do inóculo até a veiculação e armazenamento do inoculante.
9. As concentrações máximas de carbono do meio de cultura devem ficar em torno de  $16 \text{ g.L}^{-1}$ , podendo variar um pouco em função da morfologia de cada isolado fúngico, devendo-se corrigir sempre a fonte de nitrogênio de modo a manter uma relação C/N mínima de 14.

Meios de cultura mais diluídos podem ser utilizados para atenuar os efeitos dos produtos do metabolismo sobre o crescimento de fungos mais sensíveis.

10. O aumento do diâmetro dos *pellets*, com a conseqüente diminuição da superfície em relação ao volume de biomassa, gera resistência crescente à transferência de massa ao longo do cultivo. Desse modo, fica indeterminada a concentração crítica para o oxigênio dissolvido, devendo-se operar o biorreator com altos níveis de oxigênio dissolvido, a fim de se evitar a limitação por esse nutriente.
11. Uma vazão específica de ar de cerca de 0,5 vvm é suficiente para suprir a demanda de oxigênio dissolvido para concentrações celulares de até 6 g.L<sup>-1</sup>. Vazões mais elevadas podem ser utilizadas, porém, haverá uma maior formação de espuma e possibilidade de arraste de biomassa. O aumento da pressão de operação e a utilização de meios mais diluídos são alternativas ao aumento da vazão, para manter os níveis de oxigênio acima da concentração crítica.
12. Para os valores de  $k_{L,a}$  observados no biorreator *airlift*, os valores reais da concentração de oxigênio dissolvido podem ser obtidos diretamente das leituras utilizando um sensor relativamente rápido ( $k_p$  acima de 280 h<sup>-1</sup>).
13. Os fECM podem apresentar, mesmo quando não estiverem crescendo, uma velocidade de consumo de oxigênio de cerca de 1/3 da média observada durante o crescimento, utilizada para a manutenção das atividades vitais.
14. Para crescimento da biomassa na forma de *pellets*, o comportamento da viscosidade durante o cultivo de fECM é tipicamente newtoniano.
15. O encapsulamento do micélio em gel de alginato de cálcio com utilização de carvão ativo é eficiente para a manutenção da viabilidade por períodos de refrigeração acima de 6 meses.
16. A diminuição do volume das cápsulas do inoculante, devido à perda de umidade para o substrato de plantio, e o conseqüente fechamento dos poros do gel, não impede a germinação das hifas quando estimulada pelas raízes da plântula.
17. Os seis isolados de fECM produzidos nas condições apresentadas mantêm significativa infectividade após vários meses de armazenamento, e podem promover o aumento de crescimento e captação de fósforo pelas plantas.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABASHAR, M.; NARSINGH, U.; ROUILLARD, A.E.; JUDD, R. Hydrodynamic flow regimes, gas holdup and liquid circulation in airlift reactors. **Ind. Eng. Chem. Res.**, 37:1251-1259, 1998.
- AIBA, S.; HUANG, S.Y. Oxygen permeability and diffusivity in polymer membranes in immersed liquids. **Chem. Eng. Sci.**, 24:1149-1159, 1969.
- AIDOO, K.E.; HENDRY, R.; WOOD, J.B. Solid substrate fermentation. **Adv. App. Microbiol.**, 28:201-237, 1982.
- ALEKSIEVA, P.; PEEVA, L. Investigation of acid proteinase biosynthesis by the fungus *Humicola lutea* 120-5 in an airlift bioreactor. **Enz. Mic. Technol.**, 26:402-405, 2000.
- ALVAREZ, M.L.; CERCEDA, M.C. *Chondrogaster angustisporus*, nueva cita para Europa. **Cryp. Mycol.**, 26:113-122, 2005
- ALVES, J.R.; SOUZA, O.; PODLECH, P.A.S.; GIACHINI, A.J.G; OLIVEIRA, V.L. Efeito de inoculante ectomicorrízico produzido por fermentação semi-sólida sobre o crescimento de *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Pesq. Agrop. Bras.**, 36:307-313, 2001.
- ANDERSON, I.C.; CHAMBERS, S.M.; CAIRNEY, J.W.G. Intra- and interspecific variation in patterns of organic and inorganic nitrogen utilization by three Australian *Pisolithus* species. **Mycol. Res.**, 103:1579-1587, 1999.
- ATENAS, M.; CLARK, M.; LAZAROVA, V. Holdup and liquid circulation velocity in a rectangular air-lift bioreactor. **Ind. Eng. Chem. Res.**, 38:944-949, 1999.
- BADINO Jr., A.C.; FACCIOTTI, M.C.; SCHMIDELL, W. Improving  $k_La$  determination in fungal fermentation, taking into account electrode response time. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, 75:469-474, 2000.
- BADINO Jr., A.C.; FACCIOTTI, M.C.; SCHMIDELL, W. Volumetric oxygen transfer coefficients ( $k_La$ ) in batch cultivations involving non-Newtonian broths. **Biochem. Eng. J.**, 8:111-119, 2001.
- BAILEY, J.E. Biochemical reaction engineering and biochemical reactors. **Chem. Eng. Sci.**, 35:1854-1886, 1980.
- BAILEY, J.E.; OLLIS, D.F. **Biochemical Engineering Fundamentals**, McGraw-Hill, New York, p.411-496, 1977.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Editora da UNICAMP, Campinas, 299p., 1996.
- BELLO, R.A.; ROBINSON, C.W.; MOO-YOUNG, M. Gas-holdup and overall volumetric oxygen transfer coefficient in airlift contactors. **Biotechnol. Bioeng.**, 27:369-381, 1985.

- BELLO, R.A.; ROBINSON, C.W.; MOO-YOUNG, M. Liquid circulation and mixing characteristics of airlift contactors. **Can. J. Chem. Eng.**, 62:573-577, 1984.
- BENSON, E.E. Cryopreservation. In: **Plant cell culture – a practical approach**. (Dixon, R.A. e Gonzales, R.A., eds.), 2ª ed., Oxford: Oxford University Press, p.147-167, 1994.
- BLLENKE, H. Loop reactors. **Adv. Biochem. Eng.**, 13:121-214, 1979.
- BOGEAT-TRIBOULOT, M.B.; BARTOLI, F.; GARBAYE, J.; MARMEISSE, R.; TAGU, D. Fungal ectomycorrhizal community and drought affect root hydraulic properties and soil adherence to roots of *Pinus pinaster* seedlings. **Plant and Soil**, 267:213-223, 2004.
- BONNARME, P.; DELATTRE, M.; DROUET, H.; CORRIEU, G., ASTHER, M. Toward a control of lignin and manganese peroxidases hypersecretion by *Phanerochaete chrysosporium* in agitated vessels: evidence of the superiority of pneumatic bioreactors on mechanically agitated bioreactors. **Biotechnol. Bioeng.**, 41:440-450, 1993.
- BOUGHER, N.L.; GROVE, T.S.; MALAJCZUK, N. Growth and phosphorus acquisition of karri (*Eucalyptus diversicolor* B. Muell.) seedlings inoculated with ectomycorrhizal fungi in relation to phosphorus supply. **New Phytol.**, 4:77-85, 1990.
- BOX, G.E.P; HUNTER, W.G.; HUNTER, J.S. **Statistics for Experiments**. John Wiley & Sons, Toronto, 654p., 1978.
- BOYLE, C.D.; ROBERTSON, W.J. SALONIUS, P.O. Use of mycelial slurries of micorrhizal fungi as inoculum for commercial tree seedlings nurseries. **Can. J. For. Res.** 17:1418-1486, 1987.
- BRODELIUS, P.; DEUS, B.; MOSBACH, K.; ZENK, M.H. Immobilized plant cells for the production and transformation of natural products. **FEBS Lett.**, 103:93-97, 1979.
- BRUNDRETT, M.; BOUGHER, N.; DELL, B.; GROVE, T.; MALAJCZUK, N. **Working with mycorrhizas in forestry and agriculture**. Camberra: ACIAR, 374 p., 1996.
- BURGESS, T.I.; MALAJCZUK, N.; GROVE, T.S. The ability of 16 ectomycorrhizal fungi to increase growth and phosphorus uptake of *Eucalyptus globulus* Labill. and *E. diversicolor* F. Muell. **Plant and Soil**, 153:155-164, 1993.
- BURRIS, V.L.; MCGINNIS, D.F.; LITTLE, J.C. Predicting oxygen transfer and water flow rate in airlift aerators. **Water Research**, 36:4605-4615, 2002.
- CANNEL, E.; MOO-YOUNG, M. Solid-state fermentation systems. **Proc. Biochem.**, 15:24-28, 1980.
- CAPPUCCINO, J.G.; SHERMAN, N. **Microbiology: A Laboratory Manual**. Benjamin Cummings: San Francisco, 2002.
- CARON NETO, M. O manejo de Pinus em função das perspectivas do mercado de toras. In: **Anais do Simpósio Latino Americano Sobre Manejo Florestal**, Santa Maria: UFSM, p.149-162, 2000.
- CASTELLANO, M.A.; MOLINA, R. Mycorrhizae. In: **The Biological Components: Nursery Pests and Mycorrhizae - The Container Tree Nursery Manual**. (Landis, T.D.; Tinus, R.W.; McDonald,

- S.E.; Barnett, J.P., eds.). Washington: US-Department of Agriculture/Forest Service, p.101-171, 1989.
- CHEN, D.M.; BRIGITTE, B.A.; TAYLOR, A.F.S.; CAIRNEY, W.G. Identification of laccase-like genes in ectomycorrhizal basidiomycetes and transcriptional regulation by nitrogen in *Piloderma byssinum*. **New Phytol.**, 157:547-554, 2003.
- CHIBATA, I.; TOSA, T.; SATO, T. Methods of cell immobilization. In: **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology** (Demain, A.L., Solomon, N.A., eds.). American Society for Microbiology, Washington, DC, p. 217-227, 1986.
- CHISTI, M.Y. **Airlift Bioreactors**. Elsevier Applied Sciences, London, 345p., 1989.
- CHISTI, M.Y.; MOO-YOUNG, M. Airlift reactors: Characteristics, applications and design considerations. **Chem. Eng. Commun.**, 60: 195-242, 1987.
- CHISTI, Y.; JAUREGHI-HAZA, U.J. Oxygen transfer and mixing in mechanically agitated airlift bioreactors. **Biochem. Eng. J.**, 10:143-153, 2002.
- CHISTI, Y.; MOO-YOUNG, M. Prediction of liquid circulation in airlift reactors with biological media. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, 42:211-219, 1988.
- CHOI, P.B.; LEE, W.K. Circulation velocity, gas holdup and volumetric oxygen transfer coefficient in external-loop airlift reactors. **J. Chem. Biotechnol.**, 56:51-58, 1993.
- CORDELL, C.E., MARX, D.H.; MAUL, S.B.; OWEN, J.H. Production and utilization of ectomycorrhizal fungal inoculum in the eastern United States. In: **Mycorrhizae in the next decade. Practical applications and research priorities** (Sylvia, D.M., Hung, L.L, Grahan, J.H, eds.). University of Florida, Gainesville, p. 287-289, 1988.
- DUDDRIDGE, J.A.; MALIBARI, A.; READ, D.J. Structure and function of mycorrhizal rhizomorphs with special reference to their role in water transport. **Nature**, 287:843-836, 1991.
- FACCIOTTI, M.C.R. Fermentação contínua. In: **Biotecnologia Industrial Vol II: Engenharia Bioquímica**. (Schmidell W., Lima U.A., Aquarone E., Borzani W., eds.), São Paulo, Ed. Edgard Blücher Ltda., p. 223-246, 2001.
- FINN, R.K. Agitation and aeration. In: **Biochemical and Biological Engineering Science**. (Blakebrough, N., ed.), Academic Press, London, p. 69-99, 1967.
- FINSTEIN, M.S., LIN, K.W., FISCHLER, G.E. Sludge composting and utilization: **Review of literature on temperature inactivation of pathogens**. Report, N.J. Agricultural Experiment Station, Cook College, Rutgers University, New Brunswick, N.J. 1982.
- FRANCE, R.C.; REID, C.P.P. Pure growth of ectomycorrhizal fungi on inorganic nitrogen sources. **Microb. Res.**, 10:187-195, 1984.
- FRANK, B. On the root – symbiosis – depending nutrition through hypogeous fungi of certain trees. **Ber. Dtsch Bot. Ges.**, 3:128-145, 1885.

- FREITAS, C.; FIALOVÁ, M.; ZAHRADNIK, J.; TEIXEIRA, J.A. Hydrodynamics of a three-phase external-loop airlift bioreactor. **Chem. Eng. Sci.**, 55:4961-4972, 2000.
- FRÖHLICH, S.; LOTZ, M.; KORTE, T.; LÜBBERT, A.; SCHÜGERL, K.; SEEKAMP, M. Characterisation of a pilot plant airlift tower loop bioreactor. **Biotechnol. Bioeng.**, 38:43-55, 1991.
- FU, CC; WU, WT; LU, SY. Performance of airlift bioreactors with net draft tube. **Enz. Microb. Technol.**, 33:332-342, 2003.
- GADEN, E.L. Jr. Fermentation kinetics and productivity. **Chem. Ind.**, 12:154-159, 1955.
- GARBAYE, J. Competitivité des champignons ectomycorhiziens: premiers résultats et application à la sélection de souches pour la mycorhization contrôlée du hêtre et du chêne rouvre dans le nord-est de la France. **Rev. For. Fran.**, 6:33-43, 1984.
- GARBAYE, J. Utilisation des mycorhizes en sylviculture. In: **Les mycorhizes des arbres et plantes cultivées**. (Strullu, D.G., ed.), Paris: Lavoisier, p.197-248, 1990.
- GARLIPP, R.C. Oferta e demanda de madeira de florestas plantadas. In: **Workshop Madeira e Mobiliário**, FEMADE 2000, Curitiba, 2000.
- GAUNT, D.M.; TRINCI, A.P.J.; LYNCH, J.M. Metal ion composition and physiology of *Trichoderma reesei* grown on a chemically defined medium prepared in two different ways. **Trans. Br. Mycol. Soc.**, 83:575-581, 1984.
- GIACHINI, A.J.; OLIVEIRA, V.L.; CASTELLANO, M.A.; TRAPPE, J.M. Ectomycorrhizal fungi in *Eucalyptus* and *Pinus* plantation in southern Brazil. **Mycol.**, 92:1166-1177, 2000.
- GLOWA, K.R.; AROCENA, J.M.; MASSICOTTE, H.B. Extration of potassium and/or magnesium from selected soil minerals by *Piloderma*. **Geomicrobiol. J.**, 20:99-111, 2003.
- GOUVEIA, E.R.; HOKKA, C.O.; BADINO Jr., A.C. The effects of geometry and operational conditions on gás holdup, liquid circulation and mass transfer in an airlift reactor. **Braz. J. Chem. Eng.**, 20:363-374, 2003.
- GREENWOOD, D.J. The effect of oxygen concentration on the decomposition of organic materials in soil. **Plant and Soil**, 14:360-376, 1961.
- HACSKAYLO, E. Carbohydrate physiology of ectomycorrhizae. In: **Ectomycorrhizae: Their ecology and physiology**. (Marks, A.C.; Kozlowsky, T.T, eds.), Academic Press, London, p. 207-230, 1973.
- HARLEY, J.L. Ectomycorrhizal as nutrient absorbing organs. **Proceed. Royal Soc. London**, 203:1-21, 1978.
- HARVEY, L.M. Cultivation techniques for the production of ectomycorrhizal fungi. **Biotechnol. Adv.**, 9:13-29, 1991.
- HEIJNEN, J.J.; VAN'T RIET, K. Influence of very small bubbles on the dynamic  $k_L a$  measurement in viscous gas-liquid systems. **Biotechnol. Bioeng.**, 22:1945-1956, 1980.
- HIKITA, H.; ASAI, S.; TANIGAWA, K.; SEGAWA, K. KITAO, M. Gas-holdup in bubble columns. **Chem. Eng. J.**, 20:59-67, 1980.

- HISS, H. Cinética de processos fermentativos. In: **Biotecnologia Industrial Vol II: Engenharia Bioquímica**. (Schmidell W., Lima U.A., Aquarone E., Borzani W., eds.), São Paulo, Ed. Edgard Blücher Ltda., p. 93-122, 2001.
- HO, C.S.; SHANAHAN, J.F. Carbon dioxide transfer in bioreactors. **CRC Critical Reviews in Biotechnology**, 4:185-252, 1986.
- HOEFLICH, V.A.; SCHAITZA, E.G.; MATTOS, P.P. **Pesquisa Florestal no Brasil: uma visão preliminar**. Brasília: Instituto de Pesquisas Florestais, 2000. <http://www.ipef.br>. Acesso em setembro de 2000.
- HOGAN, J.A., MILLER, F.C., FINSTEIN, M.S. Physical modeling of the composting ecosystem. **Appl. Envir. Microbiol.**, 55:1082-1092, 1989.
- HUMPHREY, A.E.; TAGUCHI, H. Dynamic measurement of the volumetric oxygen transfer coefficient in fermentation systems. **J. Ferm. Technol.**, 44:881-889, 1966.
- HUNG, L.L.; CHIEN, C.Y. Physiological studies on two ectomycorrhizal fungi, *Pisolithus tinctorius* and *Suillus bovinus*. **Trans. Mycol. Soc. Japan**, 19:121-127, 1978.
- HÜPPE, P.; HÖKE, H.; HEMPEL, D.C. Biological treatment of effluents from coal tar refinery using immobilised biomass. **Chem. Eng. Technol.**, 13:73-79, 1990.
- INSTITUTO DE PLANEJAMENTO E ECONOMIA AGRÍCOLA DE SANTA CATARINA. Desempenho do Setor Florestal. In: **Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina 2002-2003**. Florianópolis: Instituto CEPA/SC, p.164-184, 2004.
- IWASE, K. Gluconic acid synthesis by the ectomycorrhizal fungus *Tricholoma robustum*. **Can. J. Bot.**, 70:84-88, 1992.
- JEFFERY, G.H.; BASSET, J.; MENDHAM, J.; DENNEY, R.C. **Análise Química Quantitativa – VOGEL**, 712 p., Editora LTC, RJ, 1992.
- JIN, B.; YU, Q.; YAN, X.Q.; VAN LEEUWEN, J.H. Characterization and improvement of oxygen transfer in pilot plant external air-lift bioreactor for mycelial biomass production. **W. J. Microbiol. Biotechnol.**, 17: 265-272, 2001.
- JOLICOEUR, M.; WILLIAMS, R.D.; CHAVARIE, C.; FORTIN, J.A.; ARCHAM BAULT, J. Production of *Glomus intraradices* propagules an arbuscular mycorrhizal fungus, in an airlift bioreactor. **Biotechnol. Bioeng.**, 63:224-232, 1999.
- JOLY, A.B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 8ª ed., São Paulo, Editora Nacional, 777p., 1987.
- KÄPPELI, O.; FIECHTER, A. A convenient method for the determination of oxygen solubility in different solutions. **Biotechnol. Bioeng.**, 23:1897-1901, 1981.
- KAWASE, W.; MOO-YOUNG, M. Liquid phase mixing in bubble columns with Newtonian and non-Newtonian fluids. **Chem. Eng. Sci.** 41:1969-1977, 1986.

- KAWASE, Y.; MOO-YOUNG, M. Influence of very small bubbles on  $k_La$  measurement in viscous microbiological cultures. **Biotechnol. Bioeng.**, 30:345-347, 1987.
- KELLER, G. Utilization of inorganic and organic nitrogen sources by high-subalpine ectomycorrhizal fungi of *Pinus cembra* in pure culture. **Mycol. Res.**, 100:989-998, 1996.
- KERNAGHAN, G.; HAMBLING, B.; FUNG, M.; KHASA, D. In vitro selection of boreal ectomycorrhizal fungi for use in reclamation of saline alkaline habitats. **Restor. Ecol.** 10:43-51, 2002.
- KESSLER, W.R.; POPOVIC, M.K.; ROBINSON, C.W. Xanthan production in an external-circulation-loop airlift bioreactors. **Can. J. Chem. Eng.**, 71:101-106, 1993.
- KIERSTAN, M.; BUCKE, C. Immobilization of microbial cells, subcellular organelles and enzymes in calcium alginate gels. **Biotechnol. Bioeng.** 19:387-397, 1977.
- KIM, J.H.; LEBEAULT, J.M.; REUSS, M. Comparative study of rheological properties of mycelial broth in filamentous and pelleted forms. **Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 18:11-16, 1983.
- KORMANIK, P.P.; MCGRAW, A.C. Quantification of vesicular-arbuscular mycorrhizae plant roots. In: **Methods and Principles of Mycorrhizal Research.** (Schenck, N.C., ed.), The American Phytopathological Society, St. Paul, p. 37-45, 1982.
- KOSSEN, N.W.F. Bioreactors consolidation and innovation. In: **3<sup>rd</sup> EFB Conference**, Munich, p. 10-10, September, 1984.
- KOSSEN, N.W.F.; METZ, B. The influence of shear upon the morphology of moulds. In: **Abstracts Fifth International Fermentation Symposium**, Berlin, 1976.
- KUEK, C. Issues concerning the production and use of inocula of ectomycorrhizal fungi in increasing the economic productivity of plantations. In: **Management of mycorrhizas in agriculture, horticulture and forestry** (Robson, A.D.; Abbott, L.K.; Malajczuk, N., eds.). Netherlands, p. 221-230, 1994.
- KUEK, C. Shake-flask culture of *Laccaria laccata*, an ectomycorrhizal basidiomycete. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 45:319-326, 1996.
- KUEK, C.; TOMMERUP, I.C.; MALAJCZUCK, N. Hydrogel bead inocula for the production of ectomycorrhizal eucalyptus for plantations. **Mycol. Res.**, 96: 273-277, 1992.
- LAMB, R.J. Effect of D-glucose on utilization of single carbon sources by ectomycorrhizal fungi. **Trans. Br. Mycol. Soc.**, 63:295-306, 1974.
- LAPEYRIE, F.F.; BRUCHET, G. Some factors influencing viability of ectomycorrhizal fungal inoculum. **New Phytol.**, 100:585-593, 1985.
- LAST, F.T.; MASON, P.A.; WILSON, J. Controlled inoculation of sitka spruce with sheathing (ecto-) mycorrhizal fungi - A commercial experience. **Scott. For.**, 38:75-77, 1984.
- LE TACON, F.; GARBAYE, J.; CARR, G. The use of mycorrhizas in temperate and tropical forests. **Symbiosis**, 3:179-206, 1987.

- LE TACON, F.; JUNG, G.; MUGNIER, J.; MICHELOT, P. Efficacité en pépinière forestière d'un inoculum de champignon ectomycorhizien produit en fermenteur et inclus dans une matrice de polymères. **Ann. Sci. For.**, 40:165-176, 1983.
- LE TACON, F.; JUNG, G.; MUGNIER, J.; MICHELOT, P.; MAUPERIN, C. Efficiency in a forest nursery of an ectomycorrhizal fungus inoculum produced in a fermentor and entrapped in polymeric gels. **Can. J. Bot.**, 63:1664-1668, 1985.
- LI, G.Q.; YANG, S.Z.; CAI, Z.L.; CHEN, J.Y. Mass transfer and gas-liquid circulation in an airlift bioreactor with viscous non-Newtonian fluids. **Chem. Eng. J.**, 56:B101-B107, 1995.
- LIMA, W.P. **Impacto ambiental do eucalipto**. São Paulo: Ed. da Universidade de São Paulo, 301 p., 1993.
- LITCHFIELD, J.H.; ARTHUR, M.F. Growth of selected ectomycorrhizal fungi in aerated liquid culture. **Develop. Ind. Microbiol.**, 24:289-293, 1983.
- LITTKER, W.R.; BLEDSOE, C.S.; NADKARNI, M.; CORDELL, C.E. Survival and growth of pine seedlings with *Pisolithus* ectomycorrhizae after two years on reforestation sites in North Carolina and Florida. **For. Sci.**, 23:363-373, 1980.
- MALAJCZUCK, N.; LAPEYRIE, F.; GARBAYE, J. Infectivity of pine and eucalypt isolates of *Pisolithus tinctorius* on roots of *Eucalyptus urophylla* *in vitro*. **New Phytol.**, 114:627-631, 1990.
- MARX, D.H. Ectomycorrhizal fungus inoculation: a tool for improving forest practices. In: Mikola, P. (ed.), **Ectomycorrhiza Research**, Oxford: Clarendon Press, p.13-71, 1980.
- MARX, D.H. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic fungi and soil bacteria. **Phytopathol.** 59:153-163, 1969.
- MARX, D.H.; BRYAN, W.C. Growth and ectomycorrhizal development of loblolly pine seedlings in fumigated soil infested with the fungal symbiont *Pisolithus tinctorius*. **For. Sci.**, 21:245-254, 1975.
- MARX, D.H.; CORDELL, C.E. The use of specific ectomycorrhizas to improve artificial forestation practices. In: **Biotechnology of fungi improving plant growth**. (Whipps, J.M., Lumsden, R.D., eds.), New York, p. 1-25, 1989.
- MARX, D.H.; CORDELL, C.E. Inoculation of fall-and-Spring-Sown longleaf pine seedlings with *Pisolithus tinctorius*. **US Department of Agriculture, Forest Service, Southeastern Forest Experiment Station, Research Note SE-358**, Asheville, 5p., 1990.
- MARX, D.H.; HATCH, A.B.; MENDICINO, J.F. High soil fertility decreases sucrose content and susceptibility of loblolly pine roots to ectomycorrhizal infection by *Pisolithus tinctorius*. **Can. J. Bot.**, 55:1569-1574, 1977.
- MARX, D.H.; RUEHLE, J.L.; KENNEY, D.S.; CORDELL, C.E.; RIFFLE, J.W.; MOLINA, R.J.; PAWUK, W.H.; NAVRATIL, S.; TINUS, R.W.; GOODWIN, O.C. Commercial vegetative inoculum of *Pisolithus tinctorius* inoculation techniques of development of ectomycorrhizae on container-grow tree seedlings. **For. Sci.**, 28:273-400, 1982.

- MARX, D.H.; ZAK, B. Effect of pH on mycorrhizal formation of slash pine in aseptic culture. **For. Sci.**, 11:66-75, 1965.
- MAUPERIN, C.H.; MORTIER, F.; GARBAYE, J.; LE TACON, F.; CARR, G. Viability of an ectomycorrhizal inoculum produced in a liquid medium and entrapped in a calcium alginate gel. **Can. J. B.**, 65:2326-2329, 1987.
- MENG, A.X.; HILL, G.A.; DALAI, A.K. Hydrodynamic characteristics in an external loop airlift bioreactor containing a spinning sparger and a packed bed. **Ind. Eng. Chem. Res.**, 41:2124-2128, 2002.
- MERCHUK, J.C. Gas holdup and liquid velocity in a two-dimensional airlift reactor. **Chem. Eng Sci.**, 41:11-16, 1986.
- METZ, B.; KOSSEN, N.W.F.; VAN SUIJDAM, J.C. The rheology of mould suspensions. **Adv. Biochem. Eng.**, 11:103-156, 1979.
- MIKOLA, P. Application of mycorrhizal symbiosis in forestry practices. In: **Ectomycorrhizae, their ecology and physiology**. (Marks, G.C., Kozłowski, T.T., eds.), New York, Academic Press, p. 383-411, 1973.
- MIKOLA, P. The role ectomycorrhizae in forest nurseries. **Agr. Ecosys. Environm.**, 28:343-450, 1989.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, 31:426-428, 1959.
- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Programa Nacional de Florestas. <http://www.mma.gov.br/port/sbf/pnf>. Acesso em junho de 2004.
- MITARD, A.; RIBA, J.P. Morphology and growth of *Aspergillus niger* ATCC26036 cultivated at several shear rates. **Biotechnol. Bioeng.** 32:835-840, 1988.
- MOO-YOUNG, M.; BLANCH, H.W. Design of biochemical reactors: Mass transfer criteria for simple and complex systems. **Adv. Biochem. Eng.**, 19:1-69, 1981.
- MORESI, M. Optimal design of airlift fermenters. **Biotechnol. Bioeng.**, 23:2537-2560, 1981.
- NARLOCH, C. **Interação microrganismos solubilizadores de fosfatos – fungos ectomicorrízicos e o crescimento de *Pinus taeda* L.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil, 153p., 2002.
- NIKAKHTARI, H.; HILL, G.A. Enhanced oxygen mass transfer in an external loop airlift bioreactor using a packed bed. **Ind. Eng. Chem. Res.**, 44: 1067-1072, 2005.
- NORKRANS, B. Some mycorrhiza-forming *Tricholoma* species. **Svensk Botan. Tidskr.**, 43:485-490, 1949.
- OLIVEIRA, L.P. **Produção de inoculante, seleção e aplicação de fungos ectomicorrízicos em mudas de *Pinus taeda* L.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil, 77p., 2004.

- OLIVEIRA, L.P.; ROSSI, M.J.; FURIGO Jr., A.; SILVA FILHO, G.N.; OLIVEIRA, V.L. Viability and infectivity of an ectomycorrhizal inoculum produced in an airlift bioreactor and immobilized in calcium alginate. **Braz. J. Microbiol.** (*in press*), 2006.
- OLIVEIRA, M.S.; PRADELLA, J.G.C.; LOPES, S.A.R.; PINTO, A.G. Cultivo de *Pisolithus tinctorius* em fermentação submersa – resultados preliminares. In: **Resumos da III Reunião Brasileira sobre Micorrizas**, Piracicaba, p.102, 1989.
- OLIVEIRA, V.L.; SCHMIDT, V.D.B.; GOMES, N.C.; MAIA, D.C. Spécificité de champignons ectomycorhiziens vis-à-vis d'*Eucalyptus viminalis* Labill et *E. dunnii* Maiden. **Agronomie**, 14:57-62, 1994.
- ONKEN U.; WEILAND P. Hydrodynamics and mass-transfer in an airlift loop fermenter. **Eur. J. App. Microbiol. Biotechnol.** 10:31-40, 1980.
- OSÉE MUYIMA, N.Y.; CLOETE, T.E. Immobilisation of *Acinetobacter johnsonii* cells within alginate beads. **Water SA**, 21:239-244, 1995.
- PEDRINI, M.R.S. **Desenvolvimento e aplicações de um biorreator airlift com circulação externa**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, 101p., 1997.
- PEDRINI, M.R.S.; SOUZA, J.A.R.; FURIGO Jr., A. Construção e estudos hidrodinâmicos em um reator airlift com circulação externa. In: **V SHEB**, Maringá-PR, 1996.
- PIROZYNSKY, K.A. Interactions between fungi and plants through the ages. **Can. J. Bot.**, 59:1824-1827, 1981.
- PIRT, S.J. Microbe and cell cultivation. Londres. Willian Clowes & Sons, 217 p.,1975.
- POLLARD, D.J.; SHANLOU, P.A.; LILLY, M.D.; ISON, A.P. *Saccharomyces cerevisiae* fermentations in a pilot scale airlift bioreactor: comparison of air sparger configurations. **Bioproc. Eng.**, 15:279-290, 1996.
- PRADELLA, J.G.C.; ZUCCOLO, M.; LOPES, S.A.R.; OLIVEIRA, M.S. *Pisolithus tinctorius* vegetativa mycelia production: effects of nitrogen sources and cultivation in stirred tank fermenter. **Rev. Microbiol.**, 22:7-11, 1991a.
- PRADELLA, J.G.C.; ZUCCOLO, M.; OZÓRIO FILHO, H.L.; SABINO, E.; OLIVEIRA, M.S. Influência da adição de extrato de levedura ao meio de Melin-Norkrans modificado (MNM) para o cultivo em fase líquida de *Pisolithus tinctorius* isolado de *Eucalyptus* sp. In: **Resumos da 4ª Reunião Brasileira sobre Micorrizas**, Mendes, 204p., 1991b.
- PROSSER, J.I.; TOUGH, A.J. Growth mechanisms and growth kinetics of filamentous microorganisms. **Crit. Rev. Biotechnol.**, 10:253-274, 1991.
- REVISTA DA MADEIRA. O eucalipto e suas origens, Nº 59, 2001.
- REVISTA DA MADEIRA. O potencial do eucalipto para a produção de madeira sólida. Nº 75, 2003.
- RODRIGUES, L.S.; KASUYA, M.C.M.; BORGES, A.C. Viability of ectomycorrhizal fungus mycelium entrapped in calcium alginate gel. **Mycorrhiza**, 8:263-266, 1999.

- ROMMANELLI, R.C.; SEBBENN, A.M. Parâmetros genéticos e ganhos na seleção para produção de resina em *Pinus elliottii* var. *elliottii* no sul do estado de São Paulo. **Rev. Inst. Flor.**, 16:11-23, 2004.
- ROSSI, M.J. **Produção de inoculante de fungo ectomicorrízico utilizando fermentação no estado líquido em biorreator airlift**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil, 93p., 2001.
- ROSSI, M.J.; PERCINOTTI, C.C.; FURIGO Jr., A.; OLIVEIRA, V.L. Produção de inoculante de fungos ectomicorrízicos em biorreator *airlift* para aplicação em viveiros florestais. In: **Anais do XIV Simpósio Nacional de Fermentações** (CD-ROM), Florianópolis-SC, 2003.
- ROSSI, M.J.; SOUZA, J.A.R.; OLIVEIRA, V.L. Inoculum production of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus microcarpus* in an airlift bioreactor. **App. Microbiol. Biotechnol.**, 59:175-181, 2002.
- ROSSI, M.J.; STREIT, H.C.; FURIGO Jr., A.; BRUM, A.A.; MENDONÇA, M.M. Inoculante de *Agaricus brasiliensis* produzido em biorreator *airlift* e encapsulado em gel de alginato de cálcio. In: **Anais da FERTBIO2004** (CD-ROM), Lages-SC, 2004.
- ROSSI, M.J.; STREIT, H.C.; OLIVEIRA, V.L.; FURIGO Jr., A. Construção e caracterização hidrodinâmica de um biorreator *airlift* com circulação externa. In: **XV Simpósio Nacional de Bioprocessos** (CD-ROM), Recife-PE, 2005a.
- ROSSI, M.J.; STREIT, H.C.; OLIVEIRA, V.L.; FURIGO Jr., A. Transferência e consumo de oxigênio durante o cultivo de fungo ectomicorrízico em biorreator *airlift* com circulação externa: determinação do  $k_La$  e da  $Q_{O_2}$ . In: **XV Simpósio Nacional de Bioprocessos** (CD-ROM), Recife-PE, 2005b.
- ROSSI, M.J.; STREIT, H.C.; OLIVEIRA, V.L.; FURIGO Jr. Solubilidade do oxigênio em meio para cultivo de fungos ectomicorrízicos. In: **Anais da 5ª SEPEX - Semana de Ensino, Pesquisa e Extensão**, (CD-ROM), UFSC, Florianópolis, 2005c.
- ROSSI, M.J.; STREIT, H.C.; OLIVEIRA, V.L.; FURIGO Jr. Efeito da presença de plantas hospedeiras na viabilidade de inoculante de fungos ectomicorrízicos. In: **Anais da 5ª SEPEX - Semana de Ensino, Pesquisa e Extensão**, (CD-ROM), UFSC, Florianópolis, 2005d.
- ROYSE, S. Scaling up for mammalian cell culture. **Chem. Engineer**, November, p. 12-13, 1987.
- SAWYER, N.A.; CHAMBERS, S.M.; CAIRNEY, J.W.G. Utilisation of inorganic and organic phosphorus sources by isolates of *Amanita muscaria* and *Amanita* species native to temperate eastern Australia. **Aust. J. Bot.**, 51:151-158, 2003.
- SCHMIDELL, W. Agitação e aeração em biorreatores. In: **Biotechnologia Industrial Vol II: Engenharia Bioquímica**. (Schmidell W., Lima U.A., Aquarone E., Borzani W., eds.), São Paulo, Ed. Edgard Blücher Ltda., p. 277-331, 2001.
- SCHUMACHER, M.V. Aspectos ambientais das plantações de pinus e eucaliptos. **Revista da Madeira**, N° 77, 2003.
- SCHÜRCEL, K.; LÜKE, J.; OELS, U. Bubble column bioreactors. **Adv. Biochem. Eng.**, 7:1-84, 1977.

- SEGEL, I.H. **Bioquímica – Teoria e problemas**. Livros Técnicos e Científicos, 1979.
- SELOSSE, M.A.; BOUCHARD, D.; MARTIN, F.; LE TACON, F. Effect of *Laccaria bicolor* strains inoculated on Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) several years after nursery inoculation. **Can. J. For. Res.**, 30:360-371, 2000.
- SHIMIZU, J.Y. Pinus na silvicultura brasileira. **Revista da Madeira**, N° 83, 2004.
- SIEGEL, M.H.; MERCHUK, J.C.; SCHÜGERL, K. Airlift reactor analysis: interrelationships between riser, downcomer, and gas-liquid separator behaviour, including gas recirculation effects. **AIChE J.**, 32:1585-1596, 1986.
- SIEGEL, M.H.; ROBINSON, C.W. Application of airlift gas-liquid-solid reactors in Biotechnology. **Chem. Engin. Sci.**, 47:3387-3394, 1992.
- SILVA FILHO, G.N.; NARLOCH, C.; SCHARF, R. Solubilização de fosfatos naturais por microrganismos isolados de cultivos de *Pinus* e *Eucalyptus* de Santa Catarina. **Pesq. Agrop. Bras.**, 37:847-854, 2002.
- SINGER, R.; ARAÚJO, I.J.S. Litter decomposition and ectomycorrhiza in Amazonian forests. 1. A comparison of litter decomposing and ectomycorrhizal basidiomycetes in latosol-terra-firme rain forest and white podzol campinarana. **Acta Amazonica**, 9:25-41, 1979.
- SMART, N.J.; FOWLER, M.W. An airlift column bioreactor suitable for large-scale cultivation of plant cell suspensions. **J. Experim. Bot.**, 35:531-537, 1984.
- SMITH, R.A. Nutritional study of *Pisolithus tinctorius*. **Mycol.**, 74: 54-58, 1982.
- SMITH, S.E.; READ, D.J. **Mycorrhizal symbiosis**, 2ª ed, Academic Press , London, 605p., 1997.
- SMITS, J.P., JANSSENS, R.J.J., KNOL, P.; BOL, J. Modelling of the glucosinolate content in solid state fermentation of rapeseed meal with fuzzy logic. **J. Ferm. Bioeng.**, 77:579-581, 1994.
- SOARES, C.H.L.; DURAN, N. Biodegradation of chlorolignin and lignin-like compounds contained in E<sub>1</sub>-pulp bleaching effluent by fungal treatment. **App. Biochem. Biotechnol.**, 95: 135-149, 2001.
- SOARES, I.; BORGES, A. C.; BARROS, N. F.; BELLEI, M. M. Níveis de fósforo na formação de ectomicorrizas em mudas de eucalipto. **Rev. Bras. Ciência Solo**, 14:327-332, 1990.
- SOARES, T.S.; CARVALHO, R.M.M.A.; do VALE, A.B. Avaliação econômica de um povoamento de *Eucalyptus grandis* destinado a multiprodutos. **Revista Árvore**, 27:689-694, 2003.
- SOUZA, L.A.B. **Seleção de fungos ectomicorrízicos eficientes para promoção do crescimento de *Eucalyptus dunnii* Maiden**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, Brasil, 97 p., 2003.
- SOUZA, L.A.B.; SILVA FILHO, G.N.; OLIVEIRA, V.L. Eficiência de fungos ectomicorrízicos na absorção de fósforo e na promoção do crescimento de eucalipto. **Pesq. Agrop. Bras.**, 39:349-355, 2004.
- STANBURY, P.F.; WHITAKER, A.; HALL, S.J. **Principles of Fermentation Technology**, 2ª. edição, New York: Pergamon, 357p., 1995.

- STREIT, H.C.; ROSSI, M.J. Estudo nutricional para produção de fungos ectomicorrízicos. In: **XIX Congresso Regional de Iniciação Científica e Tecnológica em Engenharia** (CD-ROM), UFPR, Curitiba-PR, 2004.
- STREIT, H.C.; ROSSI, M.J.; OLIVEIRA, V.L.; FURIGO Jr., A. Aplicação de inoculantes de fungos ectomicorrízicos produzidos por processos fermentativos em viveiros de essências florestais. In: **XV Seminário de Iniciação Científica** (CD-ROM), UFSC, Florianópolis-SC, 2005a.
- STREIT, H.C.; ROSSI, M.J.; OLIVEIRA, V.L.; FURIGO Jr., A. Cinética de crescimento do fungo ectomicorrízico *Scleroderma* sp. em meio líquido em cultivo estático. In: **VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química – Iniciação Científica** (CD-ROM), UNICAMP, Campinas-SP, 2005b.
- STREIT, H.C.; ROSSI, M.J.; GHISI, J.L.; FURIGO Jr., A. Viabilidade de inoculante ectomicorrízico em presença de plantas de *Eucalyptus dunnii*. In: **XIV Seminário de Iniciação Científica** (CD-ROM), UFSC, Florianópolis-SC, 2004.
- SU, W.W.; HE, B. Secreted enzyme production by fungal pellets in a perfusion bioreactor. **J. Biotechnol.**, 54:43-52, 1997.
- TAGUCHI, H.; YOSHIDA, T.; TOMITA, Y.; TERAMOTO, S. The effects of agitation shock on mycelia on agitation of mycelial suspensions. **J. Ferm. Technol.**, 46:814, 1968.
- TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S. J. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2ªed. Porto Alegre: UFRGS, 174p., 1995.
- TENG, W.L. Activated charcoal affects morphogenesis and enhances sporophyte regeneration during leaf cell suspension culture of *Platyserium bifurcatum*. **Plant Cell Reports**, 17: 77-83, 1997.
- THEODOROU, C. Introduction of mycorrhizal fungi into soil by spore inoculation of seed. **Austr. For.**, 35:23-26, 1971.
- THOMSON, B.D.; GROVE, T.S.; MALAJCZUK, N. The effectiveness of ectomycorrhizal fungi in increasing the growth of *Eucalyptus globulus* Labill. in relation to root colonization and hyfal development in soil. **New Phytol.**, 126:517-524, 1994.
- TISDALL, J.M.; SMITH, S.E.; RENGASAMY, P. Aggregation of soil by fungal hyphae. **Austr. J. Soil Res.**, 35: 55-60, 1997.
- TOMAZELLO Filho, M.; KRÜGNER, T.L. Aspectos da associação micorrízica em *Pinus* spp. **Série Técnica do Instituto de Estudos Florestais**, Departamento de Silvicultura da ESALQ-USP, 3:1-32, 1982.
- TRAPPE, J.M. Selection of fungi for ectomycorrhizal inoculation in nurseries. **Annu Rev. Phytopathol.**, 15:203-222, 1977.
- TRINDER, P. Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. **J. Clin. Pathol.**, 22:158-161, 1969.
- TYAGI, Z.R.D.; TRAN, F.T.; AGBEBAVI, T.J. Mesophilic e thermophilic digestion of municipal sludge in an airlift U-shape bioreactor. **Biol. Wastes**, 31:251-266, 1990.

- Van BENTHUM, W.A.J.; van der LANS, R.G.J.M.; van LOOSDRECHT, M.C.M.; HEIJNEN, J.J. The biofilm airlift suspension extension reactor – II: Three-phase hydrodynamics. **Chem. Eng. Sci.**, 55:699-701, 2000.
- VELIKY, I.A.; WILLIAMS, R.E. The production of ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* immobilized in polycation-stabilized calcium alginate gels. **Biotechnol. Lett.**, 3:275-280, 1981.
- VOZZO, J.A.; HACKSKAYLO, E. Inoculation of *Pinus caribea* with ectomycorrhizal fungi in Puerto Rico. **For. Sci.**, 17:239-241, 1971.
- WALKER, R.F. Growth and nutritional responses of containerized sugar and Jeffrey pine seedlings to controlled release fertilization and induced mycorrhization. **For. Ecol. Manage.**, 149:103-179, 2001.
- WALTER, J.F., PAAU, A.S. Microbiol inoculant production and formulation. In: **Soil Microbiol Ecology**. (Metting Jr., F.B., ed.), Marcel Dekker, New York, p. 579-594, 1993.
- WASE, J.; McMANAMEY, W.J.; RAYMAHASAY, S.; VAID, A.K. Comparisons between cellulase production by *Aspergillus fumigatus* in agitated vessels and in an air-lift fermentor. **Biotechnol. Bioeng.**, 27:1166-1172, 1985.
- WHITMAN, W.G. The two-film theory of absorption. **Chem. Met. Eng.**, 29:147-153, 1923.
- WILKINS, D.A. The influence of sheathing (ecto) mycorrhizas of trees on the uptake and toxicity of metal. **Agric. Ecosyst. Environ.**, 35:245-260, 1991.
- WILLENBORG, A.; SCHMITZ, D.; LELLEY, J. Effects of environmental stress factors on ectomycorrhizal fungi *in vitro*. **Can. J. Bot.**, 68:1741-1746, 1990.
- WINKLER, L. W. Die Bestimmung des im Wasser gelösten Sauerstoffes. **Ber. dtsh. chem. Ges.**, 21:2843-2855, 1888.
- WU, J.Y.; WU, W.T. Fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae* in an airlift reactor with net draft tube. **Biotechnol. Prog.**, 2:230-233, 1991.
- YANG, R.D.; HUMPHREY, A.E. Dynamics and steady state studies of phenol biodegradation in pure and mixed cultures. **Biotechnol. Bioeng.**, 17:1211-1235, 1975.
- YOKOMIZO, N.K.S. Micorrizas em essências florestais. **Anais da I Reunião Brasileira sobre Micorrizas**. Lavras, Brasil: UFLA, p. 212, 1986.

## APÊNDICE A:

Exemplo da planilha elaborada para balanceamento de nutrientes do meio de cultura.

Componentes	Meio Mínimo	Meio Complexo	Meio PG	Meio MNM	Meio PGK	Meio PGKM	PGKM diluído	Sol. estoque (p/ PGKM)
	(g.L <sup>-1</sup> )	(g.L <sup>-1</sup> )	(g.L <sup>-1</sup> )	(g.L <sup>-1</sup> )	(g.L <sup>-1</sup> )	(g.L <sup>-1</sup> )	(g.L <sup>-1</sup> )	P/ 500 mL
Glicose (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	15,00	8,00	30,00	10,00	10,00	14,00	10,00	-
Peptona	0,50	5,50	10,00	-	3,33	5,00	2,50	-
Extrato de malte	0,10	3,00	-	3,00	-	3,00	1,50	-
Extrato de levedura			2,00	-	0,67	-		
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0,90	0,25	3,00	-	1,00	0,90	0,70	45,00
NH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub> (uréia)	0,10	0,05	-	-	-	0,10	0,07	5,00
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	-	-	0,750	-	-		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,264	0,264	2,380	0,500	0,264	0,264	0,500	13,20
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,628	0,628	5,650	0,700	0,628	0,628	0,700	31,40
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	-	-	-	0,050	-	-		
NaCl	-	-	-	0,025	-	-		
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,3300	0,3300	1,0000	0,1500	0,3300	0,3300	0,2310	16,50
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,0021	0,0021	0,0064	-	0,0021	0,0021	0,0015	0,105
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,0006	0,0006	0,0019	-	0,0006	0,0006	0,0004	0,030
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,0005	0,0005	0,0015	-	0,0005	0,0005	0,0004	0,025
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,0004	0,0004	0,0011	-	0,0004	0,0004	0,0003	0,020
FeCl <sub>3</sub> (solução 1%)	-	-	-	1,2 mL	-	-		
Tiamina-HCl	-	-	-	100 µg	-	-		
Na <sub>2</sub> Mo <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,00200	0,00200	-	-	-	0,00200		0,100
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,00300	0,00300	-	-	-	0,00300		0,150
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,00003	0,00003	-	-	-	0,00003		0,002
KI	0,00075	0,00075	-	-	-	0,00075		0,038
Sol. equimolar A/C 0,1M	80 mL.L <sup>-1</sup>	80 mL.L <sup>-1</sup>	-	-	-	80 mL.L <sup>-1</sup>	80 mL.L <sup>-1</sup>	
ágar-ágar	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	
Sólidos solúveis (g)	17,83	18,03	54,04	15,18	16,23	24,23	16,23	
Relação C/N	15,0	28,7	10,0	14,1	10,0	14,6	12,8	
Relação C/N atômica	16,6	28,9	11,4	15,2	11,4	16,2	13,7	Conv.
Relação C/N biossíntese	6,3	12,0	4,2	5,9	4,2	6,1	5,6	0,46
Biomassa prevista:	6,3	3,36	12,6	4,2	4,2	5,88	4,20	
	bactérias	leveduras	fungos			Conv.		
Carbono	51,5	47,5	51,5			0,42		
Nitrogênio	13,5	9,25	8,5					
C/N	4	5	6					
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	PM	37,5						
		PA						
C		12,01		Glicose		180,06		
H		1,00		Fosfato de amônio		131,97		
N		14,00		Nitrato de amônio		80,00		
O		16,00		Uréia		60,01		
P		30,97						

Quadro A-1 Planilha elaborada para balanceamento de nutrientes do meio de cultura.

## APÊNDICE B:

Utilização de medidas dos gases de saída para determinação de X,  $Q_{O_2}$  e  $k_L a$ .

### Estimativa do consumo de oxigênio:

- **Dados:**

Vazão específica mínima de ar:  $0,20 \text{ vvm} = 1 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$

Volume molar do ar nas CNTP:  $22,4 \text{ L} = 44,6 \text{ mmol}$

- **Consumo máximo de  $O_2$ :**

Considerações:

- Máxima produção de biomassa:  $0,84 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  em 24 h (ROSSI *et al.*, 2002):

- conversão ( $Y_{X/S}$ ):  $\approx 0,42$

- o substrato é utilizado apenas para biomassa e energia (respiração)

→ máximo substrato para energia:  $1,16 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \times 5 \text{ L} = 5,8 \text{ g}$  em 24 h =  $0,004 \text{ g} \cdot \text{min}^{-1} = 4,03 \text{ mg} \cdot \text{min}^{-1}$

Da estequiometria da reação:

1 mol  $C_6H_{12}O_6$  consome 6 moles de  $O_2$

180 g → 192 g Fator: 1,07

Tem-se que o consumo máximo de  $O_2 = 4,03 \times 1,07 = 4,31 \text{ mg} \cdot \text{min}^{-1}$

$n = m \div PM = 4,31 \text{ mg} \div 32 \text{ g} = 0,135 \text{ mmol}$

Consumo máximo de  $O_2 = 0,135 \text{ mmol} \cdot \text{min}^{-1}$

**Fração de  $O_2$  no ar de entrada:** 0,209

Para a vazão de  $1 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$  temos uma entrada de  $9,366 \text{ mmol} \cdot \text{min}^{-1}$

Então: entrada – consumo máximo =  $9,366 - 0,135 = 9,231 \text{ mmol} \cdot \text{min}^{-1}$

Fração de  $O_2$  no ar de saída =  $9,231 \text{ mmol} \cdot \text{min}^{-1} \div 44,6 \text{ mmol} = 0,207$

Diferença de  $O_2$  na entrada e na saída:  $0,209 - 0,207 = 0,002 = 0,2\%$

### Especificação do erro de medição do sensor

Calibrado em SAT: 0,5% do valor medido

Calibrado em CONC:  $0,05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$

Dessa forma, mesmo para a mais baixa vazão de ar utilizada neste estudo, o valor a ser medido para o máximo consumo de  $O_2$  estimado ainda é menor que o próprio erro da medida. A determinação de parâmetros de transferência de massa através do método do balanço gasoso, bem como da utilização do balanço elementar para obtenção de curvas de crescimento, não são possíveis devido às pequenas variações ao longo do tempo de cultivo. As diferenças de velocidade de crescimento de fungos ectomicorrízicos com relação a bactérias e leveduras são de ordem superior a 10.

### Estimativa da produção máxima de CO<sub>2</sub>:

Os dados cinéticos e estequiométricos necessários para estimar a produção de CO<sub>2</sub> foram obtidos dos estudos com o isolado UFSC-Pt116 (ROSSI *et al.*, 2002).

- **Velocidade máxima de consumo de substrato**

Da curva de crescimento tem-se:

$$V_{\text{máx}} = 2,0 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1} \cdot 5 \text{ L} = 10,0 \text{ g.dia}^{-1}$$

Como a conversão de substrato em biomassa é da ordem de 40%, 6,0 g.dia<sup>-1</sup> é transformado em CO<sub>2</sub>.

- **Velocidade máxima de produção de CO<sub>2</sub>**

Da estequiometria da reação de oxidação da glicose, tem-se:



Assim:

$$V_{\text{CO}_2 \text{ máx}} = 1,47 \cdot V_{\text{máx}} \times 6,0 = 8,82 \text{ g.dia}^{-1} \approx 0,0061 \text{ g.min}^{-1}$$

A concentração de CO<sub>2</sub> nos gases de saída depende da vazão. Então, admitindo a vazão média de 1,8 L.min<sup>-1</sup> (0,36 vvm para o biorreator de 5 L), tem-se:

$$0,0061 \text{ g.min}^{-1} \div 1,8 \text{ L.min}^{-1} = 0,0034 \text{ g.L}^{-1} = 3,4 \text{ mg.L}^{-1} \approx 0,077 \text{ mmol}_{\text{CO}_2} \cdot \text{L}^{-1}$$

- **Volume molar do ar nas CNTP**

$$\approx 22,4 \text{ L} \rightarrow 1 \text{ L tem } 44,6 \text{ mmol}$$

Então:

$$0,077 \text{ mmol}_{\text{CO}_2} \cdot \text{L}^{-1} \div 44,6 \text{ mmol}_{\text{ar}} = 0,0017 \text{ mmol}_{\text{CO}_2} \cdot \text{mmol}_{\text{ar}}^{-1} = 1734 \text{ ppm} = 0,17\%$$

A concentração de CO<sub>2</sub> no ar é de aproximadamente 0,3%, resultando numa concentração máxima de 0,47% de CO<sub>2</sub> no gás de saída do biorreator, cerca da metade da faixa de medida do sensor Testo 535 (Figura A-1), possibilitando ainda uma folga bastante razoável para fungos com maior velocidade de crescimento.

**Dados técnicos - Testo 535**

Temperatura de armazenamento	-20.0...70.0 °C	
Temperatura de operação	0.0...50.0 °C	
Umidade de operação	0.0...99.0 f	
Tipo de bateria	Pilha 9V	
Vida útil da bateria	6.0 h	
Peso	300.0 g	
Dimensões (CxIxH)	57.0 x 190.0 x 42.0 mm	

Tipo de sonda (valor de medição)	Faixa de medição		
Canal 2 sensor infravermelho (Dióxido de carbono)	0.0 ... 9999.0 ppm CO2	Precisão	+/-2.0% del v.m. (0.0 ... 5000.0 ppm CO2) +/-3.0% del v.m. (5001.0 ... 9999.0 ppm CO2)
		Resolução	+/-1.0 ppm CO2 (0.0 ... 9999.0 ppm CO2)
Canal 2 sensor infravermelho (Dióxido de carbono)	0.0 ... 1.0 Vol. % CO2	Resolução	+/-0.0010 Vol. % CO2 (0.0 ... 1.0 Vol. % CO2)

Figura A-1. Modelo de sensor com resolução para medidas de CO<sub>2</sub> nos gases de saída do biorreator.

**APÊNDICE C:**

Tempo necessário para atingir a saturação do meio de cultura com oxigênio.

A velocidade de transferência de oxigênio para um líquido é dada por:

$$\frac{dC_L}{dt} = k_L a (C_S - C_L)$$

A integração da equação anterior para os limites  $t=0$ , onde  $C_L=C_{L0}$  e,  $C_L=C_L$  em  $t=t$ , resulta que:

$$\ln\left(\frac{C_S - C_{L0}}{C_S - C_L}\right) = k_L a \cdot t$$

Inicialmente nenhum oxigênio está presente no líquido.

Assim,  $C_{L0} = 0$  e, para  $t = t_{99,9} \rightarrow C_L = 0,999 \times C_S$ , que substituindo na equação anterior, resulta em:

$$t_{99,9} = \frac{\ln 1000}{k_L a}$$

Então, para um  $k_L a$  de  $20 \text{ h}^{-1}$ ,  $t_{99,9}$  é cerca de 20 minutos.

**APÊNDICE D:**

Cálculo de soluções tampões e exemplo para planejamento experimental.

Os ácidos polipróticos, como é o caso do ácido cítrico ( $C_6H_8O_7$ ) e do ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ), se ionizam em etapas sucessivas. Os cálculos do tampão para os ácidos dipróticos e tripróticos são feitos exatamente como para os ácidos monopróticos fracos (SEGEL, 1979). A única consideração nova seria qual o valor de  $K_a$  ou  $pK_a$  a usar. Sabendo-se a razão exata de um ou de outro par de base conjugada-ácido conjugado, pode-se calcular o pH. No caso deste trabalho, o pH do meio de cultura já está definido e, alternativamente, podem-se calcular as razões entre o ácido e a base conjugada.

**a) Tampão fosfato de potássio (TF<sub>1</sub>) 0,20 M e pH 5,8:**

[B]  $\Rightarrow$  Base conjugada:  $HPO_4^{2-}$

[A]  $\Rightarrow$  Ácido conjugado:  $H_2PO_4^-$

$H_3PO_4$ :  $pK_a = 2,12; 7,21; 12,67$

Como o  $K_2HPO_4$  (PM=174,2) e o  $KH_2PO_4$  (PM=136,1) já fazem parte da composição do meio de cultura, pode-se obter o pH desejado misturando-se as proporções adequadas:

$pH = pK_a + \log[B]/[A]$  (Equação de Henderson-Hasselbalch)

$5,8 = 7,21 + \log[B]/[A]$

$-1,41 = \log[B]/[A]$

$[B]/[A] = \text{antilog } -1,41$

$[B]/[A] = 0,039/1$

Assim:

$0,039/1,039 \cdot 0,20 \text{ M} = 0,0075$  moles de [B]  $\Rightarrow m = n \cdot PM = 0,0075 \cdot 174,2 = 1,31 \text{ g}$

$1/1,039 \cdot 0,20 \text{ M} = 0,1925$  moles de [A]  $\Rightarrow m = 0,1925 \cdot 136,1 = 26,20 \text{ g}$

**Verificação:** o pH é menor que o  $pK_a \Rightarrow$  a solução deve conter mais ácido conjugado do que a base.

Dissolvendo-se 1,31 g de  $K_2HPO_4$  e 26,20 g de  $KH_2PO_4$  em 0,5 L de água e misturando-se as duas soluções, o pH deverá atingir 5,8 e o volume final de 1 L.

Outra maneira seria partir de uma solução de  $H_3PO_4$  [posição (a) na Figura A-2] e adicionar KOH suficiente para titular, completamente, 1 hidrogênio [até a posição (c) na Figura A-2] e uma fração do segundo hidrogênio (até o ponto de pH 5,8 na Figura A-2), como segue:

1. Preparar 1L de solução de ácido fosfórico 0,20 M:  $m = PM \cdot M \cdot V = 19,60 \text{ g}$
2. Adicionar 0,20 moles de KOH (PM=56,1)  $\Rightarrow 11,22 \text{ g}$  de KOH
3. Adicionar mais 0,039/1,039.0,20 moles de KOH  $\Rightarrow 0,42 \text{ g}$  de KOH
4. Verificar o pH.

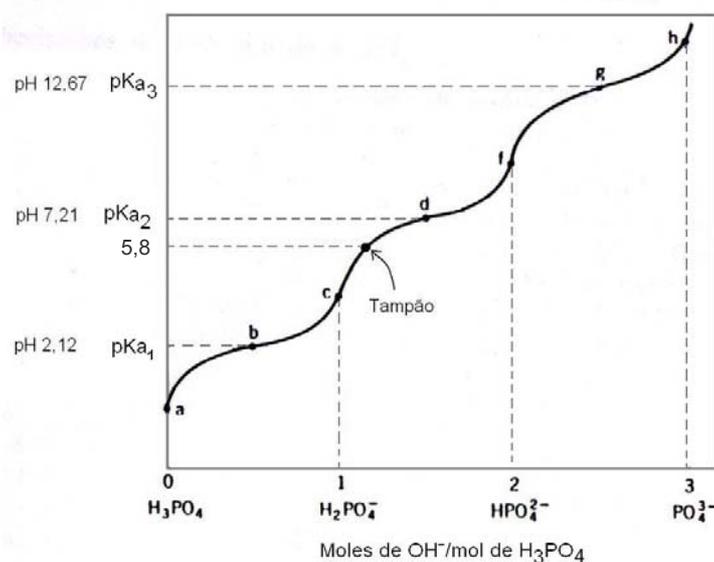


Figura A-2. Curva de titulação de  $\text{H}_3\text{PO}_4$ .

Pode-se prever com antecedência que o tampão fosfato não exercerá um tamponamento adequado para o pH desejado, visto que está afastado dos pontos de equilíbrio que fornecem o melhor efeito tampão (pontos (b), (d) e (e) na Figura A-2). O intervalo aproximado coberto por um tampão é  $\text{pH} = \text{pK}_a \pm 1$  (JEFFERY *et al.*, 1992). Entretanto, como os fosfatos são fundamentais no meio de cultivo, se forem adicionados de forma mais equilibrada, seu benefício poderá ser maior.

Como os meios de cultivo (MNM e PGKM) contém cerca de  $1,0 \text{ g.L}^{-1}$  de fosfatos, pode-se utilizar ( $V = m / \text{PM}_p \cdot M$ ) até  $35 \text{ mL.L}^{-1}$  da solução TF 0,20 M. Para o meio PGKM, uma faixa de volume a ser testada poderia ser entre 20 e  $40 \text{ mL.L}^{-1}$ .

Obs.:  $\text{PM}_p \approx 138 \rightarrow$  peso molecular ponderado do tampão fosfato de K

#### b) Tampão fosfato de sódio ( $\text{TF}_2$ ) 0,20 M e pH 5,8:

[B]  $\Rightarrow$  Fosfato de sódio bi básico:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – PM: 268,07

[A]  $\Rightarrow$  Fosfato de sódio mono básico:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  – PM: 119,98

$\text{H}_3\text{PO}_4$ :  $\text{pK}_a = 2,12; 7,21; 12,67$

De modo semelhante ao realizado no item (a), tem-se:

[B]  $\Rightarrow m = n \cdot \text{PM} = 0,0075 \cdot 268,07 = 2,01 \text{ g}$

[A]  $\Rightarrow m = n \cdot \text{PM} = 0,1925 \cdot 119,98 = 23,10 \text{ g}$

Dissolvendo-se 2,01 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e 23,10 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  em 0,5 L de água e misturando-se as duas soluções, o pH deverá atingir 5,8 e o volume final de 1 L.

#### c) Tampão citrato (TC) 0,10 M e pH 5,8:

[B]  $\Rightarrow$  Base conjugada: citrato de sódio ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$  PM=294,10)

[A]  $\Rightarrow$  Ácido conjugado: ácido cítrico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$  PM = 192,13;  $\text{pK}_a = 3,13; 4,76; 6,40$ ):

Calculando-se as proporções:

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log[\text{B}]/[\text{A}]$$

$$5,8 = 6,4 + \log[\text{B}]/[\text{A}]$$

$$-0,60 = \log[\text{B}]/[\text{A}]$$

$$[\text{B}]/[\text{A}] = \text{antilog } -0,60$$

$$[\text{B}]/[\text{A}] = 0,25/1$$

Assim:

$$[\text{B}] = 0,25/1,25 \cdot 0,10 = 0,02 \text{ M} \Rightarrow m = 0,02 \cdot 294,10 = 5,88 \text{ g de citrato de sódio}$$

$$[\text{A}] = 1/1,25 \cdot 0,10 = 0,08 \text{ M} \Rightarrow m = n \cdot \text{PM} = 0,08 \cdot 192,13 = 15,37 \text{ g de ácido cítrico}$$

Dissolvendo-se 5,88 g de  $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$  e 15,37 g de  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$  e em 0,5 L de água e misturando-se as duas soluções, o pH deverá atingir 5,8 e o volume final de 1 L.

- Estimativa do volume do tampão TC:

Em cultivo de fungos ectomicorrízicos, o pH pode atingir valores abaixo de 2,5, onde passa a ocorrer um tamponamento no  $\text{pK}_a$  2,12 do ácido fosfórico. Num ensaio prático, utilizando-se uma solução de ácido oxálico ( $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$ ,  $\text{PM}=126$ , carga iônica=2) 0,1 M, foi consumido cerca de 6 mL (0,076 g do sal) para se atingir um pH de 2,4 em 100 mL de meio de cultura MNM.

Através do cálculo dos equivalentes mássicos, pode-se estimar a massa da base da solução tampão, necessária para impedir a queda do pH:

- Para o ácido oxálico:  $e = m/E = 0,076/63 = 0,0012$
- Pela regra de Pauling para oxiácidos ( $\text{H}_n\text{XO}_m \Rightarrow m-n$ ), o citrato de sódio tem valência 2:

$$E = 294,1/2 = 147,0$$

$$m = E \cdot e = 147,05 \cdot 0,0012 = 0,176 \text{ g de citrato de sódio para 100 mL de meio (1,76 g.L}^{-1}\text{)}$$

Pela equivalência, teoricamente seriam necessários aproximadamente ( $V = m/\text{PM} \cdot M = 1,76/224 \cdot 0,10$ ) 80 mL.L<sup>-1</sup> do tampão TC.

Obs.:  $\text{PM}_p \approx 224 \rightarrow$  peso molecular ponderado do tampão citrato de sódio

As perdas de umidade na esterilização são da ordem de 8%. Se o tampão TF<sub>1</sub> for utilizado entre 2 e 4% do volume de meio, o tampão TC pode ser adicionado conjuntamente em até 6 e 4% do volume sem diluir o meio de cultura (total de 80 mL.L<sup>-1</sup>). Assim, uma faixa interessante a se testar o tampão TC 0,10 M seria de 40 a 60 mL.L<sup>-1</sup> de meio cultura.

Para quantidades maiores de tampão deve-se fazer compensação do volume de meio de cultura, ou aumentar a concentração do tampão.

#### d) Tampão acetato de sódio (TA) 0,20 M e pH 5,4:

$$[\text{B}] \Rightarrow \text{acetato de sódio: NaCH}_3\text{COO} \cdot 3\text{H}_2\text{O} - \text{PM: } 136,08$$

$$[\text{A}] \Rightarrow \text{ácido acético: CH}_3\text{COOH} - \text{PM: } 60,05, d=1,05; \text{pK}_a = 4,76$$

O pH adotado inferior a 5,8 é devido ao baixo valor do  $\text{pK}_a$  do ácido acético.

De modo semelhante ao realizado anteriormente, tem-se:

$$[B] \Rightarrow m=n.PM=0,16.136,08=21,76 \text{ g}$$

$$[A] \Rightarrow m=n.PM=0,04.60,05=2,40 \text{ g} \quad (d=1,05 \rightarrow V=2,3 \text{ mL})$$

Dissolvendo-se 2,40 g de  $\text{CH}_3\text{COOH}$  e 21,76 g de  $\text{NaCH}_3\text{COO} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  em 0,5 L de água e misturando-se as duas soluções, o pH deverá atingir 5,4 e o volume final de 1 L.

- Estimativa do volume do tampão TA:

Da mesma forma estimada para o tampão TC, através do cálculo dos equivalentes mássicos, pode-se estimar a massa de acetato de sódio:

- O acetato de sódio tem valência 1:  $\text{CH}_3\text{COO}^- \text{Na}^+$

$$E=136,08/1=136,08$$

$$m=E.e=0,0012.136,08=0,163 \text{ g de citrato de sódio para } 100 \text{ mL de meio } (1,63 \text{ g.L}^{-1})$$

Pela equivalência, teoricamente seriam necessários aproximadamente ( $V=m/PM.M=1,63/129.0,20$ ) 60 mL.L<sup>-1</sup> do tampão TA.

Obs.:  $PM_p \approx 129 \rightarrow$  peso molecular ponderado do tampão acetato de sódio

Antes de um estudo com planejamento fatorial, as concentrações calculadas para os tampões devem ser testadas em cultivo. Para isso, os seguintes passos são sugeridos:

1. Corrigir o pH do meio de cultura com solução de HCl/NaOH até o pH de 5,8 (ou 5,4 para o caso do tampão acetato);
2. Adicionar o volume desejado do tampão, esterilizar o meio de cultura verificar se o pH se mantém estável;
3. Realizar um ensaio de cultivo simples para verificar se a concentração estimada do tampão não provoca inibição do crescimento fúngico.
4. Definir dois tampões que sejam mais adequados.

Nem sempre é possível um tampão suficientemente concentrado, pois as enzimas, tecidos ou células podem ser sensíveis a forças iônicas elevadas.

#### - Exemplo para planejamento experimental

Um estudo com planejamento experimental para definir as concentrações ideais dos tampões, TF<sub>1</sub> e TC, por exemplo, pode ser realizado em frascos estáticos conforme as condições do item 4.3 e como descrito no item 4.8.6. O Quadro A-2 apresenta um planejamento estrela (BARROS NETO *et al.*, 1996) com dois fatores ( $k=2$  variáveis independentes), contendo quatro ensaios ( $2^k=2^2=4$ ) nos níveis codificados através das equações A-1 e A-2 em -1 (nível mínimo) e +1 (nível máximo), um ensaio no ponto central e quatro ensaios distribuídos rotacionalmente a uma distância  $\alpha=(2^k)^{1/4}=1,414$  do ponto central. Os níveis para as variáveis foram estabelecidos conforme apresentado anteriormente. Como resposta (variável dependente), é avaliada a produção de biomassa (PB).

$$X_1 = \frac{(TF_1 - 30)}{10} \quad (A-1)$$

$$X_2 = \frac{(TC - 50)}{10} \quad (A-2)$$

Ensaio	TF <sub>1</sub> (mL.L <sup>-1</sup> )	TC (mL.L <sup>-1</sup> )	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>
1	20	40	-1	-1
2	40	40	+1	-1
3	20	60	-1	+1
4	40	60	+1	+1
5	15,9	50	-1,41	0
6	44,1	50	+1,41	0
7	30	35,9	0	-1,41
8	30	64,1	0	+1,41
9	30	50	0	0

Quadro A-2 Matriz do planejamento com os níveis reais das variáveis e os níveis codificados.  
(TF<sub>1</sub>=tampão fosfato de K, TC=tampão citrato de Na, X<sub>1</sub> e X<sub>2</sub>=variáveis codificadas).

Os dados do planejamento podem ser analisados através da Análise de Projeto Fatorial com fatores em dois níveis (BOX *et al.*, 1978), utilizando o programa Statistica<sup>®</sup> (StatSoft<sup>™</sup>), determinando-se o efeito das variáveis independentes na produção de biomassa através da manutenção mais estável do pH. A significância estatística pode ser avaliada através do teste **t** e **nível p**.

## APÊNDICE E:

### Dispersão mecânica de *pellets* durante o cultivo

Uma forma para melhorar a transferência de massa em cultivo de fungos ectomicorrízicos seria a dispersão das hifas através da fragmentação dos *pellets* durante o cultivo. Isso poderia ser realizado utilizando um fragmentador acoplado ao biorreator, que seria utilizado em determinado momento do cultivo. Esse equipamento poderia, também, ser instalado somente no momento de sua utilização, através de portas com selos de vapor, permitindo que um fragmentador possa ser utilizado para diversos biorreatores. Existem modelos desses equipamentos disponíveis no mercado, como o da Figura A-3 desenvolvido pela IKA® Works Inc. Apesar de compactos, esses equipamentos possuem uma elevada capacidade de processamento (Quadro A-3). Além de melhorar a transferência de massa, essa estratégia pode ser uma maneira segura e rápida de iniciar uma nova batelada, através da inoculação direta de outro biorreator, desde que a biomassa esteja adequadamente dispersa. A escolha da posição certa para as portas permitiria efetuar as operações somente com a utilização da gravidade, dispensando a necessidade de bombas (Figura A-4).

#### **DK 50.11 Flow chamber**

For S 50 KV - G 45-IL dispersing elements. Allows operation in inline mode. If used in batch mode: DK 50.11 is mounted around the dispersing element. The DK 50.11 must be at a lower elevation than the surface of the liquid during operation. With this operating mode, no air is drawn in as a result of turbulence in the vessel.



Figura A-3 Modelo de fragmentador disponível no mercado.

Motor rating input	1100	[W]
Motor rating output	700	[W]
Pump rate	24	[l/min]
Speed range	4000 - 10000	[1/min]
Noise without element	72	[dB(A)]
Extension arm diameter	16	[mm]
Chamber volume	94	[ml]
Attainable vacuum	1	[mbar]
Pressure max.	6	[bar]
Process type	inline	
Dimensions (W x H x D)	130 x 500 x 150	[mm]
Permissible ambient temperature	5 - 40	[°C]
Power input	700	[W]

Quadro A-3 Dados técnicos do fragmentador apresentado como exemplo.

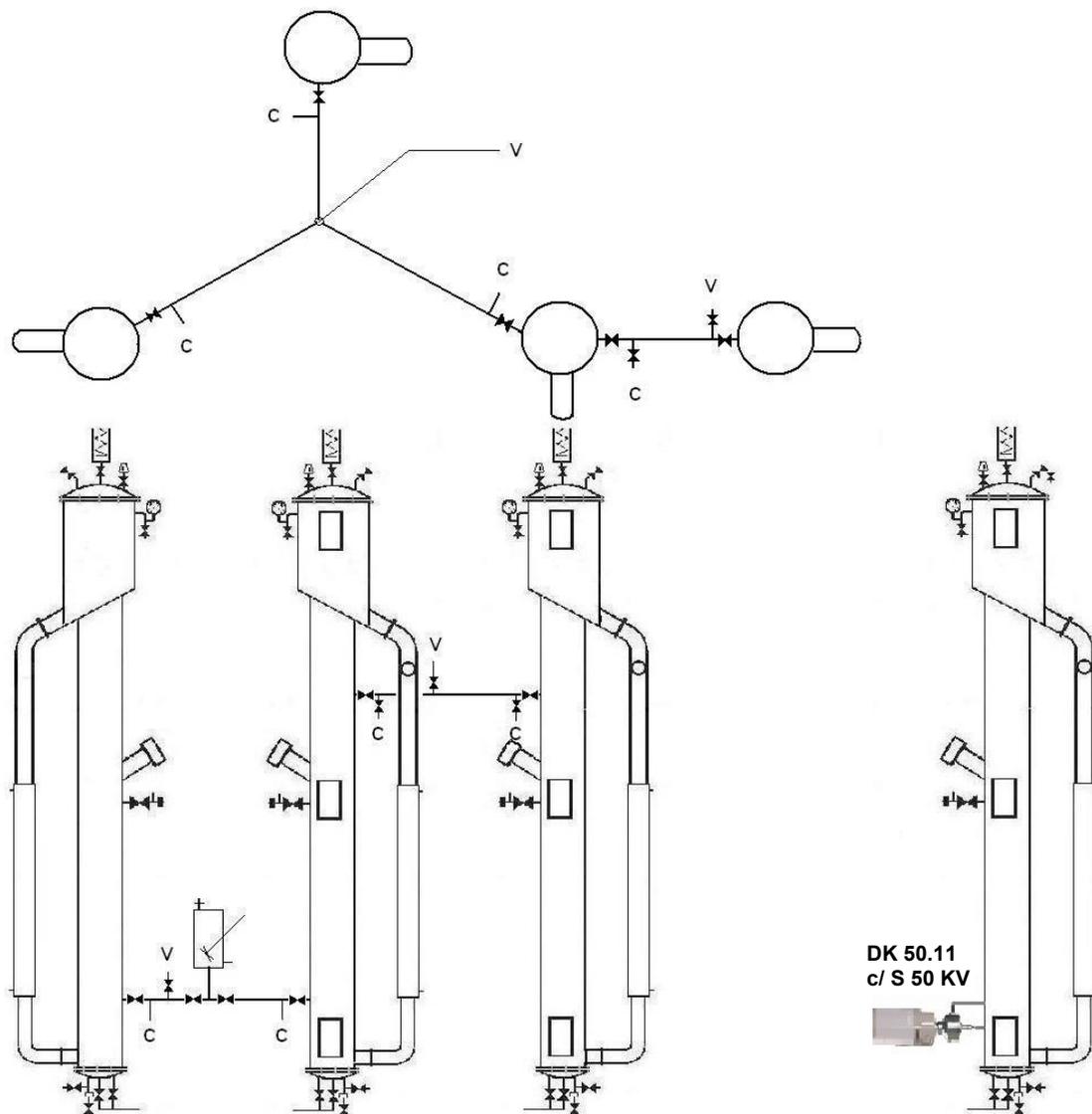


Figura A-4 Exemplo de configuração utilizando quatro biorreatores para produção de inoculantes de fungos ectomicorrízicos. A utilização de um sistema de fragmentação *in-line* é uma estratégia para melhorar a cinética do cultivo, além de permitir um modo seguro e rápido de iniciar novo cultivo através da inoculação direta.

**APÊNDICE F:**

Dados numéricos que geraram as figuras representantes dos cultivos.

Cultivo do isolado UFSC-Sc42 em frascos estáticos (Figura 5.12 a):

Tempo (dia)	Glicose (g.L <sup>-1</sup> )	Biomassa (g.L <sup>-1</sup> )	pH
0	10,82	0,28	5,63
3,2	9,81	1,23	4,46
6,0	7,67	2,38	3,11
7,0	6,61	3,14	3,05
9,3	3,98	4,05	2,96
10,3	1,98	5,08	3,40
12,3	0,25	5,48	3,53

Cultivo do isolado UFSC-Rh90 em frascos estáticos (Figura 5.12 b):

Tempo (dia)	Glicose (g.L <sup>-1</sup> )	Biomassa (g.L <sup>-1</sup> )	pH
0	14,91	0,15	5,31
4	13,92	1,44	5,10
6	12,30	1,72	5,08
8	11,45	2,40	5,01
10	9,19	3,20	4,67
11	7,40	4,44	4,36
12	3,91	5,64	4,08
13	2,82	6,44	4,02
14	0,04	7,64	3,50

Cultivo do isolado UFSC-Rh106 em frascos estáticos (Figura 5.13 a):

Tempo (dia)	Glicose (g.L <sup>-1</sup> )	Biomassa (g.L <sup>-1</sup> )	pH
0	9,72	0,16	5,60
3	9,71	0,31	5,55
5	9,38	0,61	5,54
7	7,88	1,23	5,22
8	6,56	1,65	4,78
10	5,44	2,80	4,67
12	2,20	3,77	4,05
13	0,01	5,59	3,66

Cultivo do isolado UFSC-Pt116 em frascos estáticos (Figura 5.13 b):

Tempo (dia)	Glicose (g.L <sup>-1</sup> )	Biomassa (g.L <sup>-1</sup> )	pH
0	12,25	0,08	5,65
3	11,85	0,28	5,24
5	10,6	0,78	4,62
7	9,00	1,49	4,28
9	5,87	3,31	3,37
10	2,09	4,54	2,63
11	0,01	5,02	2,56

Cultivo do isolado UFSC-Ch163 em frascos estáticos (Figura 5.14 a):

Tempo (dia)	Glicose (g.L <sup>-1</sup> )	Biomassa (g.L <sup>-1</sup> )	pH
0	9,86	0,13	5,77
3	9,45	0,43	5,54
5	9,06	0,70	5,13
7	7,9	1,10	5,18
9	7,21	1,53	4,34
11	5,00	2,16	3,78
13	1,99	3,39	3,12
15	0,88	3,99	2,96

Cultivo do isolado UFSC-Pt188 em frascos estáticos (Figura 5.14 b):

Tempo (dia)	Glicose (g.L <sup>-1</sup> )	Biomassa (g.L <sup>-1</sup> )	pH
0	9,90	0,20	5,75
4	9,65	0,48	6,72
7	9,30	1,03	7,00
9	8,90	1,99	6,02
11	7,48	2,56	5,75
12	6,96	2,73	5,10
13	6,20	3,45	4,80
14	4,88	3,85	4,11
15	3,90	4,12	4,29
16	3,13	4,58	4,03
17	2,90	4,61	3,60

Cultivo do isolado UFSC-Rh90 no biorreator de vidro de 2,3 L (Figura 5.41 a):

Tempo (dia)	Glicose (g.L <sup>-1</sup> )	Biomassa (g.L <sup>-1</sup> )	pH
0	14,07	0,40	5,32
1,8	13,18	0,72	5,15
2,6	11,46	1,36	5,05
3,8	9,46	2,39	4,72
4,1	7,17	3,73	4,57
4,6	5,47	4,47	4,32
5,0	2,57	5,65	4,20
5,6	2,21	6,94	3,94

Cultivo do isolado UFSC-Rh90 no biorreator de inox de 5.0 L a 0,20 vvm (Figura 5.44):

Tempo (dia)	C <sub>P</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	pH	Glicose (g.L <sup>-1</sup> )	Biomassa (g.L <sup>-1</sup> )
0	7,56	5,46	13,60	0,29
1,8	7,38	5,48	12,80	0,53
3,5	6,86	5,66	11,70	0,83
4,5	6,30	5,62	9,60	1,14
5,5	5,60	5,17	9,10	2,04
6,5	5,10	4,52	6,40	2,31
7,6	4,90	4,07	5,50	3,37
8,5	4,20	3,86	3,10	4,01
9,7	3,74	3,53	1,50	5,61
10,5	3,40	3,62	0,40	6,68
11,7	5,71	3,83	0,00	6,71

Cultivo do isolado UFSC-Rh90 no biorreator de inox de 5.0 L a 0,36 vvm (Figura 5.46):

Tempo (dia)	C <sub>P</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	pH	Glicose (g.L <sup>-1</sup> )	Biomassa (g.L <sup>-1</sup> )	Índice de cor
0	7,56	5,80	9,10	0,19	0,150
2,5	7,36	6,02	8,20	0,41	0,191
3,5	7,18	5,42	6,50	0,80	0,251
4,3	6,96	4,51	5,90	1,11	0,416
4,7	6,65	4,42	5,60	1,50	0,551
5,3	6,37	3,87	4,40	2,22	0,650
5,7	6,31	3,77	2,50	2,54	0,585
6,4	6,15	3,61	1,20	3,50	0,469

Cultivo do isolado UFSC-Rh90 no biorreator de inox de 5.0 L a 0,52 vvm (Figura 5.48):

Tempo (dia)	C <sub>P</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	pH	Glicose (g.L <sup>-1</sup> )	Biomassa (g.L <sup>-1</sup> )	Índice de cor
0	7,56	5,87	12,9	0,47	0,361
1,0	7,47	5,92	12,6	0,70	0,397
1,8	6,88	5,96	11,0	0,87	0,474
2,1	6,44	5,68	10,6	1,08	0,523
2,8	5,71	5,21	9,50	2,02	0,666
3,1	5,47	4,83	7,80	2,60	0,707
3,7	5,30	4,26	4,70	3,60	0,605
4,0	5,01	4,01	2,60	4,49	0,551
4,9	4,32	3,46	1,10	6,33	0,471

**ANEXO A:** Sensores para medidas de pH**InPro3030 (low-maintenance pH-electrode)****METTLER TOLEDO**

**Gel-filled low maintenance pH-electrode for biotech applications.**

InPro3030 is a state-of-the-art, gel-filled, low-maintenance biotech pH-electrode with good pressure resistance, specially developed for in-line measurements in biotech applications.

**Specifications**

pH-range	0...14
Temperature range	0...140 °C (32...284 °F)
Diaphragm	ceramic
Number of diaphragms	1
Reference system	Argenthal system
Silver ion trap	yes
Autoclavable	yes
Pressure resistance (bar)	up to 6 bar (87 psi) overpressure

**InPro3300 (non-glass pH-electrode with ISFET technology)****METTLER TOLEDO**

**Non-glass Food and Beverage electrode with integrated RTD.**

The non-glass pH-electrode is an unbreakable breakthrough for the food industry. The electrode is equipped with a solid-state pH-sensitive part (ISFET) and with a high temperature reference system with gel electrolyte, making the electrode practically maintenance-free.

**Description**

The InPro3300 is pressure-resistant up to 6 bar at 130 °C (PED97). The 45° design of the electrode end prevents air bubbles being trapped at the pH-sensitive tip. A VarioPin (VP) connector ensures a safe and hermetic cable connection (IP68).

**Specifications**

pH-range	0...14
Temperature range	0...130 °C (32...266 °F) for sterilization
Diaphragm	ceramic
Number of diaphragms	1
Reference system	inversed Argenthal system
Silver ion trap	no
Autoclavable	yes (eventually sample calibration recommended)
Pressure resistance (bar)	up to 6 bar (87 psi) overpressure

**ANEXO B:** Transmissor para medidas de pH**pH 2100e («Advanced Line» - for wall, pipe or panel mounting)****METTLER TOLEDO****The «Advanced Line» transmitter**

The «Advanced Line» transmitter pH 2100e is suitable for highly reliable and accurate pH/ORP measurements in many industrial applications. It is easy to operate and the large-size LCD display provides substantial information. The measurement value is shown in large characters and additional pictographs explain transmitter function and advise of any signal irregularities.

**Operational safety and reliability**

Continuous sensor and transmitter diagnostic and large LC display with pictographs provide maximum process safety.

**Exact and reliable measurement**

Continuous Sensocheck and Calimatic functions with automated buffer recognition result in highest measurement reliability.

**Process loop autonomy**

The integrated PID controller and the full communication with pH cleaning and calibration systems, guarantee loop autonomy and maintenance-free pH measurement.

**Description**

The pH 2100e transmitter measures pH or redox and temperature simultaneously. The parameters pH/redox and temperature can be transmitted separately over the two analog outputs and the continuous sensor and transmitter diagnostic guarantees reliable operation. Calibration can be carried out with automatic buffer recognition or through manual buffer input.

Entering pre-measured electrode data is also possible. The built-in sensor diagnostic continuously monitors the glass and reference electrode and any failure is displayed by the «Sensoface». The pH 2100e offers an integrated PID controller for process autonomy. An external HOLD contact and full communication with METTLER TOLEDO cleaning and calibration systems allow maintenance-free pH/ORP measurement.

**Specifications**

Power supply	20...253 V AC/DC
Protection	IP65
Current output	2 x 0/4...20 mA
Relays	2 limit contacts, 1 alarm contact, 1 wash contact
pH-range	0...14
mV-range	-1500...+1500
Measured units	pH/mV/°C
Accuracy	greater than 0.02 pH / greater than 1 mV
Sensor inputs	pH or mV
Temperature inputs	Pt100/Pt1000 or NTC
Mounting options	wall, panel or pipe mounting