

MÁRCIO JOSÉ ROSSI

**PRODUÇÃO DE INOCULANTE DE FUNGO ECTOMICORRÍZICO
UTILIZANDO FERMENTAÇÃO NO ESTADO LÍQUIDO EM
BIORREATOR TIPO *AIRLIFT***

FLORIANÓPOLIS

2001

MÁRCIO JOSÉ ROSSI

**PRODUÇÃO DE INOCULANTE DE FUNGO ECTOMICORRÍZICO
UTILIZANDO FERMENTAÇÃO NO ESTADO LÍQUIDO EM
BIORREATOR TIPO *AIRLIFT***

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre. Curso de Pós-
Graduação em Engenharia Química.
Universidade Federal de Santa Catarina.
Orientador: Prof. José Antonio Ribeiro de Souza

FLORIANÓPOLIS

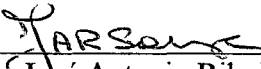
2001

Produção de Inoculante de Fungo Ectomicorrízico Utilizando Fermentação no Estado Líquido em Biorreator tipo Airlift

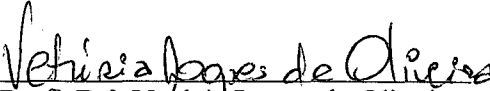
Por

Márcio José Rossi

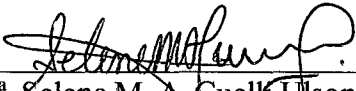
Dissertação julgada para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Química**, área de concentração **Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos** e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.



Prof. Dr. José Antonio Ribeiro de Souza
Orientador




Prof.ª Dr.ª Veturia Lopes de Oliveira
Co-orientadora

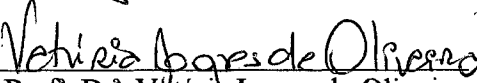


Prof.ª Dr.ª Selene M. A. Guelli Ulson de Souza
Coordenadora do CPGENQ

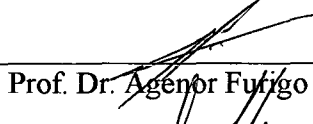
Banca Examinadora:



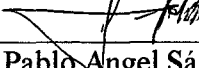
Prof. Dr. José Antonio Ribeiro de Souza



Prof.ª Dr.ª Veturia Lopes de Oliveira



Prof. Dr. Agenor Furligo Junior



Prof. Dr. Pablo Angel Sánchez Podlech

Florianópolis, 13 de Março de 2001

AGRADECIMENTOS

À CAPES pelo apoio financeiro,

Aos professores do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, e Departamento de Microbiologia e Parasitologia pelo conhecimento transmitido,

Aos colegas de curso, Cláudia, Ricardo, Marcos, Alexandra, Audrei, Cristiane, Mires e Gean, pela amizade e companheirismo. Em especial ao amigo Silas, com quem convivi momentos da fase experimental, onde trocamos valiosas informações,

Aos amigos dos Laboratório de micorrizas, Fred, Luiz, Pedro, Charles, Gean, Elza,, pela colaboração na realização deste trabalho,

Aos colegas do Laboratório de Engenharia Bioquímica, João, Roberta, Cíntia, Sérgio, Denise, Fátima, Rafael, Sílvia, Luciana,, pelo carinho e amizade,

Aos funcionários dos departamentos de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, e Microbiologia e Parasitologia,

Aos meus orientadores na Engenharia Química, professores José Antonio e Agenor, pela orientação e apoio,

Ao Prof. Pablo, pelas valiosas contribuições e participação na Comissão Examinadora,

À professora Vetúria, pela amizade, ensinamentos, orientação e revisão da dissertação,

À minha esposa Eloane,

Muito obrigado!

ÍNDICE

RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
NOMENCLATURA	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	6
2.1- A simbiose micorrízica	6
2.2 - O gênero <i>Pisolithus</i>	9
2.3 - Produção de inoculantes ectomicorrízicos	11
2.4 - Meios e condições de cultivo para fungos ectomicorrízicos	13
2.5 - Cultivo em meio líquido	16
2.6 - Biorreatores	20
2.7 - Reatores <i>airlift</i>	21
2.7.1 Vantagens dos biorreatores <i>airlift</i>	22
2.7.2 Aplicações dos biorreatores <i>airlift</i>	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 - Microrganismo utilizado	25
3.2 - Meios de cultivo	26
3.2.1 Definições dos meios de cultura e modificações estudadas	26
3.2.2 Condições de cultivo	27
3.3 - Procedimentos de esterilização e desinfecção	27
3.4 – Inóculos	29
3.4.1 Produção do inóculo para ensaios em frascos em biorreator	29
3.4.2 Inoculante para estudo em casa de vegetação	31
3.5 - Descrição do biorreator empregado para produção do inoculante	32
3.6 - Estudos experimentais	33
3.6.1 Estudos preliminares	33
3.6.2 Efeito da composição do meio de cultura no crescimento de <i>P. microcarpus</i>	35
3.6.3 Simplificação do meio de cultura utilizando Planejamento Fatorial	35

3.6.4	Determinação de parâmetros cinéticos para crescimento de <i>P. microcarpus</i> em cultura estática	39
3.6.5	Ensaio em biorreator e estudos cinéticos da produção de inoculante de <i>P. microcarpus</i>	39
3.6.6	Estudo de viabilidade do inoculante produzido em biorreator em plantas	39
3.6.6.1	Obtenção das plantas	39
3.6.6.2	Substrato de plantio e inoculação	40
3.6.6.3	Condições experimentais e coleta dos dados	41
3.7	- Métodos analíticos	41
3.7.1	Obtenção de amostras de cultura de <i>P. microcarpus</i>	41
3.7.2	Determinação da biomassa em cultura líquida de <i>P. microcarpus</i>	42
3.7.3	Determinação da biomassa viável em suspensão miceliana de <i>P. microcarpus</i>	43
3.7.4	Determinação da concentração de glicose em cultivo de <i>P. microcarpus</i>	44
3.8	- Determinação de parâmetros cinéticos	44
3.8.1	Conversão de substrato em biomassa	44
3.8.2	Velocidade específica de crescimento miceliano	45
3.8.3	Produtividade total	46
3.9	- Análises estatísticas	47
3.9.1	Planejamentos fatoriais	47
4	. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1	- Estudos preliminares	48
4.1.1	Determinação da biomassa viável em suspensão miceliana de <i>P. microcarpus</i> ...	51
4.2	- Estudo sobre o efeito da composição do meio de cultura no crescimento de <i>P. microcarpus</i>	52
4.3	- Simplificação do meio de cultura utilizando planejamento fatorial	58
4.4	- Determinação dos parâmetros cinéticos para crescimento de <i>P. microcarpus</i> em cultura estática em frascos	63
4.5	- Ensaio em biorreator <i>airlift</i> e cinética da produção do inoculante de <i>P. microcarpus</i>	68
4.6	- Estudo da viabilidade do inoculante produzido em biorreator em plantas	74
5	. CONCLUSÕES	76
6	. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
7	. ANEXOS	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Meios de cultura utilizados como base para os estudos de produção de biomassa de <i>P. microcarpus</i>	26
Tabela 3.2: Planejamento fatorial mostrando as variáveis estudadas com seus respectivos níveis codificados, e as respostas obtidas do Experimento 1 em cultivo estático de <i>P. microcarpus</i> em meio base L&A/K, na temperatura de 25 ± 1 °C	36
Tabela 3.3: Planejamento fatorial mostrando as variáveis estudadas com seus respectivos níveis codificados, e as respostas obtidas do Experimento 2 em cultivo estático de <i>P. microcarpus</i> em meio base L&A/K, na temperatura de 25 ± 1 °C	37
Tabela 3.4: Planejamento fatorial mostrando as variáveis estudadas com seus respectivos níveis codificados, e as respostas obtidas do Experimento 3 em cultivo estático de <i>P. microcarpus</i> em meio base L&A/K, na temperatura de 25 ± 1 °C	38
Tabela 4.1: Biomassa de <i>P. microcarpus</i> , glicose residual, pH e conversão ($Y_{x/s}$), ao final de 10 e 25 dias de cultivo em cultura estática, sob condições controladas de temperatura a 25 ± 1 °C, em diversas modificações do meio MNM	52
Tabela 4.2: Biomassa de <i>P. microcarpus</i> , glicose residual, pH e conversão ($Y_{x/s}$), ao final de 12 dias de cultivo em cultura estática, sob condições controladas de temperatura a 25 ± 1 °C, em diversas modificações dos meios MNM e L&A/K	55
Tabela 4.3: Estimativa dos efeitos principais e de interação de segunda ordem, valores dos testes estatísticos e coeficientes de correlação para o Experimento 1, usando uma simplificação do meio L&A/K, em cultivo de <i>P. microcarpus</i> sob condições estáticas e a 25 °C	59
Tabela 4.4: Estimativa dos efeitos principais e de interação de segunda ordem, valores dos testes estatísticos e coeficientes de correlação, para o Experimento 2, usando uma simplificação do meio L&A/K; em cultivo de <i>P. microcarpus</i> sob condições estáticas a 25 °C	61
Tabela 4.5: Estimativa dos efeitos principais e de interação de segunda ordem, valores dos testes estatísticos e coeficientes de correlação, para o Experimento 3, usando uma simplificação do meio L&A/K; em cultivo de <i>P. microcarpus</i> sob condições estáticas e a 25 °C	62
Tabela 4.6: Resultados de cultivo de diferentes microrganismos em diferentes processos, comparados com os resultados deste estudo.....	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Produção de madeira de eucalipto, proveniente de mudas inoculadas com fungos ectomicorrízicos	2
Figura 2.1. Detalhes de ectomicorrizas no sistema radicular de <i>E. dunnii</i> (a) e <i>P. taeda</i> (b). Em (c) apresenta-se um corte transversal da raiz de <i>P. taeda</i> mostrando a rede de Hartig e o manto	6
Figura 2.2. Aspecto de plantas de <i>Pinus</i> sp. cultivadas em solo pobre (a) mudas inoculadas com fECM e (b) mudas não inoculadas. Notar as diferenças no sistema radicular	8
Figura 2.3. Corpos de frutificação, hifas e esporos de <i>Pisolithus</i> sp. e esporos	10
Figura 2.4. Pellets de micélio do fungo ectomicorrízico <i>Laccaria laccata</i> encapsulado em gel de alginato de cálcio. Em destaque, <i>pellets</i> ampliados, podendo-se perceber o micélio nas regiões mais escuras.....	12
Figura 2.5. Caminho percorrido pelas moléculas de oxigênio, através das diversas resistências, em processos fermentativos aeróbios	19
Figura 2.6. Esquema de biorreatores <i>airlift</i> com circulação interna (a) e externa (b)....	21
Figura 3.1. Biorreator <i>airlift</i> dentro de autoclave para esterilização	28
Figura 3.2. Vista geral das estufas de crescimento (B.O.D.) e da capela de fluxo laminar	28
Figura 3.3. Técnica de preparação de inóculo para cultivo de <i>P. microcarpus</i> em frascos e em biorreator	30
Figura 3.4. Tapetes micelianos de <i>P. microcarpus</i> obtidos em cultura estática e utilizados para produzir o inóculo para fermentação em biorreator.....	31
Figura 3.5. Metodologia utilizada para preparação de inoculante de <i>P. microcarpus</i> para estudos em plantas sob condições de casa de vegetação	32
Figura 3.6. Fotografia do biorreator <i>airlift</i> com circulação externa (a), e esquema do biorreator com as medidas de projeto (b)	33
Figura 3.7. Metodologia de aplicação do inoculante ectomicorrízico em plantas de <i>E. dunnii</i>	40
Figura 3.8. Plantas de <i>Eucalyptus dunnii</i> inoculadas com <i>P. microcarpus</i> com 22 dias de idade, sob condições de casa de vegetação	41

Figura 4.1. Consumo de glicose, produção de biomassa e variação do pH, em cultura de <i>P. microcarpus</i> sob condições de agitação (70 rpm) em meio MNM, sem controle da temperatura	49
Figura 4.2. Produção de pigmentos e curva de condutividade elétrica (em mili Siemens), cultura de <i>P. microcarpus</i> sob condições de agitação (70 rpm) em meio MNM, sem controle da temperatura	49
Figura 4.3. Correlação entre a biomassa e os pigmentos liberados no meio (a), e entre biomassa e condutividade elétrica (b), em cultura de <i>P. microcarpus</i> sob condições de agitação (70 rpm), sem controle da temp	50
Figura 4.4. Aspecto do micélio fragmentado de <i>P. microcarpus</i> , utilizado na forma de suspensão miceliana para inocular o <i>airlift</i> (a); Fragmentos viáveis (d)	51
Figura 4.5. Biomassa (g.L^{-1}), glicose residual (g.L^{-1}) e pH ao final de 10 dias de cultivo de <i>P. microcarpus</i> , sob condições estáticas a 25 °C, para as diversas modificações de meio de cultura	53
Figura 4.6. Biomassa (g.L^{-1}), glicose residual (g.L^{-1}) e pH ao final de 25 dias de cultivo de <i>P. microcarpus</i> , sob condições estáticas a 25 °C, para as diversas modificações de meio de cultura	53
Figura 4.7. Extratos de ensaios de cultivo em frascos estáticos para estudo de meios..	55
Figura 4.8. Biomassa produzida (g.L^{-1}), glicose residual (g.L^{-1}) e pH ao final de 12 dias de cultivo de <i>P. microcarpus</i> , sob condições estáticas e a 25 °C, para as diversas modificações de meio de cultura	56
Figura 4.9: Respostas dos experimentos realizados com planejamento fatorial	58
Figura 4.10. Carta de Pareto para os efeitos das variáveis na conversão de substrato em biomassa, de <i>P. microcarpus</i> – Experimento 1	60
Figura 4.11. Superfície de resposta mostrando a influência das variáveis na conversão de substrato em biomassa de <i>P. microcarpus</i> –Experimento 1...	60
Figura 4.12. Carta de Pareto para os efeitos das variáveis na conversão de substrato em biomassa de <i>P. microcarpus</i> – Experimento 2	61
Figura 4.13. Superfície de resposta mostrando a influência das variáveis na conversão de substrato em biomassa de <i>P. microcarpus</i> –Experimento 2	61
Figura 4.14. Carta de Pareto para os efeitos das variáveis na conversão de substrato em biomassa de <i>P. microcarpus</i> – Experimento 3	63
Figura 4.15. Superfície de resposta mostrando a influência das variáveis na conversão de substrato em biomassa de <i>P. microcarpus</i> –Experimento 3	63
Figura 4.16. Consumo de glicose, produção de biomassa e variação do pH em cultivo de <i>P. microcarpus</i> em cultura estática com meio L&A/K líquido, sob condições controladas de temperatura a 25 °C	64
Figura 4.17. Variação do pH e pigmentação do meio em cultura estática de <i>P. microcarpus</i> em meio L&A/K líquido, sob condições controladas de temperatura a 25 °C	64

- Figura 4.18. Velocidade específica de crescimento (a) e conversão de substrato em biomassa (b) para cultura estática de *P. microcarpus* em meio L&A/K líquido, sob condições controladas de temperatura a 25 °C..... 65
- Figura 4.19. Evolução da biomassa de *P. microcarpus* em cultura estática em meio L&A/K líquido 68
- Figura 4.20. Produção de biomassa, consumo de glicose e variação do pH em cultivo de *P. microcarpus* (UFSC-Pt 116), em biorreator *airlift* (2,3 L) em meio L&A/K tamponado com A/C sob condições controladas de temperatura a 25,5 °C 69
- Figura 4.21. Velocidade específica de crescimento para cultivo de *P. microcarpus* em biorreator *airlift* (2,3 L), vazão de ar de $0,8 \text{ NL}\cdot\text{min}^{-1} \pm 0,2$, em meio L&A/K, sob condições controladas de temperatura (25,5 °C), tamponado com A/C (pH 5,4)..... 69
- Figura 4.22. *Pellets* de biomassa de *P. microcarpus* cultivado em *airlift* a 25,5 °C, em meio L&A/K. (a) vista geral dos *pellets* em biorreator; (b) vista dos *pellets* ao microscópio revelando três camadas distintas de compactação das hifas, e (c) aspecto das hifas na superfície dos *pellets*, em destaque a presença de fíbulas características do micélio dos basidiomicetos 70
- Figura 4.23. Produção de biomassa, consumo de glicose e variação do pH em cultivo de *P. microcarpus* (UFSC-Pt 116), em biorreator *airlift* (2,3 L) com vazão de ar de $0,8 \text{ NL}\cdot\text{min}^{-1} \pm 0,2$, em meio L&A/K (pH_i 5,8), sob condições controladas de temperatura (25,5 °C) 72
- Figura 4.24. Velocidade específica de crescimento para cultivo de *P. microcarpus* em biorreator *airlift* (2,3 L), em meio base L&A/K, pH inicial 5,8, em condições controladas de temperatura (25,5 °C)..... 73
- Figura 4.25. Aspecto dos *pellets* de micélio em gel de alginato de cálcio 75
- Figura 4.26. (a) Plantas inoculadas com 1 ml (F1) e 3 ml (F3) de suspensão miceliana de *P. microcarpus*. (b) Plantas inoculadas com 1 (B1) e 5 (B5) *pellets* de micélio de *P. microcarpus* em gel de alginato de sódio. (T) são as plantas testemunhas 75
- Figura 4.27. Raízes (R) das plantas inoculadas com *P. microcarpus* apresentando intensa acumulação de hifas (h) na superfície. (a) Raízes inoculadas com suspensão micelinana e (b) raízes inoculadas com *pellets* 75

NOMENCLATURA

NL	Normal Litros (nas CNTP)
K	número de fatores
X_f	concentração final de biomassa (g.L^{-1})
X	concentração de biomassa (g.L^{-1})
S_0	concentração inicial de glicose (g.L^{-1})
S	concentração de glicose durante cultivo (g.L^{-1})
$Y_{X/S}$	conversão de substrato (glicose) em células (g.g^{-1})
r_s	velocidade de consumo de substrato ($\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$)
μ_s	velocidade específica consumo de substrato (dia^{-1})
μ_x	velocidade específica de crescimento de células (dia^{-1})
t_{dup}	tempo de duplicação da biomassa na fase exponencial (dia)
X_{0i}	concentração celular no início da fase exponencial (g.L^{-1})
P_{total}	Produtividade total de células ($\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$)
t	tempo (dia)
$Z_{X/S}$	grau de conversão de glicose em biomassa (X_f/S_0) (g.g^{-1})

RESUMO

O Brasil possui um importante programa de reflorestamento, utilizando principalmente *Eucalyptus* e *Pinus*. Para atender à crescente demanda de madeira, será necessário aumentar a produtividade dessas espécies, pois o aumento das áreas plantadas é inviável por diversas restrições. As principais plantas utilizadas em reflorestamento, dependem da simbiose micorrízica para seu estabelecimento e crescimento, principalmente em solos pobres. A exploração dessas simbioses para aumentar a produtividade das plantas, depende da produção de inoculantes em larga escala. Neste contexto, este trabalho dá início a uma nova geração de bioprocessos como uma tecnologia alternativa para a produção de inoculantes de fungos ectomicorrízicos (fECM). Foi estudada a produção de inoculante do fECM *Pisolithus microcarpus* (isolado UFSC-Pt 116), em biorreator tipo *airlift* com circulação externa. Inicialmente, estudou-se o efeito da composição do meio de cultura sobre a produção de biomassa fúngica, utilizando-se como base os meios Melin-Norkrans Modificado (MNM) e meio Litchfield e Arthur (L&A). Uma das variações do meio L&A, que promoveu maior produtividade, foi estudada por meio de planejamento fatorial, tendo-se como variáveis os componentes: peptona, extrato de levedura e glicose (g.L^{-1}). A concentração de glicose pôde ser aumentada em até 40%, permitindo um melhor rendimento do biorreator. A peptona (de carne ou soja) apresentou fatores de crescimento importantes, enquanto que o extrato de levedura apresentou fatores deletérios. Este último resultado é contraditório em relação a resultados de outros autores. Em fermentação batelada no biorreator *airlift*, o fungo cresceu principalmente na forma de *pellets* densos e esféricos, havendo grande produção de pigmentos. Os *pellets* de micélio (fragmentados ou não), após completa exaustão da glicose, apresentaram-se viáveis. Os valores de velocidade específica máxima de crescimento foram $0,391 \text{ dia}^{-1}$, para o cultivo em frascos, e $0,574 \text{ dia}^{-1}$, para o cultivo no *airlift*. Os valores de conversão foram $0,42 \text{ g.g}^{-1}$, e de produtividade de $0,49 \text{ g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$, para os dois processos. A viabilidade do inoculante foi testada em plantas de *Eucalyptus dunnii* em casa de vegetação na forma de suspensão miceliana em água e encapsulado em gel de alginato de sódio. Após três meses, o inoculante mostrou-se viável observando-se intensa acumulação de hifas na superfície das raízes inoculadas, indicativo da formação do manto fúngico. O biorreator *airlift* forneceu velocidade específica de formação de biomassa superior a outros processos citados na literatura, com relação ao gênero *Pisolithus*, mostrando-se promissor para produção de biomassa de fECM. São necessários, no entanto, estudos visando controlar a fisiologia de crescimento do fungo e a adequação do processo ao cultivo de outros isolados/espécies de fECM. Também são necessário estudos para verificar a eficiência desses inoculantes na promoção do crescimento das plantas.

ABSTRACT

Brazilian reforestation programme is one of the most important in the world. *Eucalyptus* and *Pinus* spp. are the main species in this programme. Although a great area has been planted with these species, it is necessary to augment their productivity to satisfy the world demand for wood and cellulose. Increasing the reforested area is not currently possible due to many political, financial and ecological restrictions. These species depend on the mycorrhizal symbioses in order to establish and grow in many soils. The inoculation of these plants with mycorrhizal fungi depend on the selection of efficient isolates and the development of inoculum production methods. In this context, the inoculum production of the ectomycorrhizal fungus (fECM) *Pisolithus microcarpus* (isolate UFSC-Pt 116) was studied in an external loop airlift bioreactor. Until the moment there are no results available in the literature concerning the application of this type of bioreactor to fECM. Two culture media, Modified Melin-Norkrans (MNM) and Litchfield and Arthur (L&A), were selected as the basal media to all studies performed. The first assay aimed to study the effect of the media composition on fungal growth (biomass) in culture flasks. One of the variations of the L&A medium promoted a higher productivity and was then selected to be studied through experimental design in terms of peptone, yeast extract and glucose concentrations. The increase of glucose up to 40% promoted a high biomass yield. Peptone, regardless its origin - soya or meat - stimulated fungal growth, while yeast extract presented an inhibitory effect. This last observation is in contradiction with the results of others authors. In the airlift bioreactor, the fungus grew as spherical and dense pellets of mycelium and the medium was intensively pigmented. At the end of the assay, pellets were viable and grew in agar medium. Fungal maximum growth rate was 0.391 d^{-1} , when cultivated in flasks, and 0.574 d^{-1} , in the bioreactor. Conversion rate values were 0.42 g.g^{-1} and productivity $0.49 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, for both processes. Inoculum produced in bioreactor was prepared in two ways, as a mycelium suspension alone or encapsulated in sodium alginate beads, and inoculated in *Eucalyptus dunnii* plants in greenhouse conditions. After three months, roots presented an intensive hyphal net in their surface, this being indicative of mycorrhizal colonization. Fermentation in the airlift bioreactor promoted better results in terms of biomass production for *P. microcarpus* when compared to other fermentation processes applied to *Pisolithus* spp. available in the literature. This method represents a promising technology to inoculum production of fECM. However, the method has to be optimized and adapted to the cultivation of other isolates and/or species. It is also necessary to study the efficiency of the inoculum in promoting plant growth.

1. INTRODUÇÃO

A demanda mundial de madeira oriunda de florestas plantadas é cada vez maior. Apesar da busca constante de substitutos, principalmente plásticos e metálicos, a madeira terá sempre seu lugar garantido, em decorrência de suas características físicas, flexibilidade e a possibilidade de seu múltiplo uso *in natura*, processada ou transformada. Para a produção de madeira em regiões tropicais, o eucalipto tem-se apresentado como uma excelente opção, em virtude de sua diversidade, adaptabilidade, potencial de produção e características físico-mecânicas, sendo utilizado na obtenção de celulose e papel, madeira processada, postes, energia, indústria química e farmacêutica, entre outros.

O Brasil possui um dos mais importantes programas de reflorestamento do mundo, com mais de 6 milhões de hectares plantados, sendo o primeiro produtor de celulose da América do Sul, onde participa com 70% da produção, gerando benefícios econômicos e sociais. Espécies dos gêneros *Eucalyptus* (aproximadamente 65% da área reflorestada) e *Pinus* são as mais importantes nesse programa.

Para atender a demanda crescente, o Brasil deverá aumentar a produção dessas espécies, principalmente pelo aumento da produtividade das plantações, uma vez que o aumento da área plantada é inviável devido a limitações de ordem financeira, política e ambiental. Outro agravante é o fato de as plantações ocuparem geralmente solos pobres e degradados, que necessitam de insumos de alto custo, como os adubos. Neste contexto, surge a necessidade de desenvolver novas tecnologias para promover o aumento da produtividade.

As espécies de *Eucalyptus* e *Pinus* encontram-se entre aquelas que dependem da simbiose micorrízica, particularmente de um tipo classificado como ectomicorrízica, para sua sobrevivência e/ou crescimento. No caso da *Eucalyptus* spp., as ectomicorrizas têm, comprovadamente, proporcionado ganhos em sobrevivência e produtividade.

Micorrizas são estruturas resultantes da simbiose entre raízes de plantas e certos fungos do solo. Nessa interação, o fungo proporciona à planta uma maior capacidade de

utilização de água e nutrientes, além de muitos outros benefícios. A planta, por outro lado, fornece ao fungo carboidratos necessários para seu crescimento.

Entre as novas 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 crescimento, principalmente em solos pobres. A predominância dos efeitos positivos na maioria dos estudos confirma o enorme potencial dessa prática como ferramenta biotecnológica para os sistemas de produção de mudas no setor florestal, proporcionando vantagens para produtores e indústrias do setor (Figura 1.1).



Figura 1.1. Produção de madeira de eucalipto, proveniente de mudas inoculadas com fungos ectomicorrízicos (Bunnings Treefarms - Austrália).

Além da seleção dos fungos mais eficientes, o estabelecimento de programas de controle de micorrização, exige o desenvolvimento de métodos de produção de inoculantes em larga escala. Esta etapa tem sido uma das principais limitações ao uso rotineiro de fungos ectomicorrízicos nos programas de reflorestamento.

Vários tipos de inoculantes ectomicorrízicos têm sido propostos; destacando-se os inoculantes "naturais", representados pelo solo de plantações ou pelos esporos, e os inoculantes micelianos ou vegetativos produzidos em cultura pura. Os inoculantes à base de solo e de esporos têm uso limitado por não permitirem avaliar previamente sua

compatibilidade nem sua eficiência em relação à planta hospedeira. Os inoculantes micelianos ou vegetativos, entretanto, são aplicáveis à produção de inóculo de qualquer fungo que possa ser cultivado em cultura pura, permitindo a utilização de fungos previamente testados quanto à sua compatibilidade e eficiência.

A produção de inoculantes vegetativos é geralmente feita por meio de fermentação em meio sólido utilizando uma mistura turfa-vermiculita, ou apenas vermiculita, embebida de meio de cultura. Um método mais sofisticado de produção consiste no cultivo dos fungos em cultura líquida em biorreator, seguida de encapsulamento em gel de alginato de cálcio. Estudos em viveiros demonstraram que este tipo foi 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, menores volumes, e viabilidade mais prolongada que o inoculante em substrato sólido, reduzindo-se a quantidade a ser empregada.

Apesar de vários anos de estudos, ainda não foram estabelecidas técnicas rotineiras de cultivo em meio líquido para fungos ectomicorrízicos, justificado pela dificuldade dos fungos crescerem em cultura líquida. Esta dificuldade parece residir na falta de conhecimento com relação aos fenômenos de transporte envolvidos neste tipo de cultivo. Com o conhecimento desses requisitos, e a utilização de técnicas adequadas de fermentação submersa em biorreator, poderão ser produzidos inoculantes de alta qualidade, e em quantidade adequada para atender às necessidades dos programas de micorrização controlada.

Os fungos, como outros microrganismos aplicados industrialmente, requerem oxigênio molecular para a respiração, dependendo da transferência de massa do oxigênio da fase gasosa para a fase líquida. Como resultado, processos multifásicos gás-sólido-líquido são comuns na indústria bioquímica, e um biorreator forma, invariavelmente, o núcleo de tais processos. Um biorreator precisa ter boa capacidade de mistura para se atingir uma distribuição homogênea do oxigênio transmitido, bem como de outros nutrientes, para o seio do fluido. A hidrodinâmica do reator também afeta seu desempenho em parâmetros tais como a transferência de massa, calor e quantidade de movimento. A natureza dos fluidos afeta o transporte de oxigênio e o fenômeno da mistura.

Tradicionalmente, o reator químico de tanque agitado tem sido aplicado como biorreator para cultivos aeróbios. Entretanto, este tipo de reator não é o mais adequado para

o cultivo de fungos filamentosos. Entre as razões, 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.

O biorreator *airlift* é uma torre com relação altura/diâmetro elevada e com ligação entre o líquido do topo e da base. O gás é injetado pela base do equipamento através de um distribuidor formando uma dispersão gás-fluido. As bolhas do gás sobem através do líquido contido na torre contatando-o e deslocando-o, provocando, assim, turbulência e auto-circulação dirigida. O gás é retirado no topo do equipamento. A turbulência gerada 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, sem limitação de oxigênio local, além de ter forças de cisalhamento muito baixas, preservando os tecidos micelianos. O biorreator *airlift* pode ter circulação interna ou externa, e é de construção fácil e barata, especialmente pela ausência de partes móveis.

No Laboratório de Engenharia Bioquímica (Engebio) do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos (EQA) da UFSC foi desenvolvido o projeto e montagem de um biorreator *airlift* com circulação externa, e realizaram-se estudos hidrodinâmicos. O desempenho do equipamento foi comparado com o de um fermentador agitado clássico utilizando-se bactérias e leveduras, onde se conseguiu a mesma eficiência de produção. Esses resultados devem ser superados em maior escala.

Desde 1988, o Laboratório de Micorrizas do Departamento de Microbiologia e Parasitologia (MIP) da UFSC vem desenvolvendo trabalhos de pesquisa com fungos ectomicorrízicos em *Eucalyptus* spp. no Estado. O laboratório mantém uma coleção de mais de 150 isolados de várias espécies, das quais a maioria foi obtida em plantações de Santa Catarina. Resultados desses estudos permitiram selecionar fungos que apresentam potencial para programas de controle de micorrização.

Este estudo foi desenvolvido com apoio dos departamentos EQA, através do Engebio, e MIP, através do Laboratório de Ectomicorrizas, com objetivo central de dar início a novas tecnologias para produção de biomassa fúngica, por meio de cultivo submerso

em biorreator tipo *airlift*. O comportamento de fungos ectomicorrízicos neste tipo de biorreator era desconhecido quando se iniciaram os trabalhos e não foram encontradas informações pertinentes na literatura, tornando inéditos alguns aspectos deste trabalho.

Neste contexto, os objetivos deste trabalho foram: (1) estudar os efeitos de diferentes composições do meio de cultura no crescimento do fungo; (2) estudar os efeitos do pH sobre a produção de biomassa e suas formas de controle; (3) determinar os parâmetros cinéticos do cultivo do fungo em biorreator *airlift* e compará-los com outros processos citados na literatura; e (4) avaliar a viabilidade e infectividade do inoculante em plantas em casa de vegetação.

2 - REVISÃO DA LITERATURA

2.1 – A simbiose micorrízica

Micorrizas são associações simbióticas altamente especializadas entre raízes de plantas e certos fungos (FRANK, 1885) (Figura 2.1). Tal integração permite uma regulação funcional e troca de metabólitos, com benefícios tanto para o fungo quanto para o hospedeiro (SMITH e READ, 1997). Acredita-se que mais de seis mil espécies de fungos são capazes de estabelecer esta associação, com aproximadamente duzentas e quarenta mil espécies de plantas (BONFANTE e PEROTTO, 1995). As micorrizas variam na estrutura, função e no tipo de fungo envolvido, demonstrando representar um tipo de associação que tem evoluído repetidamente, em respostas a diferentes pressões seletivas (SYLVIA, 1998). Evidências sugerem que essa associação evoluiu como um mecanismo de sobrevivência para ambos os organismos envolvidos, permitindo a sobrevivência destes em ambientes de baixa fertilidade do solo, períodos de seca, doenças, baixas temperaturas e outras condições naturais de estresse. Algumas dessas associações tiveram papel fundamental na colonização do ambiente terrestre pelas plantas há centenas de milhões de anos (PIROZYNSKI, 1981).

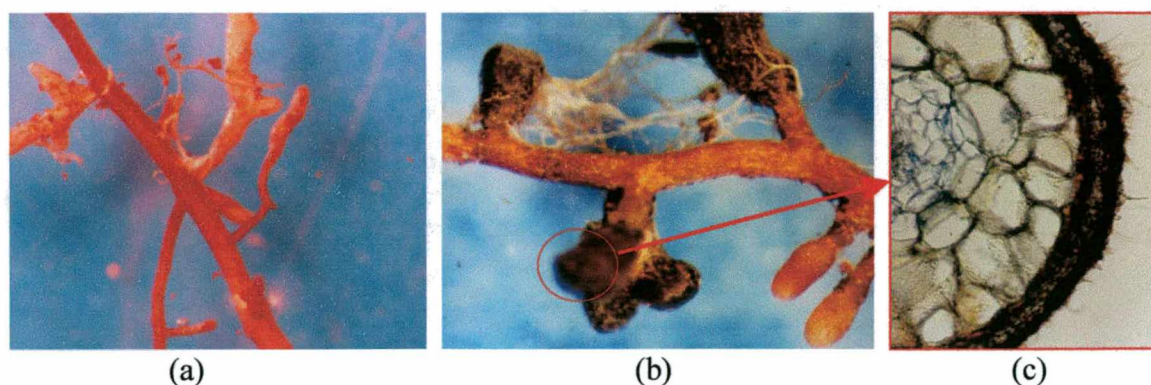


Figura 2.1. Detalhes de ectomicorrizas no sistema radicular de *E. dunnii* (a) e *P. taeda* (b). Em (c) apresenta-se um corte transversal da raiz de *P. taeda* mostrando a rede de Hartig e o manto (Fotos de P.A. BONASSIS e A.J. GIACHINI, Laboratório de Ectomicorrizas, MIP-UFSC).

Entre os mecanismos que contribuem para o efeito benéfico das simbioses micorrízicas para as plantas, o mais importante é o aumento da capacidade de utilização dos nutrientes do solo (LE TACON *et al.*, 1987). Além disso, as micorrizas podem aumentar a capacidade de absorção de água (DUDDRIDGE *et al.*, 1991), atuar na agregação e estabilidade do solo (TISDALL, *et al.* 1997), aumentar a tolerância a condições desfavoráveis de pH e a níveis tóxicos de metais (WILKINS, 1991), bem como a resistência a microrganismos patogênicos (MARX, 1969; NEWSHAM *et al.*, 1995). Nessa simbiose, o fungo se beneficia pelo suprimento de nutrientes orgânicos (carboidratos, vitaminas, aminoácidos) obtidos do hospedeiro; e a planta pelo suprimento dos nutrientes minerais do solo absorvidos pelo fungo (TOMMERUP e BOUGHER, 2000), especialmente aqueles que têm pouca mobilidade, ou estão presentes em baixas concentrações na solução do solo, tais como fósforo, cobre e zinco (SMITH e READ, 1997). O fósforo em especial, encontra-se em quantidades relativamente grandes no solo, mas na forma de precipitados insolúveis, tornando-se indisponível para as plantas. Os fungos podem ajudar na solubilização dos fosfatos através dos ácidos orgânicos que produzem (citrato, oxalato, gluconato, etc.) (TINKER, 1984; LEYVAL e BERTHELIN, 1989). Os benefícios gerados pela associação micorrízica podem levar à redução do uso de fertilizantes, à diminuição do uso de pesticidas e permitir o cultivo em solos pobres e degradados.

Existem três tipos gerais de micorrizas: as endomicorrizas, caracterizadas pela penetração intracelular dos fungos nas células corticais da raiz; as ectomicorrizas (ECM), caracterizadas pela penetração do fungo apenas nos espaços intercelulares do córtex radicular, formando a rede de Hartig e uma camada espessa de hifas na superfície da raiz, denominada de manto; e as ectendomicorrizas que apresentam ambas as características dos tipos anteriores (SMITH e READ, 1997).

Os fungos ectomicorrízicos (fECM) compreendem principalmente espécies de basidiomicetos e de ascomicetos, sendo na sua maioria cultiváveis em meios sintéticos na ausência da planta hospedeira (SMITH e READ, 1997).

As ectomicorrizas são encontradas predominantemente em plantas lenhosas e em regiões temperadas, em particular nas famílias *Pinaceae*, *Fagaceae*, *Betulaceae* e *Salicaceae*, mas são também importantes em algumas famílias de regiões tropicais como *Dipterocarpaceae* e *Myrtaceae* (SMITH e READ, 1997). Nesta última, encontra-se o gênero *Eucalyptus*.

Um aspecto de particular interesse para a biotecnologia com relação às ectomicorrizas é sua ocorrência entre grupos de plantas economicamente importantes (PETERSON *et al.*, 1984), como as principais espécies utilizadas nos programas de reflorestamento no mundo. Esses reflorestamentos ocupam, em geral, solos pobres (Figura 2.2), justificando a busca de técnicas que permitam economizar em termos de energia gasta com intervenções mecânicas no solo e insumos agrícolas (GARBAYE, 1990). A dependência dessas essências florestais em relação à associação micorrízica foi inicialmente observada quando tentativas para estabelecer plantações de espécies exóticas de *Pinus* spp. falharam até que o fungo compatível fosse introduzido (HACSKAYALO e WOZZO, 1971, citados por SMITH e READ, 1997).

Outro interesse com relação ao controle da micorrização, é a recuperação de áreas degradadas ou contaminadas com metais pesados, através de reflorestamentos, onde a inoculação de fungos torna-se necessária para a sobrevivência das plantas (KROPACEK *et al.*, 1989; VODNIK, *et al.*, 1998).



Figura 2.2. Aspecto de plantas de *Pinus* sp. cultivadas em solo pobre. (a) mudas inoculadas com fECM e (b) mudas não inoculadas. Notar as diferenças no sistema radicular (Plant Health Care Inc./Mycorrh Tech Inc., EUA).

As micorrizas atuam como uma eficiência variável sobre o crescimento das plantas, dependendo do fungo associado, do hospedeiro, e das condições ambientais. Certas espécies de fungos podem apresentar especificidade em relação à espécie hospedeira, tornando-se necessários estudos de seleção para detectar fungos mais compatíveis para determinada espécie vegetal e determinadas condições de ambiente (MARX *et al.*, 1982).

Ganhos com o controle de micorrização em relação ao crescimento das plantas variam da ordem de 10 a 400%, e se os dados de altura fossem extrapolados para o volume da parte aérea, seriam obtidos aumentos de 40% (GARBAYE, 1990). A predominância dos efeitos positivos obtidos na maioria dos estudos confirma o enorme potencial do controle da micorrização como ferramenta biotecnológica para os sistemas de produção de mudas no setor florestal.

2.2 - O gênero *Pisolithus*

Espécies do gênero *Pisolithus* estão entre as mais estudadas quanto à formação de micorrizas. Este gênero pertence à família *Sclerodermataceae*, filo *Basidiomycota* (Figura 2.3). *Pisolithus* spp. já foram encontradas em 33 países, em condições variáveis de clima e de solo, em 46 espécies de diferentes gêneros como *Pinus*, *Eucalyptus*, *Betula*, *Pseudotsuga*, *Tsuga*, *Quercus* e *Carya* (MARX *et al.*, 1977).

A possibilidade de cultivo desses fungos em laboratório, a grande gama de hospedeiros existentes e a capacidade de adaptação em condições adversas do solo são algumas das diversas características citadas por MARX *et al.* (1982), que os tornam adequados para aplicações práticas em reflorestamentos.

Devido ao sucesso desses fungos no trabalho pioneiro nos Estados Unidos, com a aplicação em silvicultura (MARX *et al.*, 1989), os estudos sobre ectomicorrizas no Brasil e em outros países tropicais têm dado grande ênfase à espécie *Pisolithus tinctorius*, adotando-se o nome dessa espécie norte-americana para as espécies ocorrendo nesses países. Entretanto, a espécie americana (*P. tinctorius*) parece ser específica de coníferas, enquanto que no Brasil, as frutificações e micorrizas de *Pisolithus* ocorrem somente em plantações de *Eucalyptus* spp.. Provavelmente, são espécies de origem australiana introduzidas acidentalmente com o material vegetal importado daquele país (OLIVEIRA e GIACHINI, 1999; GOMES *et al.*, 2000).

De acordo com esses autores, certas espécies de *Pisolithus* têm sido incorretamente denominadas de *P. tinctorius*, correspondendo às espécies *Pisolithus albus*, *Pisolithus marmoratus* e *Pisolithus microcarpus*, que na Austrália, encontram-se, também, associadas especificamente a *Eucalyptus* spp. (OLIVEIRA e GIACHINI, 1999; ANDERSON *et al.*, 1998). *Pisolithus microcarpus* tem sido a espécie mais frequente nas plantações de

Eucalyptus spp., entre as identificadas até o momento, em Santa Catarina (GIACHINI *et al.*, 2000).

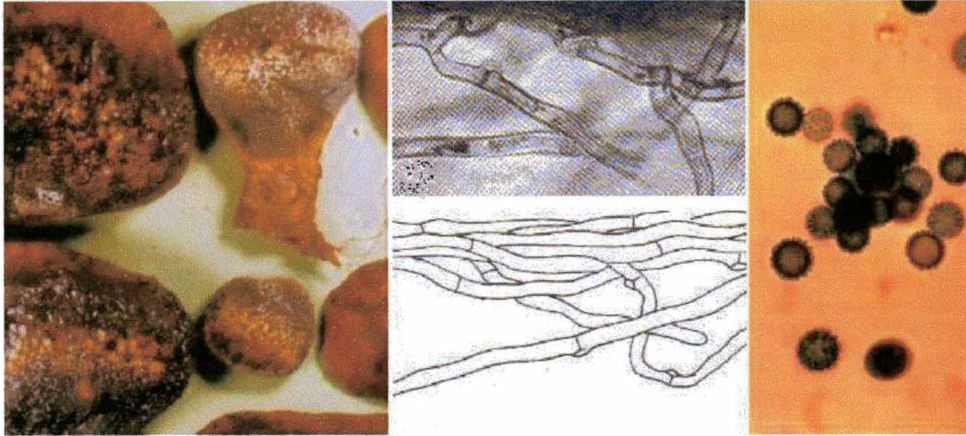


Figura 2.3. Corpos de frutificação, hifas e esporos de *Pisolithus* sp. (Fotos de A.J. GIACHINI, Laboratório de Ectomicorrizas, MIP-UFSC).

A literatura apresenta abundantes resultados sobre o efeito de espécies de *Pisolithus* na promoção do crescimento de plantas. HATCHELL e MARX (1987) observaram que quando as raízes foram colonizadas por *Pisolithus tinctorius*, houve um menor tempo de permanência no viveiro, maior taxa de sobrevivência e melhor desenvolvimento das mudas transplantadas de *Pinus* spp.. Além disto, constataram-se menores perdas por doenças e melhor adaptabilidade e produtividade das plantas inoculadas em locais com baixo teor de nutrientes ou condições adversas de pH do solo (MARX, 1979). A produção de antibióticos por *Pisolithus arhizus* (= *Pisolithus tinctorius*) protegeu as raízes das plantas contra fitopatógenos (KOPE e FORTIN, 1990).

Em estudos de crescimento de fungos na presença de metais pesados, para recuperação de solos contaminados, *Pisolithus tinctorius* foi um dos fungos que apresentou maior tolerância à toxidez (VODNIK *et al.*, 1998). HEINRICH *et al* (1988) observaram que *E. pilularis*, inoculado com *Pisolithus (tinctorius)*, apresentou aumentos na absorção de fósforo e de biomassa em locais com teores limitantes desse elemento. Embora todos esses autores acreditassem tratar-se da espécie *P. tinctorius*, as informações atualmente disponíveis sobre o gênero permitem supor tratar-se de diferentes espécies de *Pisolithus*.

2.3 - Produção de inoculantes ectomicorrízicos

A exploração das simbioses micorrízicas para aumento da produtividade vegetal depende do desenvolvimento de métodos de produção de inoculantes em larga escala. Vários tipos de inoculantes ectomicorrízicos têm sido empregados, destacam-se os esporos fúngicos (THEODOROU, 1971) e os inoculantes vegetativos (MARX *et al.*, 1982), constituídos pelo micélio do fungo selecionado cultivado em cultura pura. O primeiro tipo somente pode ser aplicado aos fungos capazes de produzir grande quantidade de esporos e não permite testar previamente sua eficiência nem sua compatibilidade. O segundo tipo apresenta inúmeras vantagens em relação ao primeiro, principalmente por ser aplicável a qualquer fungo que possa ser cultivado em cultura pura e, mais importante ainda, permite a utilização de fungos selecionados quanto a sua especificidade e eficiência em relação à planta hospedeira (MARX, 1980). A formação de micorrizas em mudas de *Pinus palustris*, inoculadas com *Pisolithus tinctorius*, foi muito mais efetiva utilizando-se micélio vegetativo como inóculo do que esporos (MARX e CORDELL, 1990).

Uma técnica de produção de inoculantes vegetativos é representado pela fermentação em estado sólido, geralmente realizada numa mistura de turfa e vermiculita, embebida com meio de cultura, em frascos tipo conserva (MARX *et al.*, 1982) ou sacos plásticos. A principal vantagem dessa técnica é que o micélio fica protegido entre as lâminas das partículas de vermiculita, garantindo sua sobrevivência até o aparecimento das raízes curtas receptivas do hospedeiro. A vermiculita apresenta, ainda, a vantagem de ser um material barato e versátil. De acordo com GARBAYE (1990), se o meio de cultura utilizado não for rico em açúcares, o micélio não precisa ser submetido a tratamentos posteriores de lavagem, antes de sua aplicação ao substrato de plantio. Entretanto, como são incomuns cultivos com baixos teores de açúcares, sendo eles as únicas fontes de carbono, é difícil eliminar-se o tratamento de lavagem para remoção dos açúcares residuais. Esses resíduos tendem a se difundir para os poros da vermiculita, dificultando a sua exaustão e prolongando o tempo de fermentação. Inoculantes contendo açúcares residuais são suscetíveis de contaminação e, conseqüentemente, perda de sua viabilidade.

Outra técnica mais sofisticada de produção consiste no cultivo do fungo em meio líquido em fermentadores, com posterior encapsulamento do micélio em gel de alginato de cálcio (Figura 2.4). Estudos realizados em viveiros desmostraram que este tipo de inoculante foi mais eficiente que o inoculante produzido em substrato sólido,

provavelmente pela melhor sobrevivência do fungo no solo (LE TACON *et al.*, 1985; KUEK *et al.*, 1992). Dependendo do fungo, o micélio encapsulado em gel de alginato de cálcio, pode ser armazenado em água a 4 °C por até 6 meses com retenção de 95 a 100% de sua viabilidade (MAUPÉRIN *et al.*, 1987; KUEK *et al.*, 1992). 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 fermentativos em meio líquido. A baixa velocidade de crescimento dos fungos ectomicorrízicos, em relação a outros microrganismos (fungos saprofiticos, bactérias e leveduras) acarreta contaminações freqüentes que inviabilizam as culturas; e as operações de lavagem e imobilização da biomassa apresentam novos riscos de contaminação, além de aumentarem os custos de produção (GARBAYE, 1990).

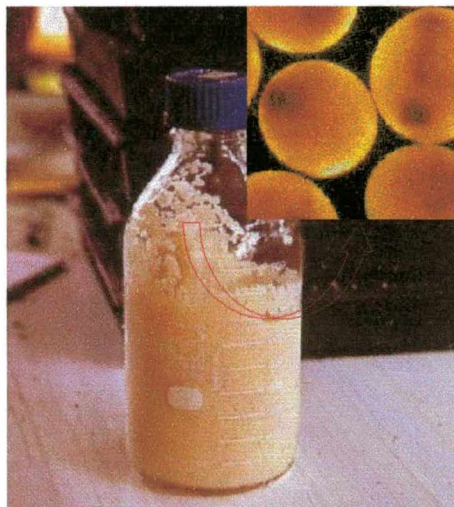


Figura 2.4. *Pellets* de micélio do fungo ectomicorrízico *Laccaria laccata* encapsulado em gel de alginato de cálcio. Em destaque, *pellets* ampliados, podendo-se perceber o micélio nas regiões mais escuras (Biosynthetic Pty. Ltd., Austrália).

Segundo CANNEL e MOO-YOUNG (1980), o processo de fermentação em estado sólido apresenta vantagens quando comparado com a fermentação submersa, dentre elas a redução do volume de meio por massa de substrato, com conseqüente redução do espaço ocupado por equipamentos, sem perda de rendimento do produto; a redução de contaminação bacteriana devido à ausência de água livre; o baixo consumo de energia; o baixo custo das instalações e fluxograma simplificado. Existem, porém, desvantagens como a restrição a fungos que não conseguem crescer em baixos teores de umidade, a necessidade

de grandes volumes de inóculo, o difícil controle dos parâmetros de processo e poucos dados de engenharia para aumento de escala.

A limitação quanto à utilização de fermentação submersa para fungos ectomicorrízicos pode estar mais relacionada com a falta de aplicação de conhecimentos específicos das áreas de engenharia quanto aos fenômenos de transporte envolvidos, do que com a dificuldade de crescimento em meio líquido. Partindo-se da premissa de que o fungo necessita de contato com nutrientes e com o oxigênio para crescer, o processo em meio líquido é o mais indicado, existindo inúmeras alternativas tecnológicas já desenvolvidas e que podem ser testadas e adaptadas para aplicações mais específicas, como a de produção de inoculantes de fungos ectomicorrízicos. A fermentação submersa é, sem dúvida, uma alternativa de produção das mais adequadas para essa finalidade. O processo pode ser realizado em menor espaço e, também, no período mais curto de tempo possível, pois a função principal dos biorreatores é maximizar o contato entre fungo-nutriente-oxigênio, permitindo a rápida exaustão dos açúcares e a eliminação de etapas de lavagem.

2.4 - Meios e condições de cultivo para fungos ectomicorrízicos

A condição de simbiote dos fungos ectomicorrízicos no seu habitat natural determina que as substâncias carbonadas procedam do hospedeiro vegetal (SMITH e READ, 1997). Os fungos ectomicorrízicos necessitam, em geral, de fatores de crescimento e de açúcares simples, cuja identificação é necessária.

Em cultura, muitos isolados podem utilizar de maneira satisfatória, como fontes de carbono, carboidratos como: celobiose, maltose, trealose e sacarose. Entretanto, o carboidrato melhor assimilado é a glicose. As concentrações de glicose mais utilizadas variam de 5 a 20 g.L⁻¹. *P. tinctorius* consegue utilizar diferentes açúcares como fontes de carbono, mas mais eficientemente monossacarídeos do que dissacarídeos.

Muitos fungos ectomicorrízicos podem crescer em culturas axênicas, e isto tem permitido muitas investigações a respeito da utilização de diferentes formas de nitrogênio (SMITH e READ, 1997). Muitas espécies utilizam NH₄⁺ ou NO₃⁻, outras utilizam compostos orgânicos simples, embora existam diferenças inter e intra-específicas. Em geral, a maioria dos fungos ectomicorrízicos prefere fontes inorgânicas de nitrogênio (ANDERSON *et al.* 1999), e isto está relacionado às enzimas envolvidas na assimilação do

NH_4^+ (CAIRNEY, 1999). *P. tinctorius* não difere quanto à utilização da forma de nitrogênio, amônio ou nitrato (SMITH, 1982).

A capacidade de um fungo ectomicorrízico obter N diretamente de proteínas é de grande importância, pois nesta forma o N está indisponível para plantas. A utilização de N de proteínas pelo fungo ectomicorrízico tem grandes implicações em ecossistemas florestais, onde existe grande acúmulo de matéria orgânica no solo, devido às baixas taxas de mineralização (ABUZINADAH e READ, 1989). Em cultivo axênico suplementado com proteína, DICKIE *et al.* (1998) obtiveram aumento da biomassa de *P. tinctorius*. Por outro lado, TURNBULL *et al.* (1995), observaram pouca produção de biomassa em cultivo de *Pisolithus* sp. em meio com proteína. CAIRNEY e CHAMBERS (1997) e ANDERSON *et al.* (1999) observaram que *P. tinctorius* apresenta considerável variação intra-específica na utilização de proteína como fonte de nitrogênio. A utilização de proteínas por fungos ectomicorrízicos, observado em culturas, não implica necessariamente, que essas espécies sejam capazes de obter N diretamente dessas substâncias em sistemas naturais, onde elas podem estar ligadas em estruturas mais complexas (p. ex. em polifenóis).

São vários os meios de cultura utilizados para o cultivo de fungos ectomicorrízicos. LAMB (1974) apresenta um meio composto por glicose, NH_4Cl , KH_2PO_4 , Fe-EDTA (Fe-Etileno Diamino Tetra Acético), tiamina e biotina. HARVEY (1991) cita três meios diferentes: meio de Pridham-Gottlieb, constituído de glicose, peptona, extrato de levedura e sais; meio de 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. Recentemente, KUEK (1996) obteve resultados interessantes trabalhando com *Laccaria laccata* (fungo ectomicorrízico) cultivado numa modificação do meio de LITCHFIELD e ARTHUR (1983).

Por várias décadas o meio MNM tem sido 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) e HARVEY (1991), entre outros, utilizaram com sucesso este meio como base de cultivo para esses fungos. Em todos os trabalhos citados, a sacarose, originalmente presente no meio MNM, 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, 1991a,b), foram outras modificações também introduzidas no meio MNM. PRADELLA *et al.* (1991b), utilizando um isolado de *P.*

tinctorius (obtido de *Eucalyptus* sp.) em cultivo submerso, concluíram que o meio MNM suplementado com peptona ($4,5 \text{ g.L}^{-1}$), ou glutamato de sódio ($8,5 \text{ g.L}^{-1}$), ou extrato de levedura (1 g.L^{-1}) aumentou em quase 100% a velocidade de crescimento. Infelizmente esses autores não apresentam os dados de velocidade de crescimento.

Muitos fungos ectomicorrízicos apresentam seu crescimento ótimo na faixa de temperatura de 18 a 25 °C (HARVEY, 1991). Para o gênero *Pisolithus*, têm sido utilizados diferentes valores de temperatura de incubação. MARX (1969), cultivando em frascos estáticos, utilizou a temperatura de 30 °C. PRADELLA *et al.* (1991b) e OLIVEIRA *et al.* (1989) utilizaram esta temperatura em fermentador de tanque agitado clássico de 3,0 L de volume útil. CAO e CRAWFORD (1993) utilizaram temperatura de 25 °C em frascos agitados. Também em frascos agitados, SMITH (1982) adotou 28 °C, enquanto que LITCHFIELD e ARTHUR (1983) adotaram 37 °C. De maneira geral, fungos do gênero *Pisolithus* podem crescer em temperaturas de até 42 °C, mas a 45 °C já ocorre morte das hifas (HUNG e CHIEN, 1978). Consta-se que existe uma ampla faixa para cultivo desses fungos, e isso deve estar diretamente relacionado com as temperaturas de suas diferentes regiões de origem, ou com as diferentes espécies estudadas, consideradas, então, como sendo todas *P. tinctorius* (OLIVEIRA e GIACHINI, 1999).

A preparação dos meios, particularmente a esterilização, pode afetar a disponibilidade de carboidratos para o processo de fermentação. Assim, é melhor 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 no meio. Os íons metálicos ligados ao agente quelante, podem ser gradualmente utilizados pelos microrganismos. Porém, é importante verificar se o quelante não inibe o crescimento do microrganismo em estudo.

O controle do pH pode ser extremamente importante quando se objetivam níveis ótimos de produtividade. Um componente pode ser adicionado ao meio para servir especificamente como tampão, ou pode também ser utilizado como uma fonte de nutriente. Muitos meios são tamponados em aproximadamente 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. 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 também ser controlado pela adição de amônia ou hidróxido de cálcio, ou ácido sulfúrico (STANBURY *et al.*, 1995).

SMITH (1982) otimizou a produção de biomassa de *P. tinctorius* em meio MNM, tamponando com uma mistura equimolar de ácido cítrico e citrato de cálcio, até pH 5,4 antes da esterilização. O meio de cultivo utilizado por LITCHFIELD e ARTHUR (1983) é autotamponante, devido à presença dos nutrientes $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, e também da peptona e do extrato de levedura. HUNG e CHIEN (1978) em seus estudos fisiológicos com *P. tinctorius*, obtiveram melhor crescimento utilizando o meio MNM com pH inicial 6,6; mas *S. bovinus* cresceu igualmente em pH inicial 5,55 nos cinco meios estudados (MNM, PDA, Palmer, Hagem-ágar, Hagem-ágar modificado). O pH foi inicialmente ajustado com solução 0,1 N de NaOH/HCl. A suplementação do meio MNM com 3 g.L^{-1} de extrato de levedura ajudou a controlar o pH do meio, e aumentou os rendimentos (PRADELLA *et al.*, 1991a). MARX (1990), estudando a influência do nitrogênio e do pH do solo, concluiu que o pH inicial 4,8 proporcionou o melhor desenvolvimento de ectomicorrizas de *P. tinctorius*. Em geral, a literatura relata experiências dentro de uma faixa de pH 4,5 a 6,8.

A quantidade de inóculo normalmente utilizada em fermentações industriais está entre 3 e 10% do volume do meio (MEYRATH e SUCHANEK, 1972; HUNT e STIEBER, 1986). Um volume relativamente grande de inóculo é utilizado visando minimizar a fase lag de crescimento (fase de adaptação do microrganismo ao meio de cultura, havendo pouca ou nenhuma produção de biomassa), e para gerar o máximo de biomassa na produção do fermentador no mais curto tempo possível, aumentando a produtividade do biorreator. Então, partindo-se de uma cultura estoque, o inóculo deve passar por um número de estádios para produzir suficiente biomassa para inocular o fermentador em estágio de produção. Entretanto, esse procedimento requer análise dos riscos de contaminação, tamanho do inóculo e aspectos econômicos do processo.

2.5 - Cultivo em meio líquido

Um dos maiores problemas em estudos envolvendo o cultivo de fungos em biorreatores, reside na quantificação da biomassa produzida. O crescimento de microrganismos filamentosos em cultura líquida é, em muitos aspectos, equivalente ao

crescimento de microrganismos unicelulares (bactérias e leveduras). Mas a forma miceliana de crescimento gera, também, muitas diferenças práticas ou técnicas. Por exemplo, o método turbidimétrico permite estimativas instantâneas e confiáveis do crescimento de bactérias, mas não de microrganismos filamentosos, devido à distribuição desuniforme de biomassa. Esse problema pode ser contornado em alguns casos pela maceração do micélio (GRANADE *et al.*, 1985), mas isto aumenta o tempo necessário para análise das amostras. Entretanto, até mesmo quando se dispõem de dados de matéria seca, esses valores não refletem a realidade, principalmente quando o produto desejado é a biomassa viável. Estudos de crescimento freqüentemente requerem análise de viabilidade, através de padrões de ramificação do micélio, em adição à biomassa, e atualmente isto está sendo facilitado pelo desenvolvimento de técnicas de análises de imagens computadorizadas (PACKER *et al.*, 1992; VANHOUTTE *et al.*, 1995; ZANGIROLAMI *et al.*, 1997; BERTOLLO *et al.*, 2000). Uma alternativa mais simples para construir curvas de biomassa e obtenção de parâmetros cinéticos é a utilização de correlação de biomassa (X) com a condutividade elétrica (C) do meio de cultura (BALLICA *et al.*, 1993; MURANAKA *et al.*, 1993), desde que a razão entre a variação da concentração de células e condutividade ($\Delta X/\Delta C$) seja aproximadamente constante (KWOK *et al.*, 1992).

O crescimento do micélio na superfície e paredes dos vasos de fermentação é um problema significativo em muitas culturas de fungos, com entupimento de agitadores e sensores, além de crescer ao longo das linhas de alimentação de nutrientes. O problema mais fundamental é a falta de uniformidade dentro da biomassa miceliana, apresentando regiões apicais de hifas jovens, e regiões distais mais velhas, e possivelmente menos ativas. Essa heterogeneidade é mais pronunciada em *pellets* (PROSSER e TOUGH, 1991).

O crescimento de fungos filamentosos em cultura líquida, pode ser tanto em micélio na forma livre (micélio disperso) quanto na forma de *pellets*. O micélio disperso consiste numa suspensão homogênea de ramificações de hifas, sem restrições difusionais para troca de substratos e metabólitos com o meio. Nesse sentido, são equivalentes a "culturas ideais" de microorganismos unicelulares, e exibem muitas características destas últimas. O crescimento na forma de micélio disperso é preferível para muitos processos, mas por outro lado aumenta a viscosidade do meio, podendo danificar os agitadores, trancar linhas de fluxo e dispositivos de amostragem (PROSSER e TOUGH, 1991). Geralmente adquirem a condição de fluidos não Newtonianos, onde a viscosidade aparente aumenta com a velocidade de agitação, reduzindo o transporte de nutrientes, oxigênio e calor. A quantidade

relativa de cada forma de crescimento influencia a viscosidade e, dessa forma, as propriedades reológicas do meio de cultura.

A morfologia dos *pellets* também influencia as propriedades reológicas através das interações de seus emaranhados de hifas, mas a viscosidade do líquido, entretanto, permanece mais baixa e, conseqüentemente, a mistura e a transferência de massa são mantidas (MITARD e RIBA, 1988).

A morfologia da cultura não é apenas influenciada por fatores biológicos, também o meio ambiente físico-químico, no qual o microrganismo está crescendo tem igual importância (VAN SUIJDAM e METZ, 1981). Uma revisão da literatura até 1977, foi realizada por METZ e KOSSEN (1977), indicando que alguns dos fatores que afetam a morfologia dos fungos são: agitação e cisalhamento, composição do meio, presença de polissacarídeos, concentração e tipo de inóculo, pH, aeração, surfactantes, etc. A presença de polietileno-glicol, por exemplo, em quantidade mínima no meio de cultura, permitiu o crescimento na forma de micélio disperso de cepas de *Streptomyces coelicolor*, que normalmente formavam *pellets* (HODGSON, 1982). O fungo *Armillaria mellea* produz *pellets* leves em biorreatores *airlift* e *pellets* densos quando cultivado no mesmo meio em biorreator de tanque agitado (HANSSON e SEIFERT, 1987). REISENBERG e BERGTER (1984) obtiveram crescimento miceliano disperso, prevenindo o agrupamento através do controle do pH com tamponamento do meio. O crescimento de *S. coelicolor* na forma dispersa demonstrou ser exponencial, com aumento do rendimento do produto em comparação com cultura na forma de *pellets* (HOBBS *et al.*, 1989). Outros pesquisadores relatam curvas de crescimento linear, ou cinética não exponencial, relacionando com a fisiologia de *pellets* (VITALIS *et al.* 1981; BUSHELL e FRYDAY, 1983). Desvios em relação à cinética prevista não foram estudados em detalhes, mas o crescimento linear é resultante de limitação por um substrato suprido a uma taxa constante e, na maioria dos casos, esse substrato é o oxigênio.

Em síntese, considerando-se a cinética de crescimento, a formação de *pellets* representa a maior diferença entre o modo de crescimento filamentoso e o unicelular em cultura líquida, mas por outro lado o crescimento na forma de micélio disperso introduz problemas técnicos que podem aumentar os custos da fermentação. Descrições quantitativas mais detalhadas do crescimento de fungos filamentosos devem considerar a formação das ramificações e seu controle, que são atualmente melhor compreendidas por meio de estudos das mudanças morfológicas ao longo dos cultivos e de modelagens matemáticas.

Do ponto de vista bioquímico, o oxigênio é o último elemento a aceitar elétrons, ao final da cadeia respiratória sendo, então, reduzido a água, permitindo a reoxidação das coenzimas que participam das reações de desidrogenação (na glicólise e no ciclo de Krebs) e, ainda, permitindo a estocagem de energia através da passagem das moléculas de ADP para ATP (VOET e VOET, 1995). Estas últimas irão participar nas reações de síntese, para a sobrevivência das células e para surgimento de novas células no processo de crescimento e aumento da biomassa, para os quais é fundamental a introdução de energia.

Assim sendo, para que um cultivo seja altamente eficiente, ocorrendo com elevada velocidade de crescimento, deverá apresentar alta velocidade de consumo da fonte de carbono, a fim de que haja abundância de elétrons transportados na cadeia respiratória. Significa, também, obrigatoriamente, a necessidade de oxigênio dissolvido, a fim de que esses elétrons sejam drenados ao final dessa cadeia.

Em bioprocessos aeróbios, que representam a grande maioria, a transferência de oxigênio da fase gasosa, isto é, da bolha de ar para a fase líquida, para que esse seja consumido pelos microrganismos, se dá através da agitação e/ou aeração. O caminho percorrido pelas moléculas de oxigênio desde o seio das bolhas até o interior das células, passando pelo meio de fermentação, assim como as resistências ao transporte de massa, estão ilustrados na Figura 2.5.

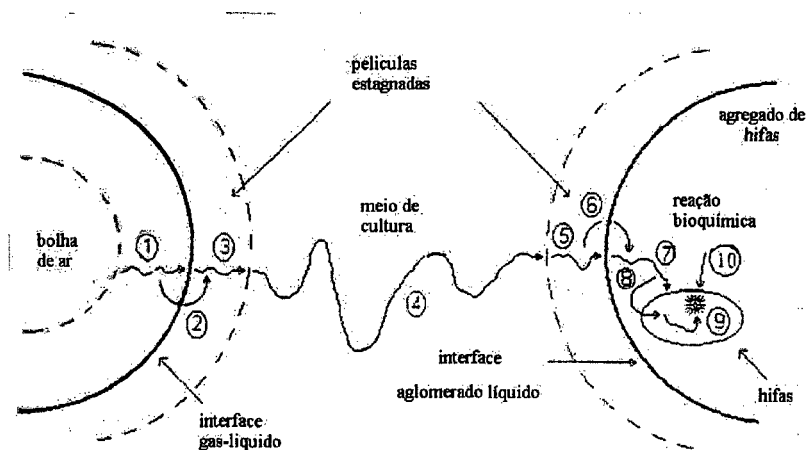


Figura 2.5. Caminho percorrido pelas moléculas de oxigênio, através das diversas resistências, em processos fermentativos aeróbios. (1) difusão pela película estagnada da fase gasosa até a interface; (2) passagem pela interface gás-líquido; (3) difusão pela película estagnada da fase líquida até o meio de cultura; (4) transporte convectivo através do meio de cultura; (5) difusão pela película estagnada externa ao agregado de hifas; (6) passagem pela interface meio de cultura-agregado de hifas; (7) difusão no agregado de hifas; (8) passagem pela membrana das hifas; (9) difusão no citoplasma; (10) reação bioquímica (adaptado de BADINO JR., 2000).

Essas considerações tornam clara a necessidade de se agitar e aerar um meio de cultura, para que se possa efetuar o processo de cultivo aeróbio e, para essa finalidade, existe uma grande quantidade de equipamentos e tecnologias. Esses equipamentos, projetados para ser o núcleo das reações bioquímicas, são os biorreatores. Uma das etapas principais no desenvolvimento de um processo fermentativo é a escolha do tipo de biorreator.

2.6 - Biorreatores

Dependendo do tipo de cultura para a qual são projetados, os biorreatores podem ser mais, ou menos elaborados (LEVEAU e BOUIX, 1985). Num biorreator, a produção de biomassa ou de metabólitos deve ser realizada com a máxima segurança e confiabilidade e custo mínimo de investimento e operação. Em processos microbiológicos, a segurança, com relação a contaminações, é mais problemática do que em processos químicos. Dessa forma, os biorreatores são mais caros de se projetar e construir do que os reatores químicos. Os microrganismos devem ser o foco das considerações com relação à construção de sistemas fermentativos, devendo-se decidir se o fermentador será utilizado em um processo especial para um organismo específico, ou para uma variedade de processos com diferentes microrganismos (HAMER, 1985).

O primeiro processo fermentativo em escala industrial na indústria farmacêutica, para a produção da penicilina, foi desenvolvido em biorreator de tanque agitado, e o tanque agitado continua sendo o biorreator mais utilizado por essas indústrias. Devido ao alto custo, a indústria de fermentação tem preferido modificar os biorreatores existentes a introduzir um biorreator completamente novo. Além disso, a aplicação de um mesmo biorreator para diferentes processos proporciona uma grande flexibilidade para o fabricante. Esta é a razão pela qual o tanque agitado é, freqüentemente, a primeira escolha quando um novo processo é desenvolvido (LEVEAU e BOUIX, 1985). Entretanto, quando existe uma limitação no processo, como por exemplo a necessidade de uma maior transferência de massa gás-líquido, outros tipos de biorreatores, tais como os tipos *airlift*, são considerados (CHISTI, 1989).

2.7 - Reatores *airlift*

Reatores *airlift* são reatores pneumáticos, diferentes do reator de coluna de bolhas, dividindo-se em duas zonas de escoamento (uma direcionada para cima e outra para baixo). Os canais possibilitam a circulação de líquido em grande escala ao redor do corpo do reator (SIEGEL e ROBINSON, 1992).

A primeira zona de expansão de gás é denominada *riser*, onde o gás é injetado pela base do equipamento através de um distribuidor, formando uma dispersão gás-líquido. As bolhas de gás sobem através do líquido contatando-o e deslocando-o. Essa seção tem maior *gas-holdup* (fração volumétrica de gás na zona de dispersão) e é onde ocorre a maior transferência de massa. O líquido deixa o topo do *riser* e entra na zona de despreendimento do gás e, com uma menor quantidade de gás, escoam em sentido contrário através do *downcomer* até o fundo do reator, retornando ao *riser*. Dessa forma, a fase líquida circula continuamente no reator (SIEGEL e ROBINSON, 1992).

Os *airlifts* são geralmente divididos em dois tipos, com base em sua estrutura física: os de circulação interna e os de circulação externa (Figura 2.6). Os de circulação interna são tanques com divisões dentro da coluna de bolhas, de maneira a criar zonas de escoamento. Nos *airlifts* com circulação externa, o *riser* e o *downcomer* são conectados por seções horizontais perto do topo e da base para criar a recirculação do líquido (CHISTI, 1989).

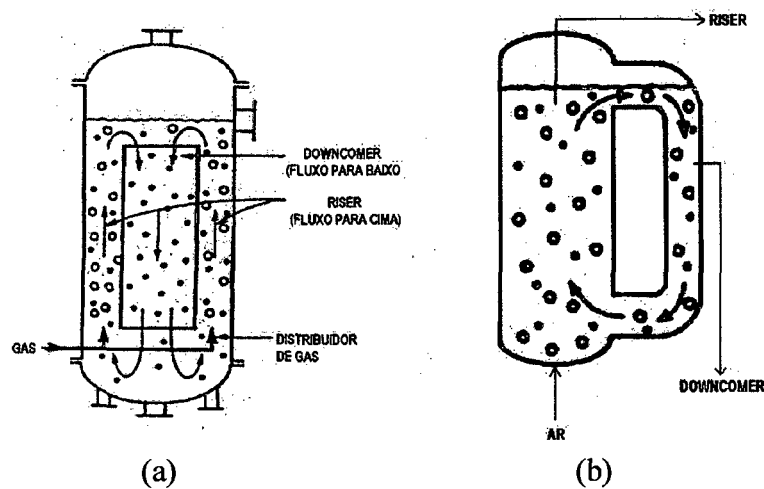


Figura 2.6. Esquema de biorreatores *airlift* com circulação interna (a) e externa (b).
(Adaptado de CHISTI, 1989)

A principal diferença entre os dois tipos de *airlift* é o desenho do separador de gás, que permite ao modelo de circulação externa um desprendimento maior de gás, com grande influência no comportamento geral do reator (BELLO *et al.*, 1985).

Como a força motriz da circulação de líquido é a diferença de densidade média ou da pressão hidrostática entre as seções do *riser* e do *downdrager*, o *airlift* de circulação externa, que permite maior desprendimento de gás, permite uma maior velocidade de circulação. Conseqüentemente, o *gas holdup* é menor devido à alta circulação de líquido no *riser*, o que resulta numa menor transferência de massa (BELLO *et al.*, 1985; POPOVIC e ROBINSON, 1988).

2.7.1 - Vantagens dos bioreatores *airlift*

Tradicionalmente, o reator químico de tanque agitado (STR) tem sido aplicado como biorreator para fermentações aeróbias. Entretanto, este tipo de reator não é o mais adequado para cultivo de microrganismos. Os reatores pneumaticamente agitados, como o *airlift* e o de coluna de bolhas, oferecem muitas vantagens em relação ao tanque agitado clássico (POPOVIC e ROBINSON, 1988).

A primeira vantagem é a construção simples, possibilitando uma manutenção fácil e barata. Como não existem partes mecânicas móveis necessárias para a agitação, há redução do perigo de contaminação, pois facilita a limpeza e a esterilização. A injeção do gás serve para agitar e aerar, eliminando o gasto de energia para agitação, e promovendo um aumento na capacidade de transferência de massa e calor (SIEGEL e ROBINSON, 1992).

Uma outra vantagem dos *airlifts*, sobre os demais biorreatores em processos biológicos, está relacionada com o fato de a força de cisalhamento imposta pelo campo turbulento nas células ou *pellets* (no caso dos fungos) suspensos no meio ser muito menor em biorreatores *airlift*. O grau de agitação requerido para a transferência de oxigênio causa, em muitos casos, danos aos microrganismos devido ao alto grau de cisalhamento do agitador. Regiões de alto cisalhamento, perto do agitador, e regiões de baixo cisalhamento, afastadas do agitador, expõem os microrganismos a uma variação de meio ambiente e a áreas de estresse que podem afetá-los adversamente. Além disso, a energia mecânica necessária para realizar a transferência de massa em STR é elevada e antieconômica, sendo

também dissipada no fluido na forma de calor, que precisa ser removido para controle da temperatura.

O campo de cisalhamento é mais homogêneo nos biorreatores *airlift*, sendo relativamente constante através do biorreator. Mesmo que movimentos ao acaso possam ser sobrepostos, 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).

Muitos processos fermentativos são realizados em fermentadores de grande porte (até 2 milhões de litros) sendo, portanto, o custo de agitação importante para a viabilidade do processo. MALFAIT *et al.* (1981) conseguiram um aumento superior a 18% (em peso) na produção do fungo *Monascus purpureus* em um *airlift* de circulação externa, em relação ao reator de tanque agitado (STR).

Estudos vêm confirmando que fermentadores do tipo *airlift* são mais adequados para o processo de produção de proteínas, onde há necessidade de uma alta eficiência na transferência de massa. Além da produção de proteínas, o uso dos fermentadores do tipo *airlift* na produção de fungos filamentosos, e outras células sensíveis, tem proporcionado bons resultados (KOENIG *et al.*, 1981; MALFAIT *et al.*, 1981; ERIKSON *et al.*, 1983; KESSLER *et al.*, 1993). BONNARME *et al.* (1993) relatam a superioridade dos biorreatores *airlift* e coluna de bolhas em relação ao de tanque agitado, na produção de metabólitos por microrganismos sensíveis ao cisalhamento provocado pelos agitadores mecânicos.

Apesar das vantagens apresentadas, a aplicação dos biorreatores *airlift* em escala de produção em indústrias bioquímicas ainda é limitada. Os *airlifts* são menos flexíveis às mudanças de processo que os STR, uma vez que os parâmetros geométricos são selecionados para um determinado processo durante o projeto; a velocidade do fluxo de gás é, em princípio, o único parâmetro de ajuste durante a operação. Portanto, os *airlift* são menos adaptáveis a outros processos com necessidades muito diferentes de mistura e agitação, distribuição de gás e características de transferência de massa, do que os STR que apresentam a vantagem de ter controles independentes de aeração e agitação (CHISTI, 1989).

2.7.2 - Aplicações dos biorreatores *airlift*

Muitas aplicações em escala de bancada e em escala piloto têm sido estudadas para uma variedade de microrganismos e culturas celulares. A maioria enfoca a cinética de crescimento em vez do fenômeno de transporte durante as fermentações. Consequentemente, pouca informação sobre a hidrodinâmica básica e sobre o transporte de massa encontra-se disponível para um projeto de reator ideal e *scale-up* (SIEGEL e ROBINSON, 1992).

FRÖHLICH *et al.* (1991), WU e WU (1991) e POLLARD *et al.* (1996), estudaram *Saccharomyces cerevisiae* em biorreatores *airlift* testando diversas configurações físicas, onde conseguiram melhorar o desempenho dos próprios biorreatores *airlift*. BONNARME, *et al.* (1993) utilizaram com sucesso um biorreator *airlift* para produção das enzimas lignina e manganês peroxidases, e 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*, performance similar a um biorreator STR com relação à produção de proteinase ácida pelo fungo *Humicola lutea*.

Outros autores estudaram o *airlift* como um biorreator potencial para o tratamento de vários resíduos. HÜPPE *et al.* (1990) utilizaram uma planta piloto de dois estágios para tratar biologicamente efluentes de refinaria de carvão. TYAGI *et al.* (1990) utilizaram um *airlift* com circulação externa para estudar a digestão aeróbica mesofílica e termofílica de lodos municipais primários e secundários.

Recentemente, JOLICOEUR *et al.* (1999) utilizaram um *airlift* com circulação interna para produzir, pela primeira vez, propágulos de fungos endomicorrízicos (para utilização como inoculante), propondo uma segunda geração de bioprocessos para este fim.

Aplicações dos biorreatores *airlift* foram revistas por ONKEN e WEILAND (1983), SMART e FOWLER (1984), e SIEGEL *et al.* (1986) em inúmeros bioprocessos. Entretanto, até o presente, não foram relatadas aplicações de biorreatores *airlift* para produção de inoculantes de fungos ectomicorrízicos. Estudos de produção desses inoculantes estão, até o presente, sendo realizados por meio de processos de fermentação no estado sólido ou de fermentação submersa em biorreatores convencionais. A utilização de biorreatores tipo *airlift* para cultivo de fungos ectomicorrízicos é, assim, uma nova tecnologia a ser explorada.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Engenharia Bioquímica do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos (ENGEBIO/EQA), e no Laboratório de Ectomicorrizas do Departamento de Microbiologia e Parasitologia (MIP).

No MIP, foram realizadas as etapas de manutenção de culturas, produção de inóculos para o fermentador, ensaios em frascos estáticos e agitados, controle de qualidade e teste em casa de vegetação. No ENGEBIO, foram realizados os ensaios em fermentador e as determinações analíticas.

Devido às baixas velocidades de crescimento dos fungos basidiomicetos, tornam-se impraticáveis as investigações somente em biorreatores. A flexibilidade de ensaios em frascos estáticos ou agitados possibilita economia de tempo e materiais e, apesar das diferentes condições de cada sistema, ainda é possível estabelecer correlação entre eles.

Os procedimentos experimentais podem ser agrupados da seguinte forma:

- A) Repicagens e manutenção do material biológico para utilização nos ensaios;
- B) Ensaios preliminares, estudo de meios de cultivo, desenvolvimento de estratégias de cultivo e adequação dos equipamentos;
- C) Fermentações em frascos para obtenção de parâmetros cinéticos e redução de custos do meio de cultivo;
- D) Fermentações em biorreator e determinação de parâmetros cinéticos;
- E) Acondicionamento e testes do inoculante produzido em biorreator.

3.1 - Microrganismo utilizado

Foi utilizado o fungo ectomicorrizico (fECM) *Pisolithus microcarpus* (Cooke e Masee) G. Cunn., isolado UFSC-Pt 116, da coleção de fECM do MIP/UFSC, proveniente

de plantações de *Eucalyptus dunnii* de Santa Catarina. O isolado foi mantido por subcultura em meio MNM e L&A/K sólido (1,5% ágar) (Tabela 3.1), com repicagens mensais, e incubação na ausência de luz à temperatura de 25 °C±1.

3.2 - Meios de cultivo

Foram estudadas variações dos meios MNM e L&A/K. A composição básica desses meios é apresentada a seguir:

Tabela 3.1: Meios de cultura utilizados como base para os estudos de produção de biomassa de *P. microcarpus*.

	MNM (g.L ⁻¹)*	L&A (g.L ⁻¹)	L&A/K (g.L ⁻¹)
Glicose	10,0	30,0	10,0
Peptona	-	10,0	3,33
Extrato de levedura	-	2,0	0,67
Extrato de malte	3,0	-	-
CaCl ₂	0,050	-	-
NaCl	0,025	-	-
NH ₄ NO ₃	-	3,0	1,0
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,25	-	-
KH ₂ PO ₄	0,50	2,38	0,264
K ₂ HPO ₄	-	5,65	0,628
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,15	1,0	0,330
CuSO ₄ .5H ₂ O	-	0,0064	0,0021
MnCl ₂ .4H ₂ O H ₄ NO ₃	-	0,0019	0,0004
ZnSO ₄ .7H ₂ O	-	0,0015	0,0006
FeSO ₄ .7H ₂ O	-	0,0011	0,0005
FeCl ₃ (solução 1%)	1,2 mL	-	-
Tiamina-HCl	100 µg	-	-
Relação C/N	50/1	5/1	5/1

3.2.1 Definições dos meios de cultura e modificações estudadas:

MNM	Meio de Melin-Norkrans Modificado (MARX, 1969), pH _i 5,8;
MNM+xEL	Meio MNM suplementado de x g/L de extrato de levedura;
MNM-EM+EL	Meio MNM com extrato de levedura no lugar do extrato de malte;

* Exceto quando indicado.

MNM A/C	Meio MNM tamponado com solução 0,1 M de ácido cítrico+acetato de sódio (tampão A/C) até pH indicado;
MNM A/C+EDTA	Meio MNM tamponado com A/C, mais agente estabilizador dos íons metálicos etileno diamino tetra acético;
MNM+micro	Meio MNM suplementado com 2 mL solução de micronutrientes [†] por litro de meio de cultura;
MNM+vit	Meio MNM suplementado com vitaminas A, C, E e complexo B;
L&A	Meio utilizado por LITCHFIELD e ARTHUR, (1983);
L&A/K	Meio L&A com modificações propostas por KUEK (1996);
L&A/KM _k	Meio utilizado por KUEK (1996) com k modificações propostas neste trabalho.

3.2.2 Condições de cultivo

- **Em frascos erlenmeyers estáticos:** em B.O.D. (Figura 3.2) com temperatura de 25 °C±1, na ausência de luz. Frascos de 250 mL, com 25 mL de meio de cultura;
- **Em frascos erlenmeyers agitados:** na ausência de luz, sem controle da temperatura, rotação de 70 rpm. Frascos de 250 ml, com 30 mL de meio de cultura.
- **Em biorreator:** temperatura de 25,5 °C±1, na ausência de luz, aerado com vazão de 0,8 NL.min⁻¹±0,2. Volume de meio de cultura: 2,3 L.

O ajuste de pH nos meios de cultivo foi realizado antes da esterilização e, dependendo do ensaio, com a solução tampão A/C ou HCl/NaOH 0,1N. Foram utilizados potenciômetros padrão de bancada.

Nas fermentações em biorreator, foram utilizados 0,2 mL do antiespumante propileno-glicol.

3.3 – Procedimentos de esterilização e desinfecção

- A esterilização foi feita em autoclave com temperatura de 121 °C;

[†] 1 g.L⁻¹ Na₂MoO₄, 0,70 g.L⁻¹ MnSO₄.H₂O, 1,4 g.L⁻¹ H₃BO₃, 0,04 g.L⁻¹ CuSO₄.5H₂O e 0,12 g.L⁻¹ ZnSO₄.7H₂O

- ❑ Os meios de cultura para placas e frascos foram esterilizados durante 20 minutos;
- ❑ Os meios de cultura em volumes de até 2,5 L para fermentações em biorreator foram esterilizados durante 30 minutos;
- ❑ Todos os materiais acessórios para manipulação direta com o fungo foram esterilizados no mínimo 20 minutos; o biorreator construído em vidro borossilicato foi esterilizado durante 60 minutos (Figura 3.1);
- ❑ O biorreator ficou em sala isolada, com ante-sala, de acesso restrito. A cada fermentação, as salas foram desinfetadas com solução de 0,2% hipoclorito de sódio para remoção de poeiras e sujeiras grosseiras e, em seguida, com luz ultra-violeta (UV) durante um tempo mínimo de 4 horas. Quando ocorria contaminação, o biorreator passava por desinfecção com solução de hipoclorito de sódio e com luz UV durante 24 horas. Também durante as fermentações, utilizou-se periodicamente luz UV para desinfetar o ambiente.
- ❑ Os materiais contaminados durante os testes foram esterilizados durante 30 minutos e descartados.
- ❑ A manipulação do fungo foi realizada em capela de fluxo laminar, vistoriada mensalmente (Figura 3.2).

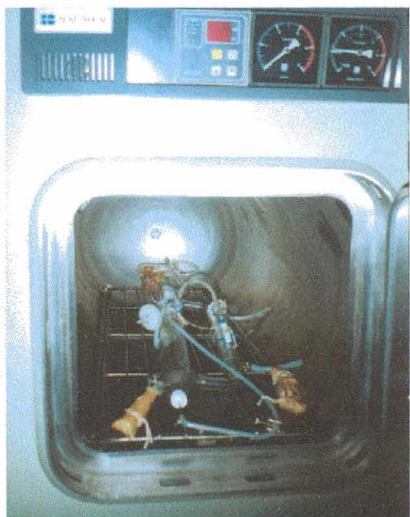


Figura 3.1. Biorreator *airlift* dentro de autoclave para esterilização



Figura 3.2. Vista geral das estufas de crescimento (B.O.D.) e da capela de fluxo laminar.

3.4 -Inóculos

O produto final das fermentações em biorreator é a biomassa fúngica que passa a ser o inóculo para testes de viabilidade e infectividade em plantas, ou o inóculo comercial para inoculação das plantas em viveiros. Neste caso, trata-se do inoculante. Entretanto, o inóculo de que mais trataremos ao longo do texto, é aquele produzido para inocular o próprio biorreator.

Esta questão necessita de um pouco de atenção, pois como os fungos ectomicorrízicos crescem muito mais lentamente que bactérias e leveduras, demorando dias para duplicar sua biomassa, a produção do inóculo é um fator crítico nesses estudos.

Os meios de cultura depois de esterilizados possuem uma quantidade de oxigênio dissolvido extremamente baixa e, sem dúvida, os inóculos deveriam ser cultivados em condições de aeração, não apenas com agitação, mas com a introdução de ar filtrado, e como pré-inóculos poderiam ser utilizados tapetes micelianos jovens (até 30 dias de idade), fragmentados. Em nossos estudos, não foi possível utilizar metodologias com aeração, por isso, utilizaram-se discos de micélio-ágar, que tendem a crescer na superfície do líquido e captam o oxigênio diretamente do ar.

A utilização de inóculo inadequado a determinado tipo de processo pode comprometer os resultados. Foi possível perceber em diversos estudos da literatura, falhas relacionadas com a questão da aeração, onde geralmente é atribuído ao fungo ou ao meio a sua baixa produtividade (BOOKER, 1980; OLIVEIRA *et al.*, 1988; SOUZA, 1996).

3.4.1 Produção do inóculo para ensaios em frascos e em biorreator

Devido a limitações operacionais e variáveis impossíveis de controlar, com relação às estratégias de aeração para produção de inóculo, estabeleceu-se a metodologia que é apresentada no esquema da Figura 3.3.

Para ensaios em frascos estáticos, foram utilizados discos de micélio-ágar de 8 mm de diâmetro obtidos de culturas jovens em meio sólido, em placas. Foram utilizados 4 a 5 discos viáveis para inocular 25 mL de meio em frascos de 250 mL de volume (Figura 3.4).

Para ensaios em biorreator, foram utilizadas suspensões micelianas do fungo cultivado em meio líquido em frascos, e fragmentado em meio fresco em liquidificador durante 7 segundos. Utilizaram-se 300 mL de suspensão para 2,5 L de meio de cultura.

Quanto ao tempo de fragmentação do micélio, a literatura apresenta valores na faixa de 1 a 10 segundos (MAUPÉRIN *et al.* 1987; PRADELLA *et al.*, 1991b; KUEK, 1996), e cada valor está diretamente relacionado com os diferentes equipamentos utilizados. Para o nosso estudo, o tempo de fragmentação adotado, de 6 a 7 segundos, foi estabelecido através de ensaios preliminares [cf. 3.6.1 (b)].

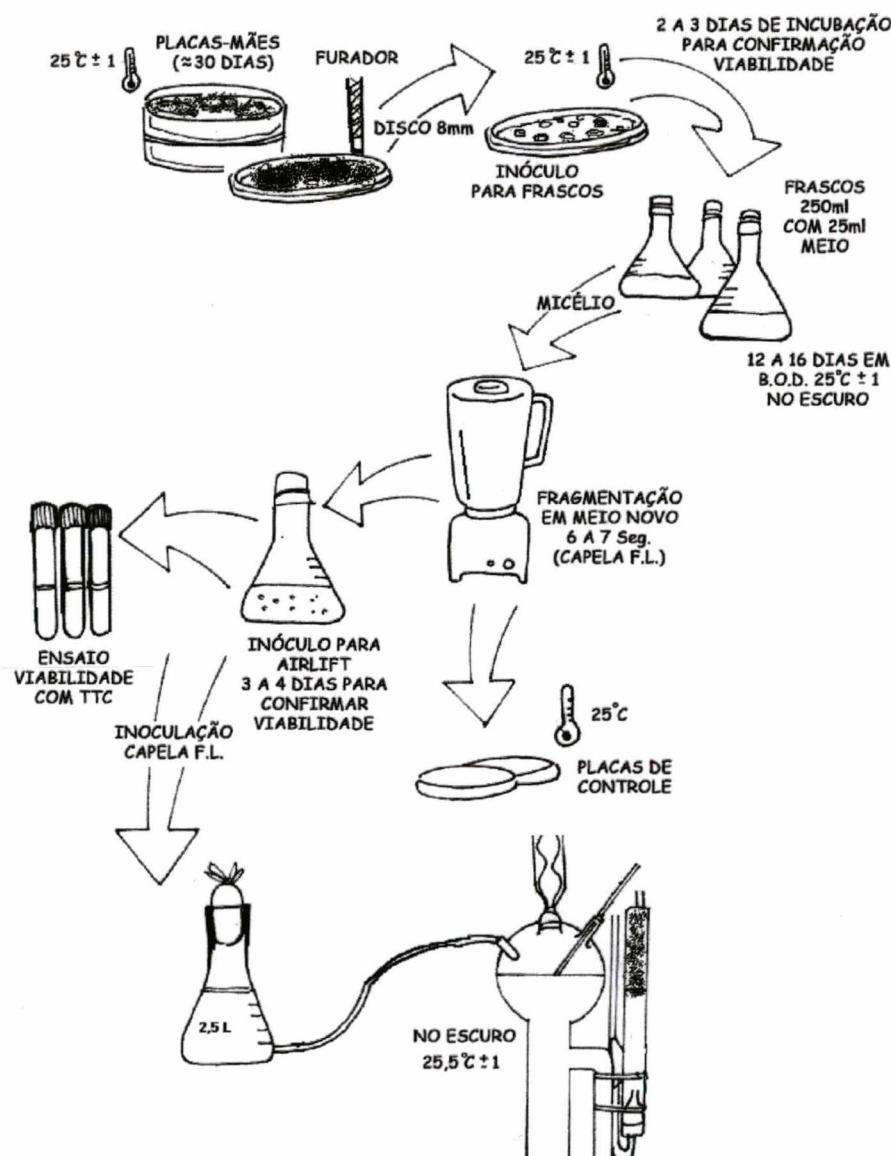


Figura 3.3. Técnica de preparação de inóculo para cultivo de *P. microcarpus* em frascos e em biorreator.

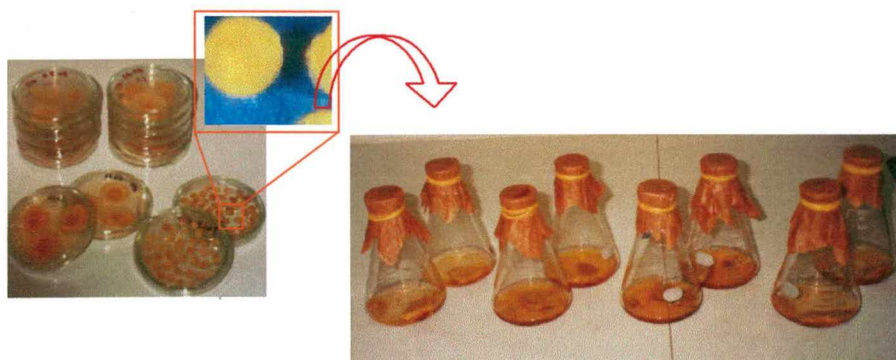


Figura 3.4. Tapetes micelianos de *P. microcarpus* obtidos em cultura estática e utilizados para produzir o inóculo para fermentação em biorreator.

3.4.2 Inoculante para estudo em casa de vegetação

Foi testado o micélio do fECM, isolado UFSC-Pt 116, produzido em biorreator *airlift*, e preparado de duas maneiras: suspensão miceliana em água destilada, e micélio encapsulado em gel de alginato de cálcio (MAUPÉRIN *et al.*, 1987). A metodologia utilizada no preparo do inóculo está representada na Figura 3.5. Todas as operações, desde a coleta do micélio no biorreator até o encapsulamento, foram realizadas assepticamente, pois do contrário, a contaminação com microrganismos de crescimento rápido não permitiria observar o crescimento do fECM. Entretanto, para fins comerciais o encapsulamento não necessita ser asséptico, pois a suspensão miceliana deve estar isenta de glicose e a inoculação se realiza em plantas e substrato não estéreis.

Os *pellets* de micélio (aproximadamente 9 g de biomassa fresca) foram fragmentados em 250 mL de água destilada durante 7 segundos, utilizando-se um liquidificador industrial. Uma parte dessa suspensão constituiu uma das formas testadas. Igual volume da mesma suspensão miceliana e de solução estéril de alginato de sódio (20 g.L⁻¹), foram misturados em agitador magnético até homogeneização completa. Essa mistura foi gotejada em uma solução 0,7 M de CaCl₂ para polimerização e formação de partículas de aproximadamente 4 mm de gel de alginato de cálcio. O tempo necessário para polimerização completa dos *pellets* foi de 50 minutos. Os *pellets* foram testados quanto à sua viabilidade em meio de cultura (MNM), em placas de Petri, e armazenados a 4 °C em água destilada em frascos.

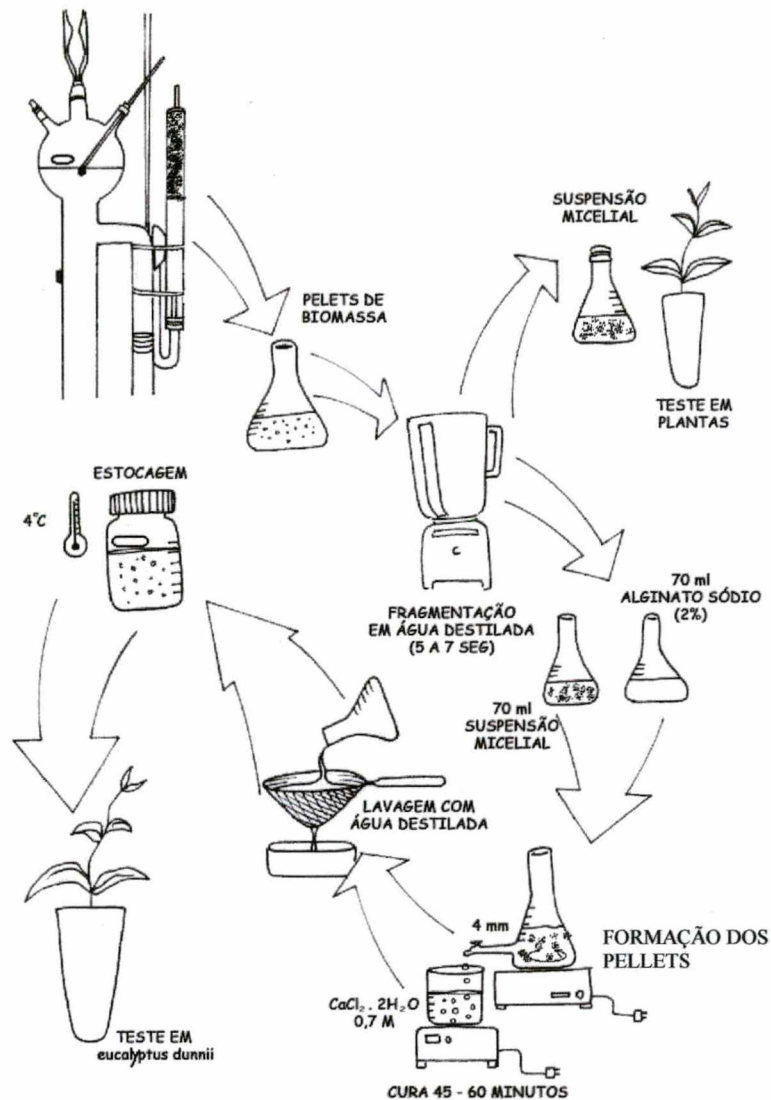
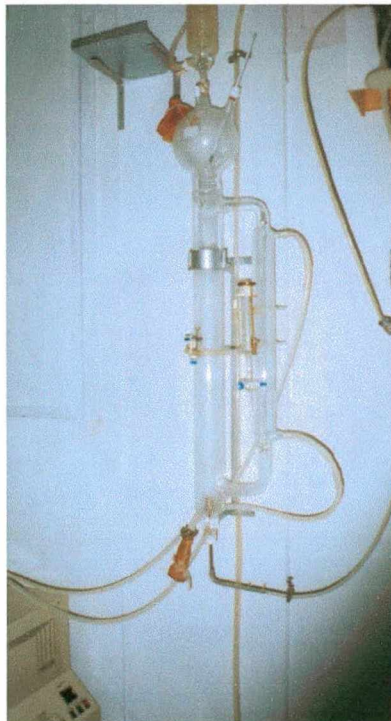


Figura 3.5. Metodologia utilizada para preparação de inoculante de *P. microcarpus* para estudos em plantas sob condições de casa de vegetação.

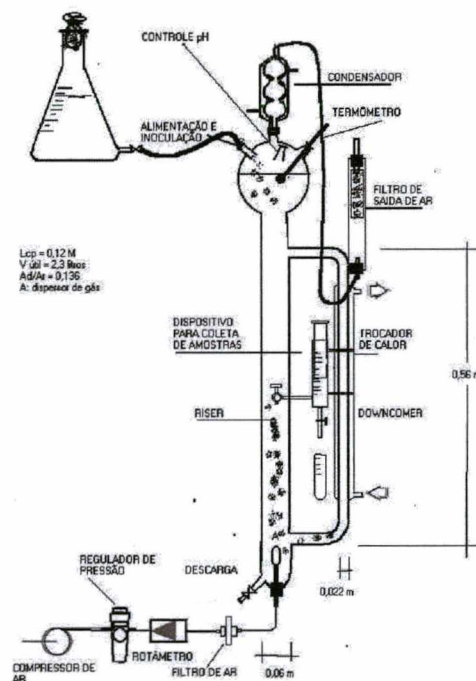
3.5 – Descrição do biorreator empregado para produção do inoculante

Um biorreator tipo *airlift* com circulação externa, com volume útil de 2,3 L (Figura 3.6), foi construído em vidro borossilicato (resistente a altas temperaturas), com base no projeto de outro biorreator *airlift* construído no ENGEBIO, mas com capacidade para 6,5 L (PEDRINI, 1997). O biorreator de menor tamanho permitiu maior flexibilidade (menos consumo de meio de cultura e quantidades menores de inóculo) e foi redimensionado para ser colocado numa autoclave existente no MIP, pois a temperatura de esterilização do biorreator de 6,5 L ficava limitada a 100 °C. O dispersor do ar comprimido foi uma pedra

porosa. Um rotâmetro de 0 a 1,2 NL.min⁻¹ foi utilizado para medir a vazão de ar, e um banho termostático foi utilizado para controlar a temperatura do meio de cultivo através de um trocador de calor no *downcomer*. O ar de entrada foi filtrado utilizando-se filtro de ar MILLEX[®] Ø=0,2 µm da Millipore[®], e o ar de saída passava por dispositivo com filtro de algodão, para evitar que eventuais refluxos contaminassem o cultivo. Na Figura 3.6, também é possível observar a simplicidade de construção do biorreator.



(a)



(b)

Figura 3.6. Fotografia do biorreator *airlift* com circulação externa (a); e esquema do biorreator com as medidas de projeto (b).

3.6 – Estudos experimentais

3.6.1 Estudos preliminares

a) Informações preliminares de cultivo e correlação com a biomassa:

Existe uma grande dificuldade de se estabelecerem as curvas de biomassa em cultivos de fungos filamentosos, devido aos aglomerados de hifas e sua distribuição desuniforme no meio de cultura (PROSSER e TOUGH, 1991). Ensaios iniciais (em frascos

estáticos e agitados) tiveram como objetivo verificar a existência de correlação entre biomassa e os pigmentos liberados pelo fungo no meio de cultivo, e entre a biomassa e a condutividade elétrica do meio (BALLICA *et al.*, 1993; KWOK *et al.*, 1992). Observou-se, também, a variação do pH, consumo da fonte de carbono e condições de cultivo (temperatura, aeração, luminosidade, quantidade e forma do inóculo e os volumes de meio), para posteriormente definirem-se os novos ensaios.

b) Formas de preparo do inóculo:

Nos estudos preliminares foram testadas diversas técnicas de produção do inóculo para as fermentações em biorreator:

- utilizando-se discos de micélio como pré-inóculos;
- utilizando-se suspensões micelianas como pré-inóculos.
- ❖ fragmentando-se o micélio cultivado em meio sólido;
- ❖ fragmentando-se micélio cultivado em meio líquido.
- fragmentando-se o micélio com fragmentador Ultra-Turrax[®];
- fragmentando-se o micélio com liquidificador industrial.

Nesta etapa preliminar, também introduziram-se as seguintes melhorias no biorreator:

- dispositivo na saída de ar (pequeno reservatório mais filtro de ar de algodão) que evita pressurização do biorreator em caso de geração excessiva de espuma;
- sistema de umidificação do ar comprimido utilizado na aeração, evitando perdas da ordem de 1% ao dia da água do meio de cultura;
- reposicionamento do filtro de ar de entrada, evitando que refluxos de meio o danificassem;
- coletor de amostra com dispositivo para coleta com sucção por êmbulo, evitando-se entupimentos, possibilitando amostras mais homogêneas e volumes mais precisos, com menor risco de contaminação.

3.6.2 Efeito da composição do meio de cultura no crescimento de *P. microcarpus*

Devido à falta de estudos fisiológicos dos isolados de fECM de interesse comercial, e à dificuldade do fungo modelo crescer no meio tradicional MNM observada nos ensaios preliminares, foram testadas diversas modificações nos dois meios de base (item 3.2.1), com o objetivo de compreender alguns requerimentos nutricionais, detectar algum possível inibidor e, também, algum fator indutor de crescimento. Os ensaios foram realizados em meio líquido em frascos estáticos, sob condições controladas de temperatura a 25 °C, em incubadora B.O.D. Foram realizadas medidas de pH, massa seca, e glicose residual no final dos cultivos (10 e 25 dias num experimento e 12 dias para outro experimento).

3.6.3 Simplificação do meio de cultura utilizando Planejamento Fatorial

Na composição que forneceu os melhores resultados de produção de biomassa (cf. resultados do item 3.6.2), foram realizadas novas modificações utilizando a técnica de planejamento fatorial (BOX *et al.*, 1978), com oito ensaios em triplicata para cada experimento, objetivando-se simplificar o meio de cultura, reduzindo-se os custos sem prejuízo dos rendimentos já observados.

Foram realizados três experimentos, com ensaios montados aleatoriamente:

a) **Experimento 1:** Considerando os custos dos componentes do meio, foi estudado a influência das seguintes variáveis independentes, na conversão de nutrientes em biomassa:

- concentração (g.L^{-1}) de Glicose (**G**);
- concentração (g.L^{-1}) de Peptona bacteriológica (**P**);
- concentração (g.L^{-1}) de Extrato de Levedura (**EL**).

Como resposta, relacionando o grau de transformação de glicose em biomassa foram obtidos valores para a variável dependente $Z_{X/S}$, definida como:

$$Z_{X/S}(\text{g.g}^{-1}) = \frac{X_f}{S_0} \quad (3.1)$$

Onde: X_f = biomassa final (g.L^{-1});

S_0 = concentração inicial de glicose (g.L^{-1});

Esta definição para a resposta foi necessária, para substituir a definição convencional de conversão $Y_{X/S}$ (Equação 3.6), pois houve ensaios com glicose residual alta (devido a inibição no crescimento relacionada com variáveis do tratamento em questão) e, conseqüentemente, pouca biomassa produzida. Entretanto, a pequena quantidade de glicose consumida, forneceria um bom valor de conversão, se calculada pela definição $Y_{X/S}$. Neste estudo, a resposta mais adequada é aquela que representa a melhor produção de biomassa, mas não poderia ser a própria medida de biomassa, pois o substrato limitante (no caso a glicose) é uma das variáveis estudadas.

No algoritmo para cálculo dos efeitos, os verdadeiros níveis dos fatores são substituídos por valores codificados das variáveis originais (+1 e -1). A apresentação dos dados de entrada nas Tabelas 3.2, 3.3 e 3.4 foi feita de acordo com BOX *et al.* (1978), para facilitar o uso de programas estatísticos.

Na Tabela 3.2 apresenta-se o primeiro planejamento fatorial, onde G_1 , P_1 e EL_1 representam os valores das variáveis codificadas pelas equações 3.2. Para simplificação, também se apresentam as respostas $Z_{X/S}$, que fornecerão os resultados dos cálculos dos efeitos que serão discutidos no próximo capítulo.

$$G_1 = \frac{\text{Glicose} - 12}{2} \quad P_1 = \frac{\text{Peptona} - 2,5}{0,8} \quad EL_1 = \frac{\text{Ext. Lev.} - 0,51}{0,16} \quad (3.2)$$

Tabela 3.2: Planejamento fatorial mostrando as variáveis estudadas com seus respectivos níveis codificados, e as respostas obtidas do Experimento 1 em cultivo estático de *P. microcarpus* em meio base L&A/K, na temperatura de 25 ± 1 °C.

ensaio	Variáveis independentes (níveis em g.L^{-1})			Níveis codificados das variáveis		
	Glicose	Peptona	Ext. Lev.	G_1	P_1	EL_1
1	10	1,7	0,35	-1	-1	-1
2	14	1,7	0,35	+1	-1	-1
3	10	3,3	0,35	-1	+1	-1
4	14	3,3	0,35	+1	+1	-1
5	10	1,7	0,67	-1	-1	+1
6	14	1,7	0,67	+1	-1	+1
7	10	3,3	0,67	-1	+1	+1
8	14	3,3	0,67	+1	+1	+1

(1) dados do Experimento 1.

b) **Experimento 2:** Em função dos resultados do primeiro experimento, ampliou-se o nível da variável extrato de levedura no segundo planejamento para confirmar seus efeitos, os quais foram contraditórios em relação aos apresentados na literatura (OLIVEIRA *et al.*, 1989; PRADELLA *et al.* 1991a,b).

Na Tabela 3.3 apresenta-se o segundo planejamento fatorial, onde G_2 , P_2 e EL_2 representam os valores das variáveis codificadas pelas equações:

$$G_2 = \frac{\text{Glicose} - 12}{2} \quad P_2 = \frac{\text{Peptona} - 2,5}{0,8} \quad EL_2 = \frac{\text{Ext. Lev.} - 0,7}{0,3} \quad (3.3)$$

Tabela 3.3: Planejamento fatorial mostrando as variáveis estudadas com seus respectivos níveis codificados, e as respostas obtidas do Experimento 2 em cultivo estático de *P. microcarpus* em meio base L&A/K, na temperatura de 25 ± 1 °C.

ensaios	Variáveis independentes (níveis e g.L ⁻¹)			Níveis codificados das variáveis		
	Glicose	Peptona	Ext. Lev.	G_2	P_2	EL_2
1	10	1,7	0,4	-1	-1	-1
2	14	1,7	0,4	+1	-1	-1
3	10	3,3	0,4	-1	+1	-1
4	14	3,3	0,4	+1	+1	-1
5	10	1,7	1,0	-1	-1	+1
6	14	1,7	1,0	+1	-1	+1
7	10	3,3	1,0	-1	+1	+1
8	14	3,3	1,0	+1	+1	+1

(2) dados do Experimento 2.

c) **Experimento 3:** No terceiro planejamento fatorial, a peptona bacteriológica foi substituída por Peptona de Soja e o extrato de levedura foi substituído por Extrato de Malte. Novos níveis foram estabelecidos e, na Tabela 3.4 apresentam-se os resultados do planejamento fatorial, onde G_3 , PS e EM representam os valores das variáveis codificadas pelas equações:

$$G_3 = \frac{\text{Glicose} - 12}{2} \quad PS = \frac{\text{Pep. Soja} - 2,5}{2,5} \quad EM = \frac{\text{Ext. Malte} - 1,5}{1,5} \quad (3.4)$$

e $Y_{X/S}$ representa a conversão de substrato em biomassa definida pela Equação 3.5 (item 3.7.2). A variável glicose, se analisada pela definição $Z_{X/S}$ (Equação 3.1), apresentaria efeitos negativos, e seria um equívoco provocado por outra variável não considerada no estudo: o pH. Neste planejamento (Experimento 3), os níveis mínimos para peptona de soja e extrato de malte foram zero, pois interessava verificar se o isolado necessitava realmente dos componentes orgânicos. Esses componentes exercem um certo tamponamento no pH do meio, e sua ausência nos ensaios 1 e 2 provocou uma queda muito brusca do pH, gerando um efeito negativo da glicose segundo a definição de $Z_{X/S}$, que desconsidera a glicose residual. Então, como resposta para este experimento, foi mais adequada a definição $Y_{X/S}$.

Tabela 3.4: Planejamento fatorial mostrando as variáveis estudadas com seus respectivos níveis codificados, e as respostas obtidas do Experimento 3 em cultivo estático de *P. microcarpus* em meio base L&A/K, na temperatura de 25 ± 1 °C.

ensaio	Variáveis independentes (níveis em g.L ⁻¹)			Níveis codificados das variáveis		
	Glicose	Pep. Soja	Ext. Malte	G ₃	PS	EM
1	10	0,0	0,0	-1	-1	-1
2	14	0,0	0,0	+1	-1	-1
3	10	5,0	0,0	-1	+1	-1
4	14	5,0	0,0	+1	+1	-1
5	10	0,0	3,0	-1	-1	+1
6	14	0,0	3,0	+1	-1	+1
7	10	5,0	3,0	-1	+1	+1
8	14	5,0	3,0	+1	+1	+1

(3) dados do Experimento 3.

De posse das respostas dos planejamentos fatoriais, poder-se-ia, também, escrever um modelo linear para descrever a dependência da conversão de substrato em biomassa em relação a alguma das variáveis estudadas. Este modelo poderia ser construído através de análise de regressão por mínimos quadrados. Deve-se salientar que planejamentos em apenas dois níveis constituem apenas uma etapa inicial das investigações, podendo um modelo linear ser até incorreto. Para saber mais a respeito das superfícies de resposta que serão apresentadas no próximo capítulo (por exemplo, concentrações ótimas para as variáveis analisadas), seria necessário realizar experimentos em maior número de níveis,

como os planejamentos em "estrela" (BARROS NETO *et al.*,1996). Os planejamentos fatoriais apresentados anteriormente são etapas de um processo de otimização.

3.6.4 Determinação de parâmetros cinéticos para crescimento de *P. microcarpus* em cultura estática

Um ensaio foi realizado para obtenção dos parâmetros cinéticos dentro das condições de cultivo mais utilizadas neste trabalho (frascos estáticos, item 3.2.2). O fungo foi inoculado na forma de discos de micélio em meio L&A/K líquido, e os dados de matéria seca, pH e glicose residual foram obtidos ao longo de 10 dias de cultivo, sendo as amostras destrutivas e em duplicata.

3.6.5 Ensaios em biorreator e estudos cinéticos da produção de inoculante de *P. microcarpus*

O fungo foi cultivado em biorreator *airlift* com circulação externa, nas condições descritas no item 3.2.2, e utilizando-se meios com base no L&A/K. O controle da pureza da cultura, com relação à presença de microrganismos contaminantes, foi realizado através da observação de amostras em microscópio ótico. A coloração, aspecto e presença de grampos de conexão nas hifas do fungo, foram informações utilizadas nesse controle.

3.6.6 Estudo da viabilidade do inoculante produzido em biorreator em plantas

3.6.6.1 Obtenção das plantas

As sementes de *E. dunnii* foram previamente desinfetadas em álcool (70%) e germinadas em uma solução não estéril de $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,068 g.L⁻¹), H_3BO_3 (0,168 g.L⁻¹) e glicose (2 g.L⁻¹), 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.

3.6.6.2 Substrato de plantio e inoculação

O substrato de plantio foi constituído de uma mistura de composto agrícola[‡] e vermiculita (30:70, v/v) previamente esterilizado (121 °C e 60 min), e distribuído em tubetes cônicos de plástico com 90 ml de volume. A esse substrato foi incorporado adubo de liberação lenta (Nutricote[®], 0,25 g/tubete) com baixo teor de fósforo, com a seguinte composição em nutrientes: 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. Após a distribuição nos tubetes e umidificação com água destilada, foi efetuado o plantio na proporção de 4-5 sementes pré-germinadas por tubete, colocadas cerca de 1 cm abaixo da superfície do substrato.

O inóculo foi testado em duas formas: suspensão de micélio fragmentado em água destilada e esterilizada, e micélio encapsulado em gel de alginato de cálcio (item 3.4.2). As proporções utilizadas foram: 1, 2 e 3 mL e 1, 3 e 5 *pellets* respectivamente por tubete, aplicado em cova a 1 cm de profundidade juntamente com as sementes. Após 2 semanas, foi feito o desbaste deixando-se somente 1 planta por tubete (Figura 3.7).

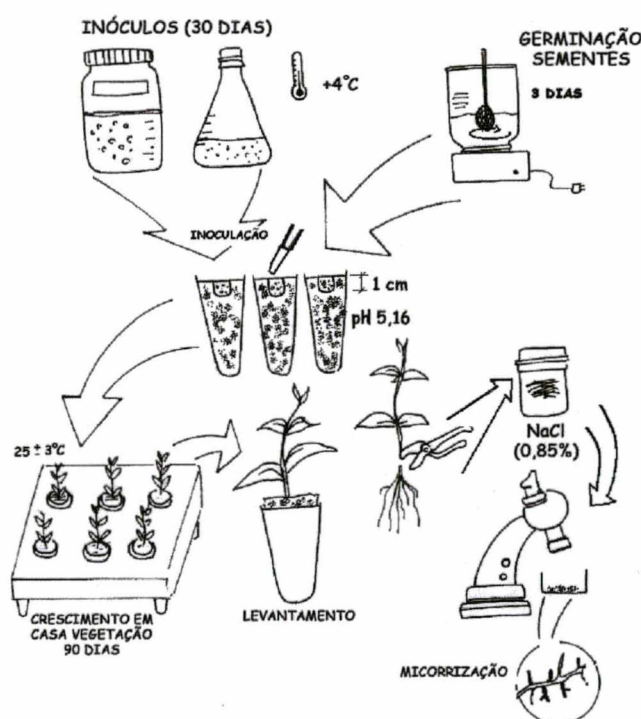


Figura 3.7: Metodologia de aplicação do inoculante ectomicorrízico em plantas de *E. dunnii*.

[‡] Produto preparado com casca de pinus, marca MECPLANT, fabricado por WOLFF KLABIN-PR

Foram feitas 8 repetições (plantas) por tratamento, perfazendo um total de 56 plantas (Figura 3.8).



Figura 3.8. Plantas de *Eucalyptus dunnii* inoculadas com *P. microcarpus* com 22 dias de idade, sob condições de casa de vegetação.

3.6.6.3 Condições experimentais e coleta dos dados

As plantas foram mantidas em casa de vegetação sob condições controladas de temperatura ($25\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 3$). A umidade do substrato foi assegurada pela adição diária de água destilada. Após 90 dias, as plantas foram retiradas dos tubetes e o sistema radicular separado da parte aérea. Em seguida, foi colocado em solução salina (0,85% NaCl) e utilizado para verificar a ocorrência de colonização ectomicorrízica.

3.7 Métodos analíticos

3.7.1 Obtenção de amostras de cultura de *P. microcarpus*

Para os cultivos realizados em frascos, foram utilizadas amostras destrutivas compostas pelo conteúdo total dos frascos, em duplicatas e triplicatas. Em alguns casos, foram retiradas alíquotas assepticamente para determinação do pH e da glicose residual. Para cultivos em biorreator, duas amostras de aproximadamente 25 mL foram retiradas no instante zero, para determinação da biomassa inicial (X_0), e as demais amostras foram coletadas com volumes de aproximadamente 7 mL, em períodos que variaram de 12 a 26

horas, para determinação de pH e glicose residual. Um pequeno volume sempre foi desprezado antes da amostragem para limpar o meio de cultura estagnado no trajeto do dosador.

3.7.2 Determinação da biomassa em cultura líquida de *P. microcarpus*

Para os cultivos realizados em frascos erlenmeyers, nas condições descritas no item 3.2.2, a concentração celular foi determinada através da massa seca: amostras de volume conhecido foram filtradas em papel filtro (secados a 75 °C durante 48 horas e pesados previamente), lavadas com iguais volumes de água destilada e secadas a 75 °C até peso constante (48 horas). A massa seca foi, então, determinada pela diferença de peso.

Para as fermentações no biorreator, não foi possível medir a massa seca diretamente nas amostras e, na falta de correlação, foi utilizada a seguinte alternativa:

- Desde que as condições não sejam alteradas significativamente ao longo de um cultivo, a conversão $Y_{X/S}$ deve se manter constante. Isso permite calcular os valores de biomassa (X) a partir de um dado valor inicial (X_0 por exemplo), desde que se conheça o correspondente consumo de substrato em um dado período de tempo e, obviamente, o valor de $Y_{X/S}$ (NETTO, 1999).

Esta possibilidade é particularmente interessante para os casos de difícil acesso aos valores de X , como é o caso de fungos filamentosos, e também em processos de tratamento de resíduos.

Equacionando a definição de conversão, Equação 3.6, temos:

$$Y_{X/S} = \frac{dX}{-dS} \quad \text{ou,} \quad X = X_0 + Y_{X/S}S_0 - Y_{X/S}S \quad (3.5)$$

Onde: X = concentração de biomassa ao longo do cultivo (g.L^{-1});

X_0 = concentração inicial de biomassa (g.L^{-1});

S = concentração de glicose ao longo do cultivo (g.L^{-1});

S_0 = concentração inicial de glicose (g.L^{-1}).

De posse dos valores de X_0 , X , S_0 e S_f , determinou-se o valor da conversão $Y_{X/S}$. Então, com os valores de $Y_{X/S}$, X_0 , S_0 e, os valores S ao longo do cultivo, utilizando a Equação 3.5, determinaram-se os valores da biomassa durante o cultivo.

3.7.3 Determinação da biomassa viável em suspensão miceliana de *P. microcarpus*

Para determinar a biomassa inicial (X_0) de *P. microcarpus* nas fermentações no *airlift*, foi necessário corrigir a biomassa obtida através da massa seca, pois o inóculo produzido através da fragmentação do micélio perde parte de sua viabilidade devido aos danos causados pelas lâminas do fragmentador em alta velocidade [cf. item 4.1 (b)]. Assim, foi fundamental corrigir os valores da biomassa inicial para estimar, com maior precisão, os dados de crescimento e calcular os parâmetros cinéticos.

A viabilidade do material fragmentado foi determinada por meio de coloração com Cloreto de Trifenil Tetrazolium (CTT) (BENSON, 1994). 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, adicionaram-se 3 mL do reagente CTT (6 g.L⁻¹ de CTT em 0,05 M Na₂HPO₄/KH₂PO₄ tamponado em pH 7,4 + 0,5 mL.L⁻¹ de Tween 80) a 50-100 mg de micélio em tubos de 20 mL de capacidade, retirado das bordas de colônias obtidas em meio MNM sólidos (7 – 8 dias). Em seguida, infiltrou-se o reagente sob vácuo por 10-15 minutos, e incubaram-se as amostras a 28 °C durante a noite – estes foram considerados padrões com 100% de viabilidade.

Em conjunto, repetiu-se o procedimento descrito acima, substituindo-se o micélio jovem obtido em meio sólido, por micélio fragmentado em liquidificador industrial, obtido através da metodologia já descrita no item 3.4.1. No dia seguinte, foram adicionados 7 mL de etanol (95%) por tubo e foi extraído o complexo avermelhado formado, fervendo-se em banho-maria por 4 minutos. As amostras de micélio foram filtradas em papel filtro, lavadas e secadas a 75 °C durante 48 horas para determinar a matéria seca. A absorbância do complexo avermelhado foi determinada a 490 nm. Os valores das amostras fragmentadas foram confrontadas com os valores padrão e a viabilidade foi expressa em g de micélio viável.g de matéria seca⁻¹.

3.7.4 Determinação da concentração de glicose em cultivo de *P. microcarpus*

A concentração de glicose das amostras de cultivo de *P. microcarpus* foi determinada pelo método enzimático GOD fundamentado na clássica reação de Trinder (TRINDER, 1969) envolvendo a oxidação da D-glicose, pela glicose oxidase, a ácido glucônico e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio, na presença da 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 da glicose na amostra, podendo ser medida por espectrofotometria.

Foram utilizados "kit"-testes comerciais EnzColor[®] da Biodiagnóstica Indústria Química Clínica Ltda, e a absorvância foi determinada a 500 nm.

3.8 Determinação de parâmetros cinéticos

3.8.1 Conversão de substrato em biomassa

A conversão de substrato em biomassa, é definida da seguinte forma:

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad (3.6)$$

Onde: X_0 = concentração inicial de biomassa (g.L^{-1});

S_0 = concentração inicial de glicose (g.L^{-1}).

X = concentração de biomassa ao longo do cultivo (g.L^{-1})

S = concentração de glicose ao longo do cultivo (g.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 definição desta grandeza é de grande utilidade, principalmente pela dificuldade em determinar a curva de biomassa diretamente, pois desde que as condições não sejam alteradas significativamente ao longo do cultivo, $Y_{X/S}$ deve ser constante. Neste caso, pode-se calcular os valores de X a partir de um dado valor inicial, desde que se conheça o consumo de substrato e o valor a ser assumido por $Y_{X/S}$, que neste estudo considerou-se o valor da conversão global $Y'_{X/S}$, Equação 3.6.

$$Y'_{x/s} = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_f} \quad (3.7)$$

Onde: X_f = concentração final de biomassa (g.L^{-1});

S_f = concentração final de glicose (g.L^{-1});

3.8.2 Velocidade específica de crescimento miceliano

Dispondo do conjunto de dados experimentais S em função do tempo pode-se, determinar a velocidade de consumo do substrato, a qualquer instante da fase de crescimento, através do coeficiente angular da tangente à curva:

$$r_s = \frac{-dS}{dt} \quad (3.8)$$

Esta velocidade é, no entanto, função da quantidade de micélio presente, ou seja, podem-se ter altos valores para r_s em virtude de no sistema existirem altos valores de X , que é o responsável pelo fenômeno biológico de crescimento (NETTO, 1999). Por esta razão, o estado em que se encontra o sistema é melhor definido pela velocidade específica de consumo do substrato e, do mesmo modo, a velocidade específica de crescimento das hifas:

Assim,

$$\mu_s = \frac{-1}{X} \cdot \frac{dS}{dt} \quad \text{e,} \quad (3.9)$$

$$\mu_x = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (3.10)$$

As velocidades específicas representam as velocidades anteriormente definidas por unidade de concentração celular, e têm como dimensão [tempo^{-1}], desde que S e X estejam expressas em g.L^{-1} . Ao representar a fase de crescimento exponencial em gráfico semilogarítmico, os dados experimentais devem se alinhar. Então, representando dados em

um gráfico $\ln(X)=f(t)$, os coeficientes angulares das tangentes à curva em qualquer instante seriam:

$$\frac{d \ln(X)}{dt} = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} = \mu_X \quad (3.11)$$

Assim, durante a fase exponencial, μ é constante e apresenta seu valor máximo (μ_M^{\S}). Desta forma, quando a biomassa estiver aumentando exponencialmente temos, segundo a integração da Equação 3.9, considerando $\mu_X = \text{cte.} = \mu_M$:

$$X = X_{0i} \cdot e^{\mu_M(t-t_i)} \quad (3.12)$$

Sendo: X_{0i} = biomassa no início da fase exponencial (g.L^{-1})
 t_i = tempo inicial = 0

Reescrevendo a equação acima:

$$\ln X = \ln X_{0i} + \mu_M \cdot t \quad (3.13)$$

Assim, podemos também obter o tempo necessário para duplicar X_{0i} :

$$t_{\text{dup}} = \frac{\ln 2}{\mu_M} \quad (3.14)$$

3.8.3 Produtividade total

A produtividade total é definida da seguinte forma:

$$P_{\text{total}} = \frac{(X_f - X_0)}{t_f} \quad (3.15)$$

Onde: X_0 = biomassa no início do cultivo (g.L^{-1});

X_f = biomassa final obtida (g.L^{-1});

t_f = tempo gasto durante o cultivo (dia)

P_{total} : ($\text{g.L}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$).

[§] Obs.: O valor de μ_X é o máximo para as condições do experimento, o que não implica que seja o máximo para o microrganismo.

3.9 Análises estatísticas

3.9.1 Planejamentos fatoriais

Os dados dos planejamentos fatoriais, foram analisados através da Análise de Projeto Fatorial com fatores em dois níveis (BOX *et al*, 1978), utilizando o programa Statistica[®] (StatSoft[™]). Determinou-se o efeito das variáveis concentração de glicose, extrato de levedura, extrato de malte e peptona, na produção de biomassa e avaliou-se sua significância estatística através do teste **t** e **nível p**.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Estudos preliminares

a) Informações preliminares de cultivo e correlação com a biomassa:

Nos cultivos em frascos, percebeu-se que a oxigenação é muito limitada, e sob agitação, o micélio ficava molhado, compactava-se e submergia, dificultando ainda mais a transferência de oxigênio para as células, além de sofrer efeitos maiores do abaixamento do pH, devido ao maior contato entre as hifas e o líquido. Este efeito foi significativo para o caso de inóculo fragmentado e utilizado na forma de suspensão miceliana em cultivos estáticos, pois os fragmentos ficavam umedecidos, adquirindo uma densidade maior que a do meio e submergiam. Isto ocorreu menos quando se utilizaram discos de micélio, onde a trama de hifas funcionou como uma bóia na superfície líquida do meio.

Sob condições de agitação (70 rpm) e sem controle da temperatura, utilizando-se o meio MNM, a produção de biomassa foi de $2,0 \text{ g.L}^{-1}$, a conversão de substrato em biomassa da ordem de $0,31 \text{ g.g}^{-1}$ e a velocidade específica máxima de $0,11 \text{ dia}^{-1}$. O tempo de cultivo foi de mais de 3 semanas, com queda acentuada de pH, até cerca de 2,5. A Figura 4.1 representa as curvas de produção de biomassa, consumo de glicose e pH, referente a estes resultados, onde se percebe a limitação de crescimento, tipicamente provocada por algum substrato fornecido a uma velocidade constante.

O fungo cresceu na forma de *pellets* densos e esféricos devido à agitação. Como esta forma de aeração é muito ineficiente e, somando-se esta ineficiência com as resistências ao transporte de oxigênio provocadas pelos próprios *pellets*, possivelmente o substrato limitante foi o oxigênio. Reforçando esta hipótese, o meio sendo complexo continha micro-elementos essenciais ao crescimento. Já o pH estabilizou quando somente metade da biomassa havia sido produzida, sugerindo que este fator não teve efeito inibitório.

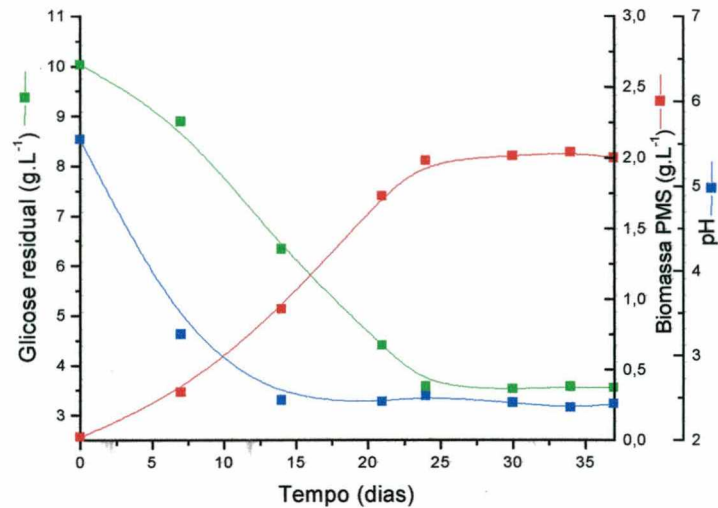


Figura 4.1. Consumo de glicose, produção de biomassa e variação do pH, em cultura de *P. microcarpus* sob condições de agitação (70 rpm) em meio MNM, sem controle da temperatura.

Cabe salientar que a presença de correlação entre a condutividade elétrica com a produção de biomassa apresentou elevada dependência com o pH. Percebe-se nas Figuras 4.2 e 4.3b, que a condutividade elétrica mantém um comportamento similar à concentração de biomassa somente enquanto o pH esteve acima de 2,5 nos primeiros 15 dias de cultivo. Quando o pH começa a ser tamponado pelas próprias condições do meio, com a remoção dos prótons o padrão de condutividade se altera significativamente.

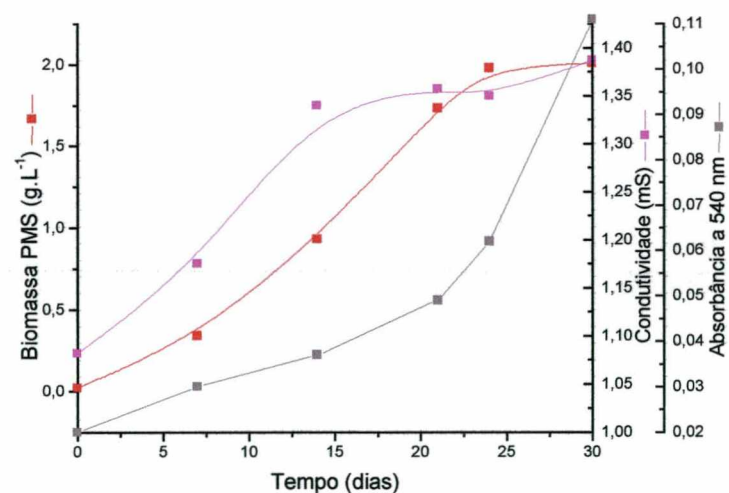


Figura 4.2. Produção de pigmentos e condutividade elétrica (em mili Siemens), em cultura de *P. microcarpus* sob condições de agitação (70 rpm) em meio MNM, sem controle da temperatura.

Entretanto, curva do índice de absorvância (relacionada com os pigmentos liberados no meio de cultura) apresentou uma correlação mais adequada com a variação da biomassa, podendo vir a ser uma ferramenta alternativa para medida de biomassa em estudos com fungos ectomicorrízicos (Figura 4.3a). Neste trabalho, esta correlação não foi utilizada, pois houve precipitação dos pigmentos no biorreator, provocada pelo abaixamento do pH, alterando o padrão da correlação. Através de um teste com uma amostra do extrato, adicionando-se uma base, os pigmentos voltaram a se dissolver no meio, demonstrando ser o pH a causa da precipitação dos pigmentos.

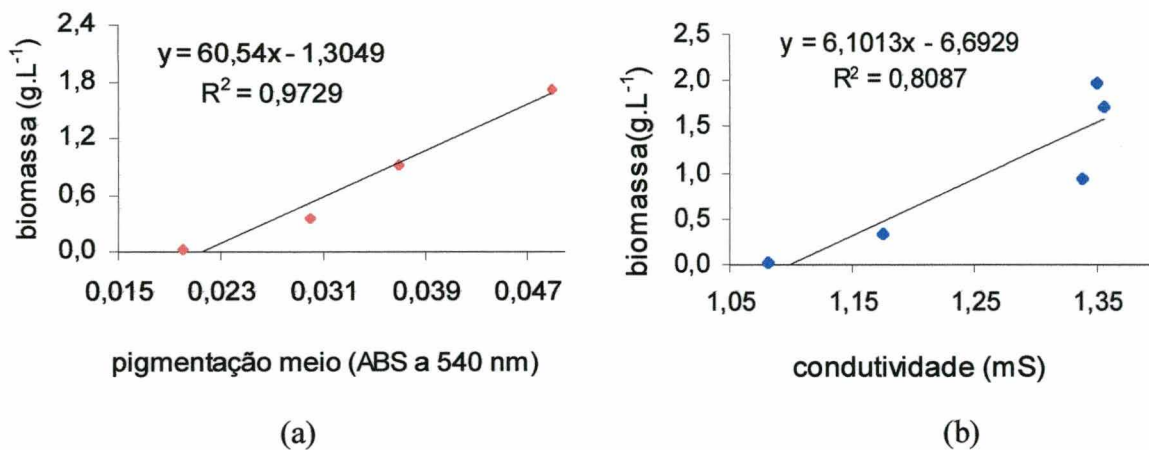


Figura 4.3. Correlação entre biomassa e pigmentos liberados no meio (a), e entre biomassa e condutividade elétrica (b), em cultura de *P. microcarpus* sob condições de agitação (70 rpm), sem controle de temperatura.

Em cultura estática com meio líquido, o fungo cresceu na forma de tapetes miceliais na superfície do meio de cultura (meio MNM). As hifas espalharam-se espacialmente para captar o oxigênio disponível no ar do interior do frasco. E nas condições de incubação (item 3.2.2), no escuro e onde foi possível controlar a temperatura, a biomassa cresceu mais rapidamente do que nas condições de agitação estudadas. Entretanto, surgiu a necessidade de um estudo de meios e de formas de tamponamento, devido à dificuldade de se exaurirem as fontes de carbono.

b) Formas de preparo do inóculo:

O objetivo da fragmentação é a homogeneização do micélio, que proporciona um grande número de partículas micelianas e um grande número de pontos de crescimento

(STANBURY *et al*, 1995), mas por outro lado, parte de sua viabilidade é perdida, devido aos danos provocados pelas lâminas do homogeneizador. Em síntese, suspensões micelianas foram adequadas apenas em processos aerados, conforme já foi discutido no item (a). A utilização de micélio cultivado em meio sólido aumentou os riscos de contaminação e dificultou a medida da biomassa inicial (X_0), pela presença de resíduos de ágar nas amostras. O grau de fragmentação do micélio deve ser avaliado para cada tipo de homogeneizador utilizado, pois depende muito do tipo de lâmina e velocidade (rpm) do aparelho.

Por essas razões, utilizaram-se nos estudos posteriores discos de micélio obtidos em meio sólido, para inocular o meio líquido em cultura estática. O micélio obtido em meio líquido em cultura estática, e fragmentado em liquidificador industrial, para inocular o biorreator. Foi estabelecido o tempo de fragmentação de 6-7 segundos, pois foi aquele que permitiu produção de partículas menores que 3 mm e ainda viáveis (Figura 4.4). Fragmentos maiores provocaram problemas de entupimento no coletor de amostra do biorreator, além de reduzir o número de pontos de crescimento.

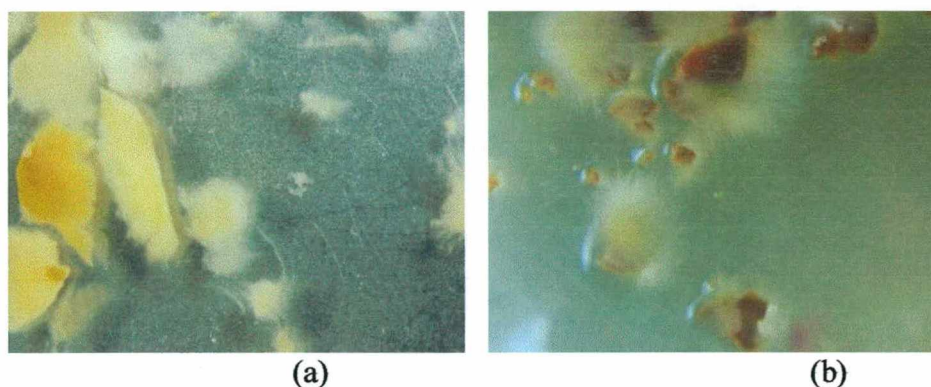


Figura 4.4. Aspecto do micélio fragmentado de *P. microcarpus*, utilizado na forma de suspensão miceliana para inocular o *airlift* (a); Fragmentos viáveis (b). (aumento de 60 x)

4.1.1 Determinação da biomassa viável em suspensão miceliana de *P. microcarpus*

Os ensaios para determinar a biomassa viável dos inóculos, preparados através de fragmentação de micélio de cultura estática em meio líquido (item 3.7.3), permitiram quantificar os danos causados ao micélio do fungo pelas lâminas do homogeneizador. Apenas 56,86% da biomassa apresentaram-se viáveis após a fragmentação.

Este valor foi aplicado sobre a biomassa seca das amostras iniciais dos ensaios em biorreator, para determinar com mais precisão o valor de X_0 responsável pelo processo biológico.

Neste ponto, é importante perceber o quanto a metodologia de preparo de inóculo precisa evoluir, principalmente para aplicação em processos industriais. É necessário aplicar esforços no sentido de desenvolver uma tecnologia de preparo de inóculo para fungos ectomicorrízicos onde não seja necessária a etapa de fragmentação, visto o quanto são prejudiciais ao material biológico as forças cisalhantes das lâminas do fragmentador.

4.2 - Estudo sobre o efeito da composição do meio de cultura no crescimento de *P. microcarpus*

Em função dos ensaios serem destrutivos e demorados, não foi possível construir curvas tradicionais de cultivo para se avaliar um grande número de fatores, sendo avaliado apenas o resultado final de biomassa e conversão global; não foi possível determinar a velocidade de crescimento nestes estudos. As modificações testadas, utilizando o meio MNM como base, e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Biomassa de *P. microcarpus*, glicose residual, pH e conversão ($Y_{X/S}$), ao final de 10 e 25 dias de cultivo em cultura estática, sob condições controladas de temperatura a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, em diversas modificações do meio MNM.

Ensaio	Variações de meios	C/N (g/g)	10 dias de cultivo				25 dias de cultivo			
			Biom. (g.L ⁻¹)	Glic. res. (g.L ⁻¹)	pH _f	$Y_{X/S}$	Biom. (g.L ⁻¹)	Glic. res. (g.L ⁻¹)	pH _f	$Y_{X/S}$
1	MNM+micro	50/1	2,15	7,23	3,08	0,45	3,64	1,32	2,91	0,34
2	MNM+3EL	5,6/1	1,68	7,10	4,73	0,34	3,84	1,18	3,97	0,35
3	MNM-3EM+3EL	4,5/1	0,88	10,20	4,86	0,49	4,34	0,55	3,48	0,38
4	MNM A/C	50/1	2,27	8,00	3,93	0,57	4,50	1,60	3,23	0,43
5	MNM A/C 5G*	30/1	1,96	3,42	4,25	0,76	2,81	0,06	2,87	0,47
6	MNM A/C 0,62N*	20/1	3,52	7,00	4,95	0,70	5,02	1,20	3,16	0,46
7	MNM 5G*	30/1	1,45	2,92	3,48	0,47	2,52	0,06	3,39	0,42
8	MNM A/C+micro	50/1	2,09	8,00	4,56	0,52	3,72	1,51	3,47	0,35
9	MNMA/C 7,5G*+EDTA	40/1	0,72	7,16	4,22	0,54	1,14	4,07	4,50	0,23
10	MNM 0,31N*	40/1	1,60	8,00	2,88	0,40	3,19	1,06	2,73	0,29
11	MNM(MARX,1969)	50/1	1,47	8,50	3,07	0,42	4,48	1,56	2,84	0,43

* (xG = x g.L⁻¹ de glicose; yN = y g.L⁻¹ (NH₄)₂HPO₄)
pH_i = 5,8 antes da autoclavagem.

As Figuras 4.5 e 4.6 mostram os resultados após 10 e 25 dias de cultivo, respectivamente. Aos 10 dias de cultivo, nenhum tratamento foi eficiente na exaustão da glicose, e aos 25 dias a maioria dos tratamentos ainda continha altos valores de glicose residual. Entretanto, o ensaio 6 (MNM A/C 0,62N), tamponado e com baixa relação C/N, apresentou o melhor desempenho em conversão e uma produção de biomassa bastante significativa (5 g.L⁻¹).

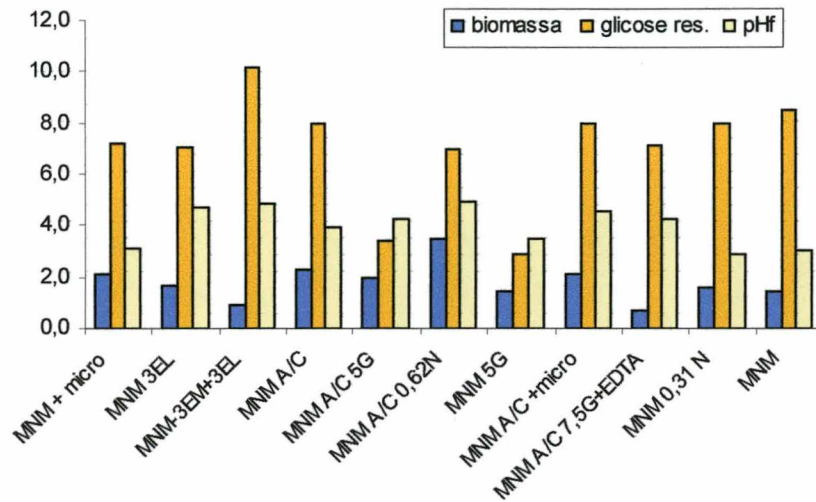


Figura 4.5. Biomassa (g.L⁻¹), glicose residual (g.L⁻¹) e pH ao final de 10 dias de cultivo de *P. microcarpus*, sob condições estáticas a 25 °C, para as diversas modificações de meio de cultura.

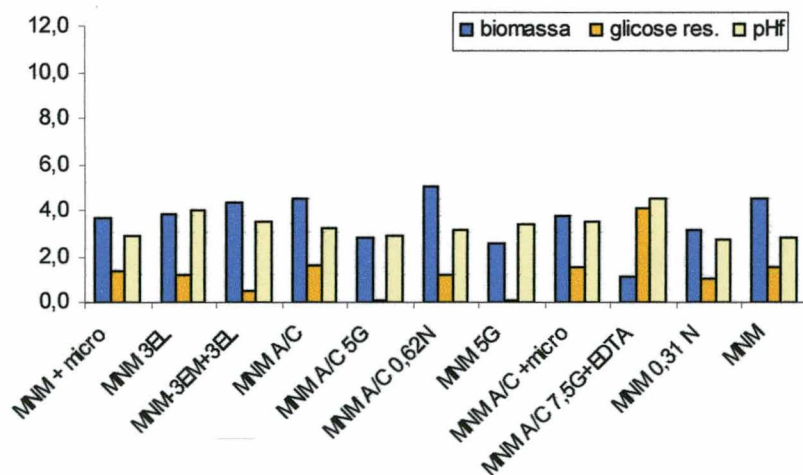


Figura 4.6. Biomassa (g.L⁻¹), glicose residual (g.L⁻¹) e pH ao final de 25 dias de cultivo de *P. microcarpus*, sob condições estáticas a 25 °C, para as diversas modificações de meio de cultura.

Por outro lado, a presença de glicose residual e o tempo de cultivo de 25 dias ou mais, mostraram-se insatisfatórios para o interesse do projeto, pois a glicose residual representa

um risco de contaminação do inoculante, além de significar um segundo substrato limitante no meio de cultura. Neste ponto, é que iniciaram-se os estudos também utilizando o meio base de L&A/K, pois o meio MNM apresentou-se desbalanceado para o fungo.

A adição de solução de micronutrientes (MNM+micro) ajudou a produzir mais biomassa durante os primeiros 10 dias de cultivo, mas não melhorou o resultado final aos 25 dias. O EDTA, usado para estabilizar os íons metálicos, apresentou efeito inibidor.

Nos ensaios 5 e 7, diminuiu-se a relação C/N, diminuindo-se metade da fonte de carbono, obtendo-se bons valores de conversão. Isto ocorreu possivelmente porque menos carbono para metabolizar significa menos catabólitos no meio, e também menor queda do pH. Entretanto, estas composições implicariam em baixos rendimentos para os equipamentos, pois o tempo de cultivo necessário para consumir toda a glicose não diminuiu em relação aos demais tratamentos.

A solução A/C* utilizada para corrigir o pH inicial, melhorou a produção de biomassa (ensaios 4, 5, 6 e 8), comparando-se com o ensaio controle 11 e o ensaio 1. Já a adição de extrato de levedura (EL) e a substituição do extrato de malte por EL (ensaios 2 e 3), pioraram os resultados de produção de biomassa. Diminuir a relação C/N, aumentando a fonte de N (ensaio 10), mas sem tampão A/C, não melhorou a produção de biomassa. Os melhores resultados obtidos de produção de biomassa e conversão final foram os ensaios com relação C/N de 30/1 e 20/1.

É possível perceber, confrontando-se as Figuras 4.5 e 4.6, que os tratamentos com EL (ensaios 2 e 3 da Tabela 4.1) apresentaram uma produção de biomassa baixa nos primeiros 10 dias de cultivo, mas ao longo de mais 15 dias houve uma boa recuperação da produção, sugerindo uma adaptação do fungo às condições adversas do meio. Entretanto, em termos de resultados, isso não ajuda muito, pois uma fase de adaptação, além de representar mais tempo de cultivo, também consome parte da energia disponível para a produção de biomassa, resultando em conversões mais baixas (0,35 e 0,38 g.g⁻¹ comparado com 0,43 g.g⁻¹ da testemunha MNM). É interessante ressaltar que os meios nesses ensaios apresentaram uma coloração mais intensa (Figura 4.7) devido, possivelmente, à maior produção de metabólitos.

Os resultados obtidos de outras modificações dos meios MNM e L&A/K, são apresentados na Tabela 4.2. Das novas formulações estudadas, a L&A/K e L&A/KM₁ foram as que permitiram a exaustão completa da glicose; e o pH atingiu valores finais

* Solução 0,1 M de ácido cítrico+acetato de sódio

semelhantes ao das outras formulações. Os ensaios duraram 12 dias, tempo suficiente para consumir toda a fonte de carbono dos meios com base em L&A/K.

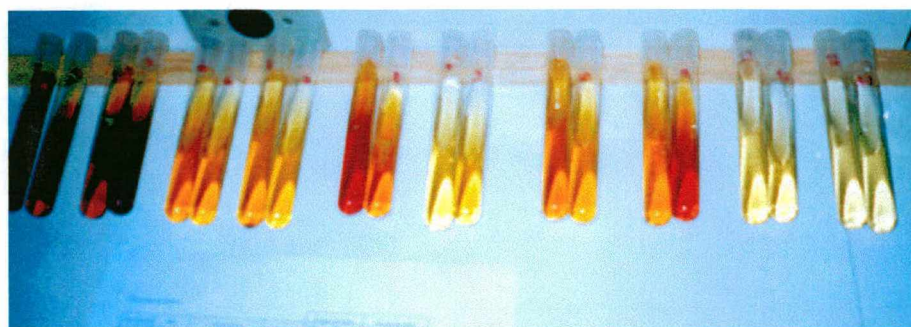


Figura 4.7. Extratos de ensaios de cultivo em frascos estáticos para estudo de meios.

Tabela 4.2: Biomassa de *P. microcarpus*, glicose residual, pH e conversão ($Y_{X/S}$), ao final de 12 dias de cultivo em cultura estática, sob condições controladas de temperatura a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, em diversas modificações dos meios MNM e L&A/K.

Ensaio	Variações de meios testadas	Relação C/N	Biomassa (g.L^{-1})	Glic.res. (g.L^{-1})	pH _i	pH _f	$Y_{X/S}$ (g.g^{-1})
12	L&A/K	5/1	5,20	0,03	5,80	2,73	0,44
13	L&A/KM ₁	7/1	4,71	0,00	5,80	2,61	0,43
14	MNM (MARX, 1969)	50/1	1,79	7,14	5,80	2,80	0,46
15	MNM+vit	50/1	2,37	4,46	5,80	2,47	0,36
16	MNM+micro 0,4N*	30/1	2,50	5,11	5,80	2,77	0,42
17	MNM+1EL+micro	14/1	3,92	2,81	5,90	3,10	0,48
18	MNM+1EL	14/1	3,40	3,41	5,90	3,12	0,45
19	MNM 0,62N*	20/1	2,08	4,14	5,90	2,45	0,30

L&A/KM₁: 2 g.L^{-1} peptona, 0,5 g.L^{-1} de extrato de levedura, 0,8 g.L^{-1} NH_4NO_3 e demais condições iguais ao meio L&A/K.

* xN = x g.L^{-1} da fonte de nitrogênio $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, para modificar a relação C/N indicada.

Das novas modificações testadas, obtiveram-se as seguintes informações:

- Nos ensaios 17 e 18, a adição de 1 g.L^{-1} de extrato de levedura (EL) ao meio MNM melhorou a produção de biomassa em relação ao controle (ensaio 14). Nota-se que os pH_f foram os mais altos de todos os ensaios e, possivelmente, uma diminuição da queda do pH provocado pela adição de EL, seja o responsável pela melhora;

- A adição de vitaminas e micronutrientes (ensaios 15 e 16) trouxe pequena contribuição na produção de biomassa, significando que não são estes os fatores de crescimento que estão faltando ao meio;
- Quando compara-se o ensaio 19 (Tabela 4.2) com o 6 (Tabela 4.1), percebe-se que o efeito na produção de biomassa é devido à adição de tampão A/C e não à redução da relação C/N pelo aumento de $0,37 \text{ g.L}^{-1}$ da fonte de nitrogênio ($0,62\text{N}$);
- Os resultados dos meios baseados no meio de L&A/K (ensaios 12 e 13; Figura 4.8) superaram todos os resultados dos estudos com base no meio MNM. Os valores de glicose residual desses tratamentos já haviam atingido o valor zero no décimo dia de cultivo, apesar de o experimento ter sido conduzido durante 12 dias.
- De forma geral, o pH tende a estabilizar-se quando atinge um mínimo próximo a 2,5. Verificou-se que adicionando-se progressivamente solução de ácido oxálico $0,1 \text{ M}$ ao meio MNM, após o pH atingir 2,32, o meio resistiu a grandes volumes de ácido sem alterar o pH, significando que esta é uma característica do meio e não de alguma alteração provocada pelo cultivo.

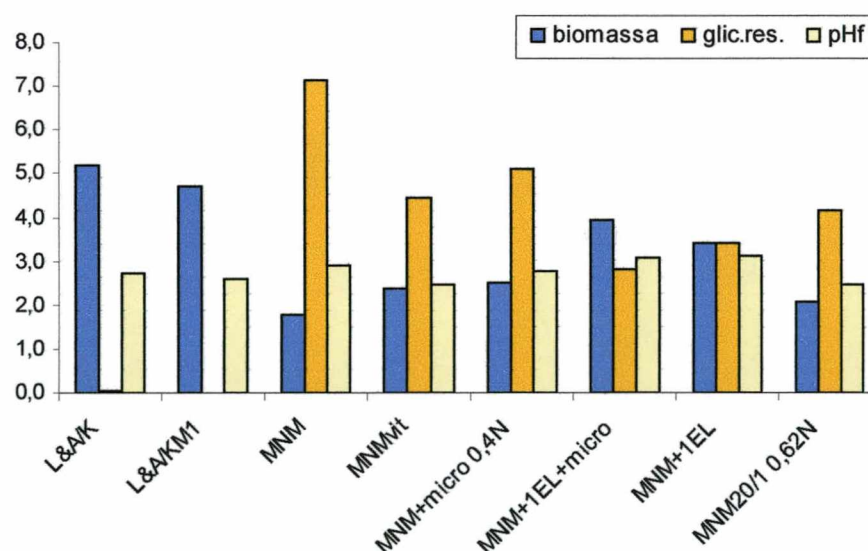


Figura 4.8. Biomassa produzida (g.L^{-1}), glicose residual (g.L^{-1}) e pH ao final de 12 dias de cultivo de *P microcarpus*, sob condições estáticas e a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, para as diversas modificações de meio de cultura.

As vantagens relatadas por PRADELLA *et al.* (1991a.), relacionadas à introdução de extrato de levedura (EL) no meio MNM, não se confirmaram neste estudo. Embora o EL

ajude a estabilizar o pH, não foi possível comprovar seu papel como fator de crescimento para o fungo sugerido por esses autores. Observando-se os resultados desses autores, percebe-se que enquanto o pH mantém-se acima de 3 nos primeiros 20 dias, não existe muita diferença entre os tratamentos, e percebe-se uma grande dificuldade do fungo crescer. Pela experiência adquirida neste trabalho em relação à forma do inóculo, é possível inferir que se trata de uma inibição por falta de oxigênio, provocada pela utilização de inóculo na forma de suspensão miceliana, que é inadequado em ensaios estáticos [ver item 4.1 (a)]. Como os tratamentos utilizando EL ajudam a estabilizar o pH, eles acabam se sobressaindo em relação aos demais, mas isto poderia ser obtido simplesmente pela adição de um agente tampão, que é mais correto e barato. Ainda no mesmo estudo da influência do EL, PRADELLA *et al.* (1991a) comentam que acima de 5 g.L⁻¹ de EL no meio MNM, passam a ocorrer atenuações do crescimento. Poder-se-ia dizer que o efeito positivo no controle do pH passa a ser superado pelo efeito deletério promovido por algum fator do complexo EL. Esta discussão fez-se necessária porque muito esforço foi dispendido em testes com EL, sem resultados satisfatórios em relação ao crescimento do fungo.

Os diversos tratamentos estudados (Tabelas 4.1 e 4.2) provocaram diferenças na produção de metabólitos, que podem ser percebidas pelas diferentes colorações do extrato de cultura (Figura 4.7). As diferentes colorações do extrato de cultura não apresentaram uma relação direta com a produção de biomassa, mas, em alguns casos, a pigmentação mais intensa foi observada nos tratamentos com menor produção de biomassa, embora os tratamentos com pigmentação mais clara não tenham sido aqueles com melhor produção de biomassa. Isso sugere, que a maior pigmentação é indicativo de mudança da via metabólica do fungo. Na Figura 4.2 nota-se que a maior produção de pigmentos ocorreu após a inibição do crescimento.

Assim, o meio MNM apresentou-se desbalanceado para o isolado UFSC-Pt 116, necessitando-se de novos estudos nutricionais, inclusive variando-se e/ou substituindo-se outros componentes do meio. Por outro lado, o meio L&A/K mostrou-se eficiente para produção de biomassa do fungo fECM, devendo ser estudado no sentido de diminuir seu custo, principalmente quanto à peptona bacteriológica, que tem preço bastante alto. Os meios estudados necessitam de tamponamento e o tampão A/C é uma boa opção. Entretanto, o extrato de levedura, apesar de ajudar a tamponar o meio, apresentou efeitos contrários aos sugeridos pela literatura.

4.3 - Simplificação do meio de cultura utilizando Planejamento Fatorial

Como mencionado no capítulo 3, o objetivo desses planejamentos fatoriais foi de simplificar e reduzir os custos do meio de cultura que forneceu melhor resultado em produtividade no estudo de composição de meios (meio L&A/K). E devido às dificuldades de se trabalhar com muitas variáveis, estudaram-se os componentes de maior custo na formulação: peptona bacteriológica (US\$ 126, o Kg), peptona soja (US\$ 56, o Kg), extrato de levedura (US\$ 33, o Kg) e extrato de malte (US\$ 30 o Kg). Aumentou-se em 40% o teor de glicose, para verificar se o meio apresentava outro substrato limitante dentro dessa faixa de concentração da fonte de carbono, e também para verificar a possibilidade de aumentar o rendimento das bateladas de fermentação.

A Figura 4.9 apresenta as respostas obtidas nesses experimentos, que foram submetidas ao cálculo dos efeitos das variáveis estudadas.

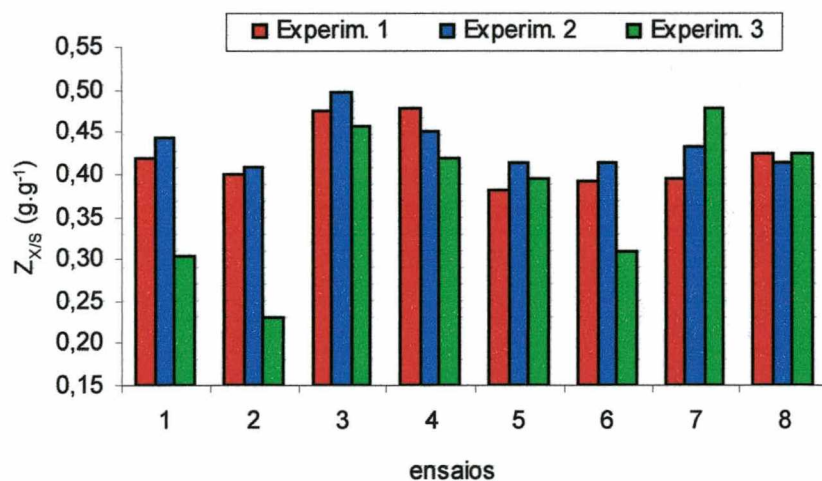


Figura 4.9. Respostas dos experimentos com planejamento fatorial.

Nas Tabelas 4.3, 4.4 e 4.6 apresentam-se a estimativa dos efeitos, os coeficientes de ajuste para modelos, os valores do teste **t** e do nível **p** dentro de um intervalo de confiança de $\pm 95\%$.

Os valores em destaque (cor vermelha) correspondem aos efeitos significativos das variáveis sobre a produção de biomassa segundo o nível **p**. As cartas de Pareto (Figuras 4.10, 4.12 e 4.14) permitem visualizar melhor esta afirmação, onde os valores à direita da linha vertical tracejada, são aqueles estatisticamente significativos. Na sequência, são apresentados os efeitos das variáveis estudadas na produção de biomassa, nos três experimentos realizados.

a) Experimento 1

Analisando-se os efeitos das variáveis estudadas sobre a produção de biomassa (Tabela 4.3), percebe-se que a variável concentração de glicose (G_1) não influenciou significativamente a conversão, pois o aumento de 40% do teor de glicose, mantendo constantes os demais componentes do meio, não ocorreu uma queda na conversão. Embora isso pudesse provocar desbalanceamento da formulação, gerar maior acúmulo de metabólitos no meio ao longo do cultivo e aumentar a demanda de oxigênio. Os resultados mostram, assim, que é possível aumentar o rendimento de um cultivo, sem prejudicar a conversão, aumentando somente a fonte de carbono. Outro ponto que corrobora esta questão, é o fato importante de a forma de crescimento do fungo em *pellets* mais compactos permitir um volume maior de biomassa dentro do biorretor, sem dificultar a circulação de líquido. Para ilustrar, um ensaio no *airlift* com 10 g.L^{-1} de glicose inicial, onde ocorreu contaminação com *Penicillium* sp., mostrou que devido aos *pellets* serem menos compactos, ocupando um volume específico maior dentro do biorreator, já apresentava uma certa dificuldade de circulação de líquido por falta de espaço interno.

Tabela 4.3: Estimativa dos efeitos principais e de interação de segunda ordem, valores dos testes estatísticos e coeficientes de correlação para o Experimento 1, usando uma simplificação do meio L&A/K, em cultivo de *P. microcarpus* sob condições estáticas e a 25 °C.

	Efeitos	Desvio Padrão	t(1)	p	Limite conf. -95,%	Limite conf. +95,%	Coef. Coef.	Coef. Desvio Padrão
Média/Inter.	0,42000	0,00050	840,000	0,00076	0,41365	0,42635	0,42000	0,00050
(1) G_1	0,00450	0,00100	4,5000	0,13921	-0,00821	0,01721	0,00225	0,00050
(2) P_1	0,04500	0,00100	45,000	0,01415	0,03229	0,05771	0,02250	0,00050
(3) EL_1	-0,04450	0,00100	-44,500	0,01430	-0,05721	-0,03179	-0,02225	0,00050
1 por 2	0,00950	0,00100	9,500	0,06677	-0,00321	0,02221	0,00475	0,00050
1 por 3	0,01500	0,00100	15,000	0,04238	0,00229	0,02771	0,00750	0,00050
2 por 3	-0,02250	0,00100	-22,500	0,02828	-0,03521	-0,00979	-0,01125	0,00050

Resposta: $Z_{(1)X/S}$; $R^2=0,999$; $A_j:0,998$; Planejamento 2^3

A Figura 4.11 representa tridimensionalmente a influência das variáveis EL_1 e P_1 (codificadas) com efeitos significativos no grau de transformação de substrato em células

$Z_{X/S}$, onde a região avermelhada (de maior conversão) aponta para maiores concentrações de peptona e menores de extrato de levedura.

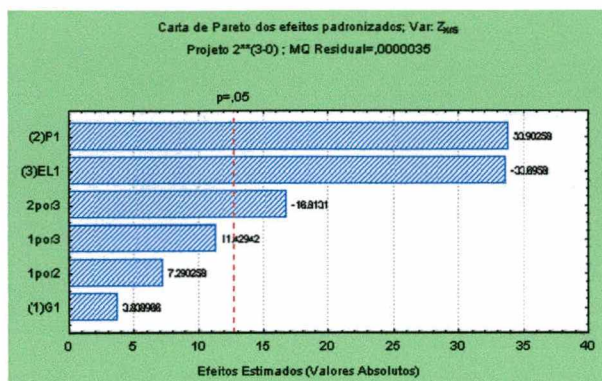


Figura 4.10. Carta de Pareto para os efeitos das variáveis na conversão de substrato em biomassa, de *P. microcarpus* – Experimento 1.

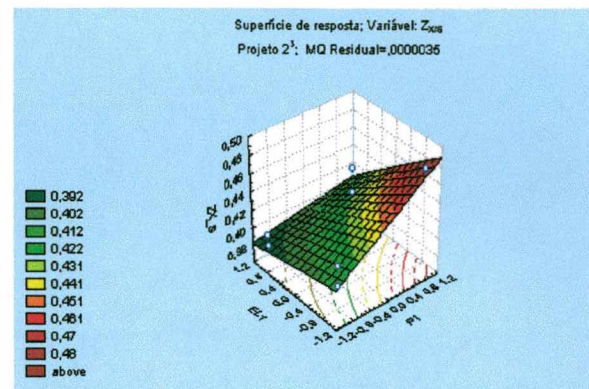


Figura 4.11. Superfície de resposta mostrando a influência das variáveis na conversão de substrato em biomassa de *P. microcarpus* – Experimento 1.

A variável peptona (P_1) mostrou ser o fator estudado mais importante, apresentando os maiores efeitos na produção de biomassa (Figura 4.10). Os resultados do planejamento revelaram que níveis mais elevados de peptona tenderam a aumentar a conversão de substrato em biomassa, e a questão de simplificação do meio de cultura ficou complicada, pois a peptona era o componente de maior preço.

A variável extrato de levedura (EL_1), dentro dos níveis estudados, apresentou efeitos negativos sobre a produção de biomassa, isoladamente e com interação com a variável P_1 . A influência negativa desse componente também se observou nos estudos em meio MNM, em discordância com resultados obtidos por PRADELLA *et al.* (1991a) com isolados de *P. tinctorius*. Isto vem reforçar a impossibilidade de se generalizarem resultados de estudos nutricionais obtidos por outros autores, considerando-se as grandes variações genéticas inter e intra-específicas de espécies/isolados de *Pisolithus* (ANDERSON *et al.*, 1998, 1999; GOMES *et al.*, 2000).

b) Experimento 2

No segundo planejamento aumentou-se em 100% o limite da variável extrato de levedura, responsável por resultados contrários aos relatados na literatura (PRADELLA *et al.*, 1991a), sendo porém, significativamente mais barato que a peptona bacteriológica.

Este segundo estudo confirmou os resultados do estudo anterior, com relação ao efeito negativo do EL sobre crescimento do isolado UFSC–Pt 116 (Tabela 4.4).

Tabela 4.4: Estimativa dos efeitos principais e de interação de segunda ordem, valores dos testes estatísticos e coeficientes de correlação, para o Experimento 2, usando uma simplificação do meio L&A/K; em cultivo de *P. microcarpus* sob condições estáticas a 25 °C.

	Efeitos	Desvio Padrão	t(1)	P	Limite conf. -95,%	Limite conf. +95,%	Coef.	Coef. Desvio Padrão
Média/Inter.	0,43637	0,00087	498,714	0,00128	0,42526	0,44749	0,43637	0,00087
(1)G ₂	-0,01975	0,00175	-11,285	0,05626	-0,04199	0,00249	-0,00987	0,00087
(2)P ₂	0,02825	0,00175	16,143	0,03939	0,00601	0,05049	0,01412	0,00087
(3)EL ₂	-0,03175	0,00175	-18,1423	0,03505	-0,05399	-0,00951	-0,01587	0,00087
1 por 2	-0,00825	0,00175	-4,714	0,13307	-0,03049	0,01399	-0,00412	0,00087
1 por 3	0,01575	0,00175	9,000	0,07045	-0,00649	0,03799	0,00787	0,00087
2 por 3	-0,01925	0,00175	-11,000	0,05772	-0,04149	0,00299	-0,00962	0,00087

Resposta: $Z_{(2)X/S}$; $R^2=0,998$, $A_j:0,992$; Planejamento 2³.

Pode-se notar que o efeito negativo do EL superou o efeito positivo da peptona (Figura 4.12). A superfície de resposta (Figura 4.13) é semelhante à superfície de resposta do primeiro experimento (Figura 4.11). O EL, mesmo em concentrações baixas (0,67 g.L⁻¹), como a utilizada no meio L&A/K, influenciou negativamente a produção de biomassa. Provavelmente, quando o EL parece melhorar o rendimento de algum cultivo, ele esteja apenas contribuindo através da estabilização do pH, como foi discutido em relação aos resultados de PRADELLA *et al.* (1991a).

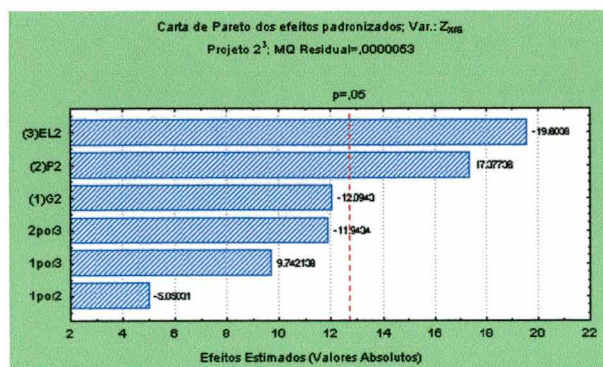


Figura 4.12. Carta de Pareto para os efeitos das variáveis na conversão de substrato em biomassa de *P. microcarpus* – Experimento 2.

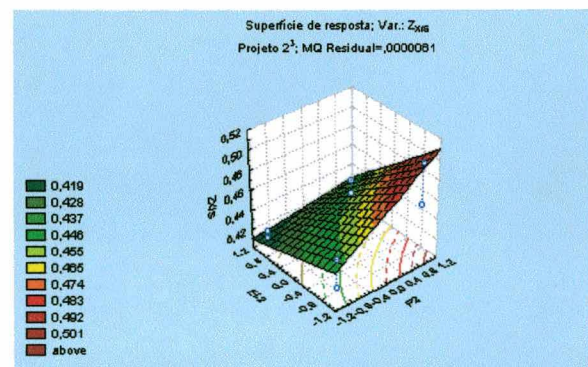


Figura 4.13. Superfície de resposta mostrando a influência das variáveis na conversão de substrato em biomassa de *P. microcarpus*–Experimento 2.

Para diminuir, então, o custo da formulação, estudou-se no Experimento 3 a substituição do EL por extrato de malte, e a peptona de carne por peptona de soja.

c) Experimento 3

No terceiro planejamento, o efeito de todas as variáveis e da maioria das interações foi significativa (Tabela 4.5), podendo ser melhor visualizado através da Figura 4.14 da carta de Pareto para o nível p de significância estatística. Valores à direita da linha vertical tracejada foram estatisticamente significativos.

Tabela 4.5: Estimativa dos efeitos principais e de interação de segunda ordem, valores dos testes estatísticos e coeficientes de correlação, para o Experimento 3, usando uma simplificação do meio L&A/K; em cultivo de *P. microcarpus* sob condições estáticas e a 25 °C.

	Efeitos	Desvio Padrão	t(1)	p	Limite conf. -95,%	Limite conf. +95,%	Coef.	Coef. Desvio Padrão
Média/Inter.	0,43253	0,00045	961,309	0,00066	0,42682	0,43825	0,43254	0,00045
(1)G3	0,02761	0,00090	30,685	0,02074	0,01618	0,03905	0,01381	0,00045
(2)PS	0,08203	0,00090	91,165	0,00698	0,07060	0,09347	0,04102	0,00045
(3)EM	0,03856	0,00090	42,855	0,01485	0,02713	0,04999	0,01928	0,00045
1 por 2	0,01837	0,00090	20,415	0,03116	0,00694	0,02981	0,00919	0,00045
1 por 3	0,01334	0,00090	14,826	0,04288	0,00191	0,02478	0,00667	0,00045
2 por 3	0,00853	0,00090	9,481	0,06689	-0,00290	0,01997	0,00427	0,00045

Resposta: $Y_{X/S}$; $R^2=0,999$; $A_j:0,999$; Planejamento 2^3 .

Os resultados revelam novamente que a peptona (neste caso peptona de soja -PS) foi a variável estudada mais importante para a produção de biomassa do isolado UFSC-Pt 116. O efeito positivo na conversão de substrato em biomassa ($Y_{X/S}$) dessa variável foi 100% superior ao efeito, também positivo, da variável extrato de malte (EM).

A variável glicose (G_3), também apresentou efeitos positivos, reforçando o que já foi discutido no Experimento 1, de que o meio proposto comporta aumento de até 40% da fonte de carbono.

Efeitos de interação entre as variáveis PS e G_3 , proporcionando aumento da conversão, foram também significativos, dentro do intervalo de confiança de 95%.

A Figura 4.15 apresenta a representação tridimensional da influência das variáveis EM e PS (codificadas) com efeitos significativos na conversão de substrato em biomassa $Y_{X/S}$. Em síntese, a composição do meio do ensaio 7 (Tabela 3.4 e Figura 4.8) apresentou uma redução de 14% no custo, em comparação ao meio L&A/K (ensaio 3 do Exp. 1, Figura 4.8), com relação aos resultados de produção de biomassa e conversão de substrato em biomassa.

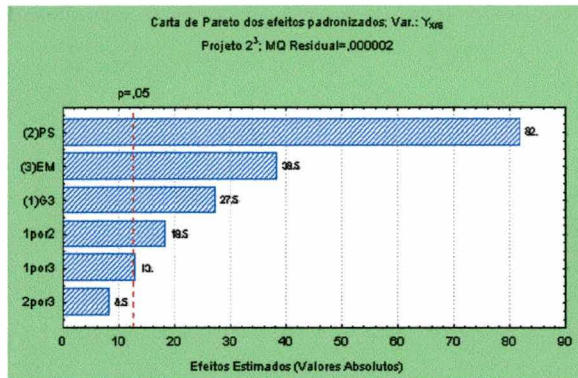


Figura 4.14. Carta de Pareto para os efeitos das variáveis na conversão de substrato em biomassa de *P. microcarpus* – Experimento 3.

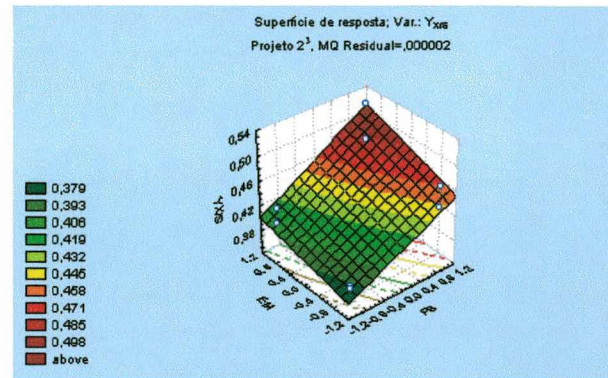


Figura 4.15. Superfície de resposta mostrando a influência das variáveis na conversão de substrato em biomassa de *P. microcarpus*–Experimento 3.

4.4 – Determinação de parâmetros cinéticos para crescimento de *P. microcarpus* em cultura estática em frascos

As culturas foram caracterizadas através da medida da glicose residual, conversão de substrato em biomassa e variação de pH. A curva de acumulação de biomassa foi recíproca ao consumo de glicose. O pH caiu continuamente até o final do cultivo (Figura 4.16). O fungo cresceu na superfície na forma de tapetes micelianos, e a coloração do meio foi ficando mais escura com o progresso da cultura, até atingir pH 3,5, aproximadamente (Figura 4.17). Neste ponto, a coloração escura diminuiu de intensidade devido à precipitação dos pigmentos.

O meio L&A/K mostrou-se adequado para culturas de *P. microcarpus* em frascos, e o fungo demonstrou habilidade de crescer numa ampla faixa de pH. A composição testada continha baixa concentração de fosfatos (1/9 da concentração existente no meio original L&A), e isto foi um resultado importante para a eficácia da posterior imobilização do

micélio em alginato de cálcio, onde a presença de alta concentração residual de fosfatos poderia desestabilizar o gel (KUEK, 1996).

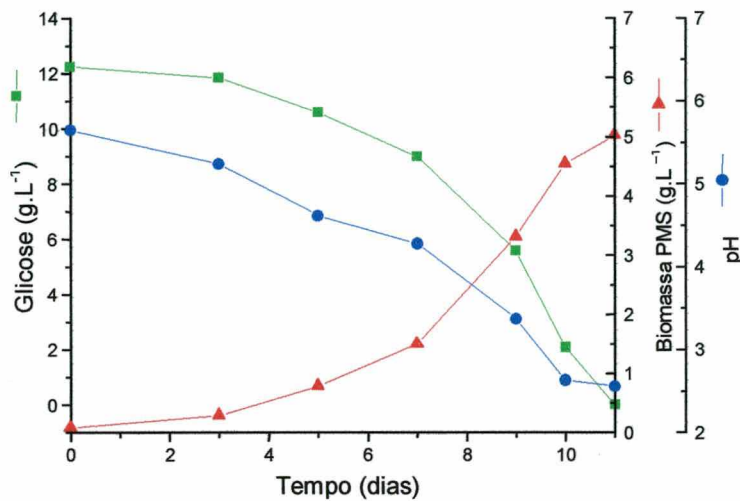


Figura 4.16. Consumo de glicose, produção de biomassa e variação do pH em cultivo de *P. microcarpus* em cultura estática com meio L&A/K líquido, sob condições controladas de temperatura a 25 °C.

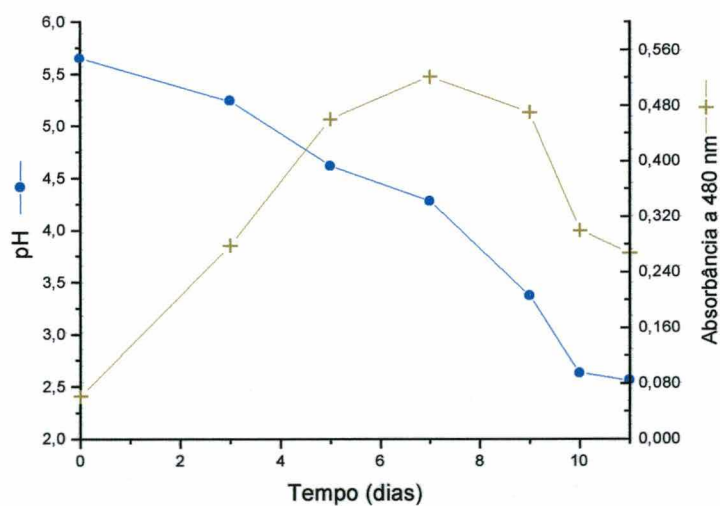


Figura 4.17. Variação do pH e pigmentação do meio em cultura estática de *P. microcarpus* em meio L&A/K líquido, sob condições controladas de temperatura a 25 °C.

A velocidade específica máxima de crescimento (μ_x) foi de 0,391 dia⁻¹, e a conversão de 0,42 g.g⁻¹ (Figura 4.18). Esses parâmetros não têm comparação direta, pois não foram encontrados na literatura resultados concernentes a *P. microcarpus*. Entretanto,

existe muita semelhança com os obtidos com a espécie *P. tinctorius*. Alguns desses isolados, supostamente desta última espécie, foram recentemente reclassificados como sendo da espécie *P. microcarpus*, com base em resultados de estudos de similaridade genética (F. MARTIN e V.L. OLIVEIRA, resultados não publicados), como por exemplo os isolados ITA-06 e AC-03, estudados por PRADELLA *et al.* (1991a,b).

Comparando-se, então, com resultados obtidos em cultura líquida estática com os isolados ITA-06 e AC-03 em meio base MNM (PRADELLA *et al.*, 1991a) (Tabela 4.6), encontraram-se conversões semelhantes, mas velocidades de crescimento muito superiores às obtidas por esses autores, que foram 0,035 e 0,101 dia^{-1} . Neste ponto, deve-se retornar ao discutido no item 4.2, a respeito da questão de inibição por falta de oxigênio e do fato de o extrato de levedura (EL) ser, ou não, indutor de crescimento. Na Tabela 4.6 observa-se que a biomassa nos ensaios realizados por esses autores, com meio suplementado com EL, a produção de biomassa foi muito superior à dos demais meios, mas as conversões foram semelhantes, e as velocidades específicas de crescimento também o foram, com exceção de um tratamento sem EL, que inclusive teve a maior velocidade (0,101 dia^{-1}), em 50 dias de cultivo. Neste tratamento, uma parte de micélio possivelmente conseguiu flutuar e crescer mais, obtendo oxigênio diretamente do ar.

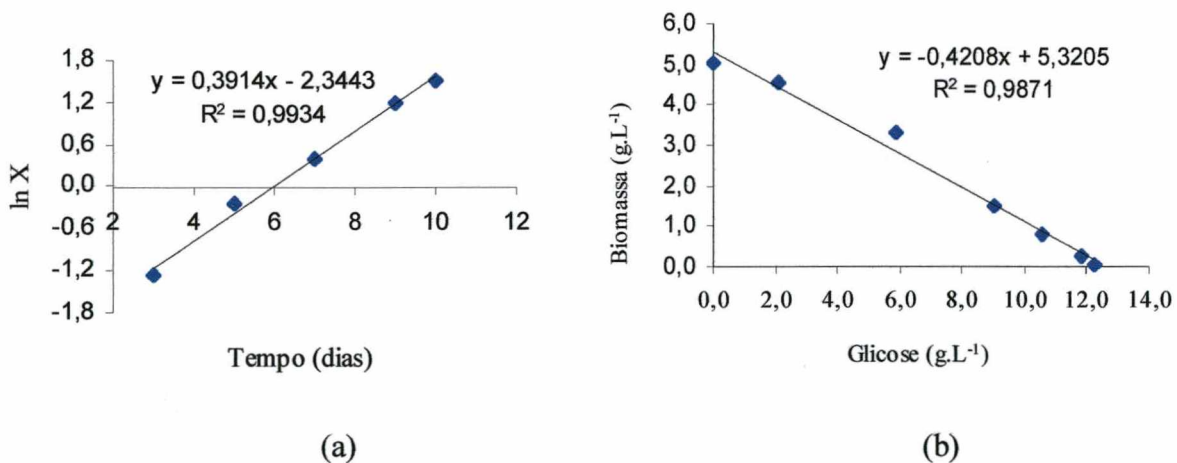


Figura 4.18. Velocidade específica de crescimento (a) e conversão de substrato em biomassa (b) para cultura estática de *P. microcarpus* em meio L&A/K líquido, sob condições controladas de temperatura a 25 °C.

CAO e CRAWFORD (1993), estudando o crescimento de *P. tinctorius* em meio sintético em frascos agitados, atingiram uma conversão de 0,41 g.g^{-1} e $\mu_X = 0,251 \text{ dia}^{-1}$ em

8 dias de cultivo. LITCHFIELD e ARTHUR (1993) obtiveram, também para *P. tinctorius* cultivado em meio MPG sob condições de agitação, conversão ($Y_{X/S}$) de $0,45 \text{ g.g}^{-1}$ em 45 dias de cultivo. Para *T. terrestris* nas mesmas condições a conversão foi $0,16 \text{ g.g}^{-1}$. SOUZA (1996), utilizando fermentação no estado sólido (meio de cultura embebido em vermiculita) com um isolado de *Pisolithus* sp. (UFSC-Pt 24) com o mesmo meio utilizado por PRADELLA *et al.* (1991a), obteve $Y_{X/S} = 0,27 \text{ g.g}^{-1}$ e $\mu_X = 0,13 \text{ dia}^{-1}$, em tempo muito longo de cultivo (90 dias).

Pode-se estabelecer como um critério, que em cultivos em meio líquido ou sólido, quando o tempo é muito longo (p. ex., acima de 20 dias), deve-se rever os procedimentos de preparo do inóculo associados à forma de aeração. Por exemplo, se o micélio ficar submerso, deve haver injeção de ar no meio líquido, caso contrário, haverá fatalmente inibição por falta de oxigênio, e isso pode levar a interpretações erradas sobre a eficiência do meio de cultura e também do microrganismo. Neste contexto, os biorreatores tipo *airlift* são ferramentas com ótimas características de transferência de massa (oxigênio e nutrientes) e com baixo grau de cisalhamento do micélio, necessitando ser estudados para utilização na produção de fECM.

Uma das grandes vantagens da fermentação submersa em relação à fermentação no estado sólido é que nesta última, o menor contato do fungo com os substratos à medida que estes vão se esgotando, tende a prolongar significativamente o tempo para que possa haver exaustão dos açúcares. Já em cultivos submersos, o contato entre microrganismos e substrato é otimizado pelo processo de mistura, que minimiza os gradientes de concentração de nutrientes.

A produtividade é um parâmetro que depende muito das condições do inóculo (idade, conservação, fragmentação) e também de sua quantidade. E devido à dificuldade de se padronizar X_0 , e deste raramente constar nos trabalhos da literatura, o parâmetro não se mostrou útil nas análises dos diversos processos. Pode-se ter um tempo de fermentação mais longo, devido à viabilidade reduzida do inóculo, mas uma velocidade de crescimento elevada. Poder-se-ia definir uma produtividade específica e analisá-la na fase exponencial, mas isto também não seria útil para comparações entre processos. Entretanto, quando um processo já está estabelecido e se dispõe dos dados de biomassa inicial, a produtividade é um parâmetro muito importante, principalmente nos processos em escala industrial.

Tabela 4.6: Resultados de cultivo de diferentes microrganismos em diferentes processos, comparados com os resultados deste estudo.

Fungo	meio	Processo	T _{cultivo} (dias)	X (g.L ⁻¹)	Yx/s (g.g ⁻¹)	μ_x (dia ⁻¹)	t _{duplic} (dias)	Fonte
<i>Phanerocheteae chrysosporium</i>	sintético	airlift circ. Interna	2	2,85	-	0,852	0,81	BONNARME et al., 1992
<i>P. chrysosporium</i>	sintético	coluna bolhas	2	2,30	-	0,825	0,84	BONNARME et al., 1992
<i>P. chrysosporium</i>	sintético	tanque agitado	3	3,10	-	0,817	0,85	BONNARME et al., 1992
<i>Pisolithus tinctorius</i> (AC-03)	MNM	frascos estáticos	45	3,30	0,41	0,052	13,33	PRADELLA et al., 1991a
<i>P. tinctorius</i> (AC-03)	MNM+3EL	frascos estáticos	45	6,05	0,45	0,062	11,18	PRADELLA et al., 1991a
<i>P. tinctorius</i> (ITA-06)	MNM	frascos estáticos	50	3,80	0,48	0,101	6,86	PRADELLA et al., 1991a
<i>P. tinctorius</i> (ITA-06)	MNM+3EL	frascos estáticos	50	4,80	0,46	0,035	19,80	PRADELLA et al., 1991a
<i>P. tinctorius</i> (ITA-06)	MNM+1EL	tanque agitado	20	3,50	0,37	0,066	10,5	PRADELLA et al., 1991b
<i>P. tinctorius</i> (ITA-06)	MNM+4,5 peptona	frascos estáticos	30	5,0	0,52	0,122	5,68	PRADELLA et al., 1991b
<i>Laccaria laccatta</i>	L&A ¹	fras. agit. 200 rpm	5	6,25	0,73	0,821	0,84	KUEK, 1996
<i>L. laccatta</i>	L&A/K ^a -1/9F ¹	fras. agit. 200 rpm	6	7,20	0,73	0,802	0,86	KUEK, 1996
<i>L. laccatta</i>	L&A/K ^b -1/9F ¹	fras. agit. 100 rpm	6	7,10	0,73	1,018	0,68	KUEK, 1996
<i>L. laccatta</i>	L&A/K ^b -1/9F ¹	fras. agit. 100 rpm	6	11,80	0,60	0,923	0,75	KUEK, 1996
<i>L. laccatta</i>	L&A/K ^b -1/9F ¹ -1/3NF ²	fras. agit. 100 rpm	3+4	9,80	0,52	0,965 e 0,358	0,72	KUEK, 1996
<i>L. laccatta</i>	L&A/K ^b -1/9F ¹ -1/6NF ²	fras. agit. 100 rpm	3+5	9,00	0,51	0,948 e 0,053	0,73	KUEK, 1996
<i>L. laccatta</i>	L&A/K ^b -1/9F ¹ -1/9NF ²	fras. agit. 100 rpm	4+5	9,90	0,53	0,710 e 0,143	0,98	KUEK, 1996
<i>P. tinctorius</i>	MPG ^c	frascos agitados	39	14,10	0,16	-	-	LITCHFIELD e ARTHUR, 1983
<i>Thelefora terrestris</i>	MPG ^c	frascos agitados	39	5,07	0,45	-	-	LITCHFIELD e ARTHUR, 1983
<i>Pis. tinctorius</i>	sintético	frascos agitados	8	4,40	0,41	0,251	2,76	CAO E CRAWFORD, 1993
<i>Penicillium</i> sp. (contam.)	L&A/K	airlift circ. externa	7	7,05	0,59	0,685	1,01	Este trabalho
<i>P. microcarpus</i> (UFSC-Pt 116)	L&A/K	frascos estáticos	10	5,02	0,42	0,391	1,79	Este trabalho
<i>P. microcarpus</i> (UFSC-Pt 116)	MNM	frascos agitados	24	2,01	0,29	0,115	6,03	Este trabalho
<i>P. microcarpus</i> (UFSC-Pt 116)	L&A/K	airlift circ. externa	4+5	4,83	0,42	0,576 e 0,270	1,21	Este trabalho
<i>P. microcarpus</i> (UFSC-Pt 116)	L&A/KM ₂ *	airlift circ. externa	17	3,19	0,40	0,356	1,95	Este trabalho
<i>Pisolithus</i> sp. (UFSC-Pt 24)	MNM+3EL	ferm. estado sól.	90	2,70	0,27	0,130	5,33	SOUZA, 1996

(^a) 10 g.L⁻¹, (^b) 20 g.L⁻¹ e (^c) 30 g.L⁻¹ de glicose; (1) F = redução dos compostos fosfatados e (2) NF = redução dos compostos não fosfatados; * Nesta formulação substituiu-se a peptona e o extrato de levedura por 3 g.L⁻¹ de extrato de malte.

Para ilustrar este ponto, a Figura 4.19 apresenta a evolução da biomassa durante o estudo cinético de crescimento de *P. microcarpus* em cultura estática em erlenmeyers ao longo de 11 dias de cultivo. Partindo-se de 5 discos de micélio-ágar (X_0 equivalente a $0,08 \text{ g.L}^{-1}$), observa-se a fusão dos discos pelo crescimento do micélio, e a formação do tapete miceliano. Se, por exemplo, a biomassa inicial inoculada, X_0 , tivesse sido igual a $0,20 \text{ g.L}^{-1}$ (equivalente a 12 discos de micélio), o cultivo teria terminado no oitavo dia (posição da seta entre amostras do sétimo e nono dia), considerando a velocidade de crescimento de $0,391 \text{ dia}^{-1}$ e t_{dup} da biomassa na fase exponencial de 1,79 dias (Tabela 4,6). Isso demonstra, então, que devido à falta de padronização do inóculo, não é correto comparar valores de produtividade entre processos.

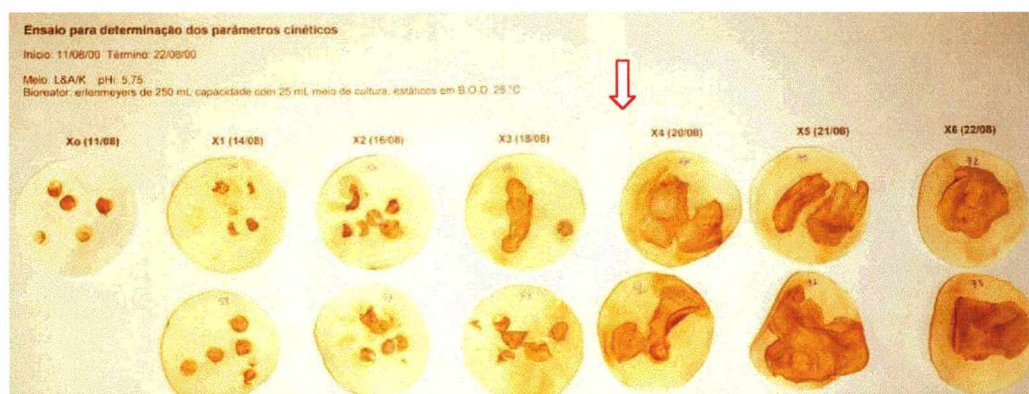


Figura 4.19. Evolução da biomassa de *P. microcarpus* em cultura estática em meio L&A/K líquido.

4.5 – Ensaios em biorreator *airlift* e cinética da produção do inoculante de *P. microcarpus*

Os valores de glicose residual e do pH caíram continuamente até o final do cultivo (Figura 4.20). O fungo cresceu na forma de *pellets* esféricos e densos, com diâmetro variando entre 1 e 6 mm, e a coloração do meio foi ficando mais escura com o progresso da cultura. Os dados de biomassa foram estimados utilizando a conversão global obtida de $0,418 \text{ g.g}^{-1}$.

A análise dos resultados (Figura 4.21) indica que existiram pelo menos duas fases de crescimento, sendo a primeira a fase exponencial, apresentando velocidades específicas distintas, separadas por uma inflexão na curva de crescimento, sugerindo alguma forma de inibição. A velocidade específica nos primeiros 4 dias, na fase de crescimento exponencial, foi de $0,576 \text{ dia}^{-1}$, caindo para a metade deste valor nos 5 dias seguintes de fermentação.

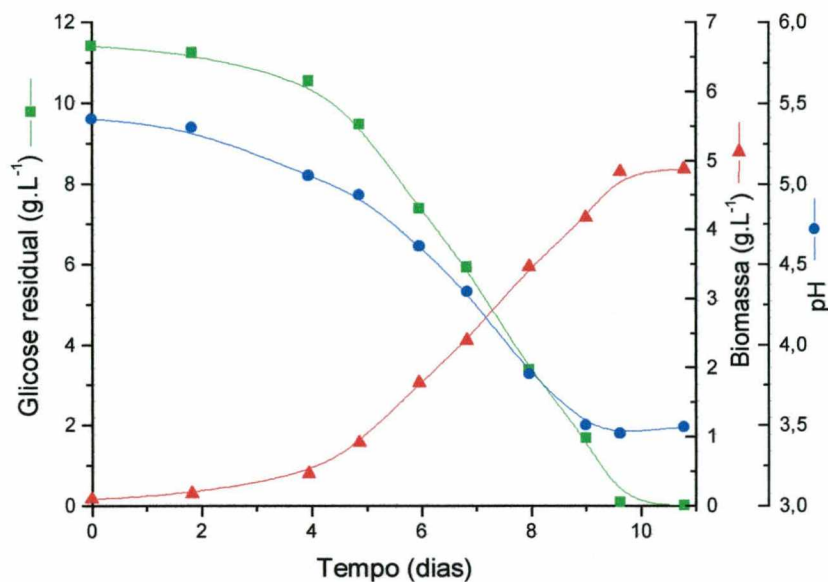


Figura 4.20. Produção de biomassa, consumo de glicose e variação do pH em cultivo de *P. microcarpus* (UFSC-Pt 116), em biorreator *airlift* (2,3 L) em meio L&A/K tamponado com A/C[†] sob condições controladas de temperatura a 25,5 °C.

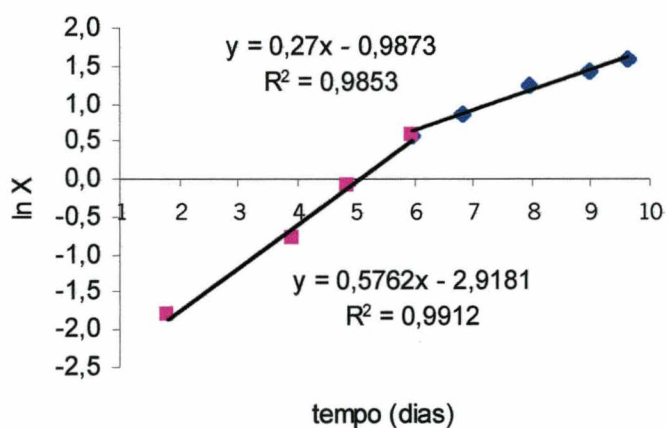


Figura 4.21. Velocidade específica de crescimento para cultivo de *P. microcarpus* em biorreator *airlift* (2,3 L), vazão de ar de $0,8 \text{ NL} \cdot \text{min}^{-1} \pm 0,2$, em meio L&A/K, sob condições controladas de temperatura (25,5 °C), tamponado com A/C (pH 5,4).

[†] Solução 0,1 M de ácido cítrico+acetato de sódio

A Figura 4.22, mostra a morfologia dos *pellets*, demonstrando a existência de três regiões distintas de compactação das hifas.

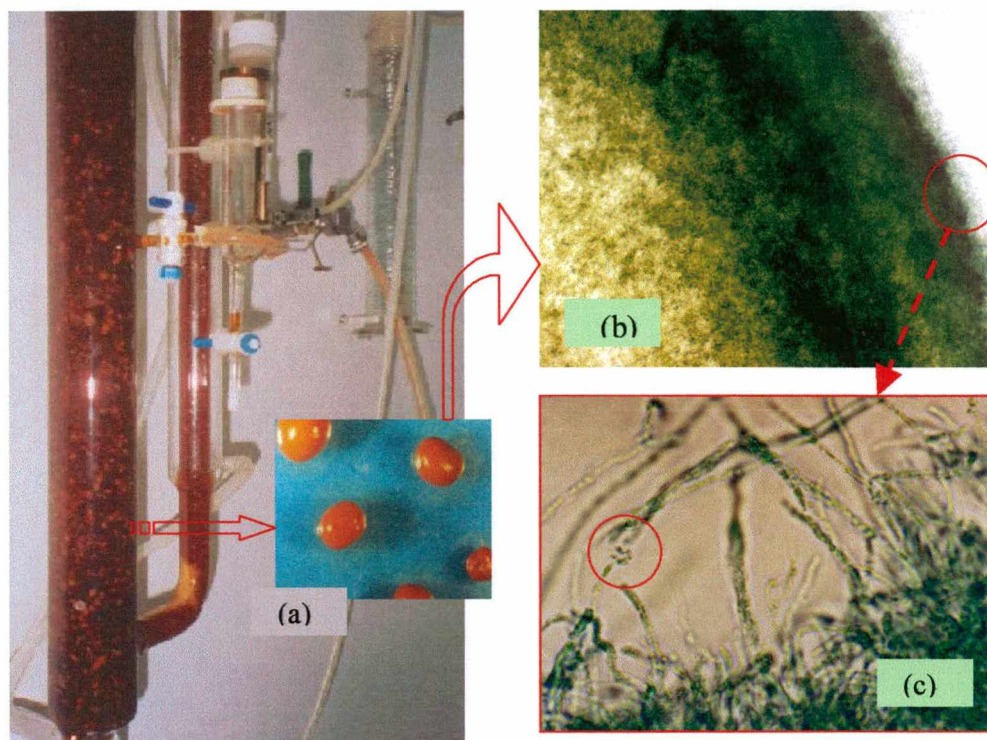


Figura 4.22. *Pellets* de biomassa de *P. microcarpus* cultivado em *airlift* a 25,5 °C, em meio L&A/K. (a) vista geral dos *pellets* em biorreator; (b) vista dos *pellets* ao microscópio revelando três camadas distintas de compactação das hifas, e (c) aspecto das hifas na superfície dos *pellets*, em destaque a presença de fibulas características do micélio dos basidiomicetos.

No *airlift*, o movimento turbilhonar, provocado pela injeção de ar e circulação do líquido, promovia choques entre os *pellets*. Com o aumento progressivo da quantidade destes, e a consequente diminuição do volume útil para sua movimentação, os choques entre *pellets* aumentaram durante o cultivo. Isto pode ser responsável pela formação de diferentes camadas de compactação de hifas nos *pellets*. Como resultado, possivelmente houve uma maior dificuldade de transferência de oxigênio para as hifas no interior dos *pellets*, e diminuição da velocidade específica de crescimento a partir do sexto dia de fermentação (Figura 4.20).

KUEK (1996), estudando o fungo *L. laccatta*, observou que a redução da concentração dos compostos fosfatados a 1/9 no meio L&A, promoveu resultados de produção de biomassa

semelhantes aos do meio original. Entretanto, quando a concentração dos compostos não fosfatados também era reduzida a 1/3, a conversão ($Y_{X/S}$) reduziu-se 15% (cf. meios L&A/K-1/9F e L&A/K-1/9F-1/3NF na Tabela 4.6).

Foi concluído que o fungo preferia baixas concentrações de nutrientes nas fases iniciais de cultivo, em virtude dessas modificações terem diminuído o tempo da fase lag[‡], chegando a sugerir o cultivo *fed-batch* como alternativa. Entretanto, as curvas desse autor não mostram tal fase lag. Analisando seus dados por meio da velocidade específica de crescimento (ausente em sua discussão), percebem-se duas fases distintas relacionadas com a diminuição dos compostos orgânicos complexos (peptona bacteriológica e extrato de levedura).

Observando-se os dados da Tabela 4.6, pode-se notar que as velocidades são semelhantes numa primeira etapa da fase de crescimento (3 dias), tanto para os tratamentos onde se mantém o nível original desses componentes, como também para aqueles em que foram reduzidos a 1/3 e 1/6 (L&A/K-1/9F-1/3NF e L&A/K-1/9F-1/6NF). Na segunda metade da fase de crescimento (4 e 5 dias, respectivamente), as velocidades caíram em média para 1/3, 1/18 do valor dos primeiros 3 dias. Isso sugere que o fungo *L. laccata* não teve preferência por concentrações baixas de nutrientes nas fases iniciais. Mais provavelmente, a carência de um fator de crescimento, provocada pela diminuição no teor de peptona, a partir de certo ponto do cultivo (terceiro dia), diminuiu a velocidade de crescimento, interrompendo a fase exponencial. Ou ainda, a presença de fator inibidor de crescimento no extrato de levedura (como já constatado neste estudo com o planejamento fatorial), sobressaiu-se a partir do ponto de inflexão observado. Maior tempo de cultivo e dificuldades no metabolismo podem provocar um aumento na taxa de respiração da fonte de carbono, e também a oxidação direta pelo oxigênio do ar, provocando a diminuição na conversão final. Prova disso é que os valores de conversão caem de 60% para aproximadamente 52%, quando são diminuídos os compostos orgânicos (Tabela 4.6).

Esta explicação também é válida para os resultados deste trabalho, com relação a existência e pelo menos duas fases de velocidade específica de crescimento de *P. microcarpus*, uma na etapa de crescimento exponencial e pelo menos outra numa etapa de redução de velocidade. A observação dos perfis de pH, tanto nos estudos de KUEK (1996) (nunca esteve

[‡] Fase de cultivo na qual a concentração de microrganismos permanece constante (X_0), entendendo-se que o microrganismo está adaptando seu sistema enzimático, a fim de iniciar a metabolização do substrato.

abaixo de 3 em todos os tratamentos), quanto no presente estudo (inflexão ocorreu em pH acima de 4), sugere que o pH não provocou o efeito inibitório.

Em outro cultivo no *airlift* utilizando o meio base L&A/K, onde substituiu-se a peptona e o extrato de levedura (EL) por 3 g.L^{-1} de extrato de malte, o fungo cresceu, também, na forma de *pellets* densos e esféricos, com a coloração do meio aumentando progressivamente. Os dados de biomassa foram estimados considerando a conversão global obtida de $0,404 \text{ g.g}^{-1}$. A Figura 4.23 apresenta as curvas de crescimento, podendo-se constatar a presença de uma fase lag de aproximadamente 6 dias. Após esta fase a curva de glicose caiu continuamente. Também o pH decresceu com uma clara tendência a estabilizar próximo a 2,1 sem que aparentemente tenha afetado a produção de biomassa. No estudo da composição do meio de cultura (item 4.2) já havia sido constatada tendência similar.

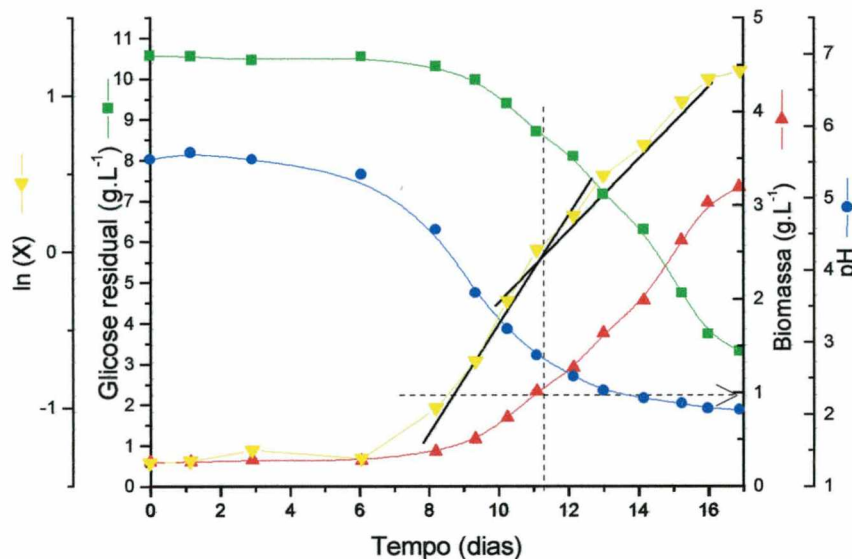


Figura 4.23. Produção de biomassa, consumo de glicose e variação do pH em cultivo de *P. microcarpus* (UFSC-Pt 116), em biorreator *airlift* (2,3 L) com vazão de ar de $0,8 \text{ NL.min}^{-1} \pm 0,2$, em meio L&A/K (pH_i 5,8), sob condições controladas de temperatura ($25,5 \text{ }^\circ\text{C}$).

Como no caso anterior, a análise dos resultados (Figura 4.24) indica que existiu uma fase de crescimento exponencial e outra fase com diminuição da velocidade específica de

crescimento, sugerindo um segundo substrato limitante. A velocidade específica nos primeiros 4 dias da fase de crescimento exponencial foi de $0,357 \text{ dia}^{-1}$, caindo 36% nos outros 6 dias de fermentação [Figura 4.24 (a)]. Na Figura 4.23 foi adicionado um novo eixo [$\ln(X)$], para uma melhor visualização do ponto de mudança de velocidade e para confrontar com as outras curvas. A fase lag pode ser justificada pelo fato de o inóculo ter sido cultivado em meio contendo peptona e extrato de levedura e depois ter sido transferido para outras condições de cultivo em presença de extrato de malte. O fato deste ensaio não conter EL e, mesmo assim, apresentar pelo menos duas fases de crescimento com distintas velocidades específicas, reforça a hipótese da inibição por falta de oxigênio, já discutida anteriormente.

Neste ponto, é necessário esclarecer que a solução para o problema da inibição por falta de oxigênio não seria possível apenas aumentando a vazão de ar de entrada. Ao contrário, verificou-se que o aumento da vazão agravava o problema da oxigenação, pois uma quantidade maior de bolhas de ar dispersas, diminuía ainda mais a densidade do líquido, fazendo com que a densidade relativa dos *pellets* aumentasse, provocando uma maior concentração de biomassa na parte inferior do *riser*, agravando ainda mais o problema da compactação dos *pellets* e dificultando a circulação do líquido dentro do biorreator.

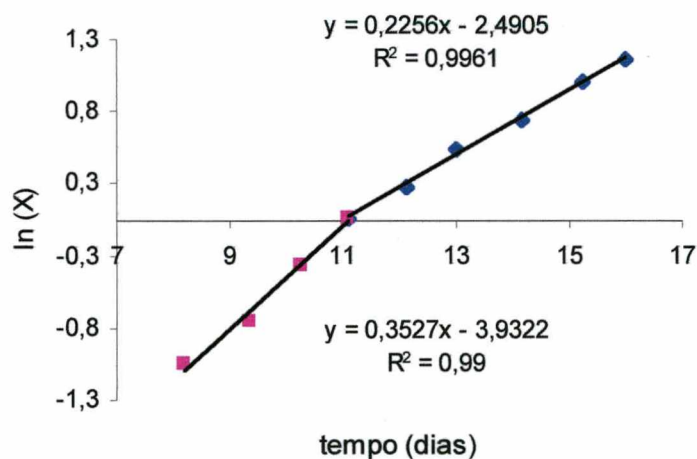


Figura 4.24. Velocidade específica de crescimento para cultivo de *P. microcarpus* em biorreator *airlift* (2,3 L), em meio base L&A/K, pH inicial 5,8, em condições controladas de temperatura (25,5 °C).

As linhas tracejadas na Figura 4.20 e 4.23 marcam os pontos de inflexão e mudança de velocidade específica de crescimento. É interessante observar que o ponto de inflexão não

ocorreu em concentrações similares de biomassa, mas sim em tempos iguais durante a fase de crescimento. Esta aparente independência em relação às diferentes concentrações de biomassa entre os ensaios e a compactação dos *pellets* encontra explicação no parágrafo anterior, com relação ao acúmulo da biomassa na parte inferior do *riser*. O fato de as concentrações de biomassa não serem iguais tem relação com as diferentes velocidades de crescimento e, estas, com as diferenças na composição do meio. Já o tempo tem influência direta na compactação dos *pellets*. Durante a fase lag, como ainda não havia *pellets*, apenas fragmentos de micélio, pôde-se observar em lupa que a organização das hifas era bastante frouxa, não dificultando a transferência de massa. Com o início do crescimento, inicia-se o processo de compactação provocado pelo choques e também pelo próprio crescimento miceliano interno nos *pellets*, pois as hifas internas não se quebram para gerar novos núcleos de crescimento.

Outra informação que corrobora a discussão sobre o papel do oxigênio como substrato limitante é a cinética de crescimento do cultivo contaminado com *Penicillium* sp. Nesse cultivo, o fungo contaminante cresceu na forma de *pellets* frouxos e de cor amarelo claro, e durante todo o cultivo existiu apenas uma velocidade específica de crescimento, demonstrando que a morfologia mais frouxa dos *pellets* não provocou resistência à transferência de massa a ponto de provocar inibição. Como a velocidade de crescimento de *Penicillium* sp. foi superior a de *P. microcarpus*, o tempo de cultivo foi inferior e permitiu menor compactação dos *pellets* do fungo contaminante. Além disso, as hifas quebravam-se mais facilmente, gerando um número muito superior de núcleos de crescimento que o *P. microcarpus*.

4.6 – Estudo da viabilidade do inoculante produzido em biorreator em plantas

O micélio foi testado na forma de suspensão miceliana em água, e encapsulado em gel de alginato de sódio (Figura 4.25). Após três meses não observou-se a completa formação de micorrizas, podendo-se perceber que não houve diferenças entre as partes aéreas das plantas inoculadas e plantas testemunhas (Figura 4.26). Entretanto, o inóculo mostrou-se viável tanto na forma de suspensão miceliana, quanto na forma encapsulada, observando-se intensa acumulação de hifas na superfície das raízes inoculadas sugerindo que o fungo estava na fase de infecção das raízes (Figura 4.27).

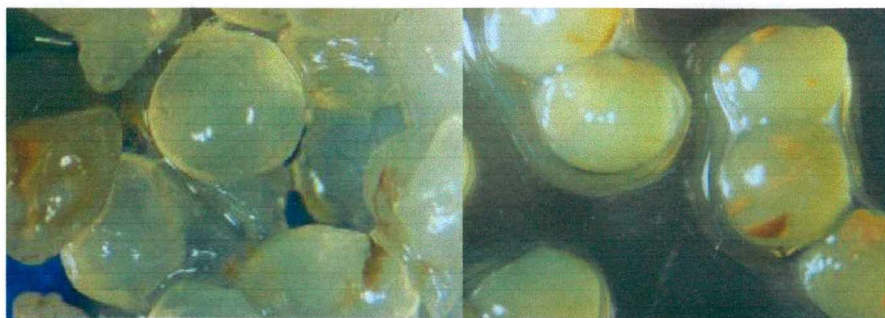


Figura 4.25. Aspecto dos *pellets* de micélio em gel de alginato de cálcio.

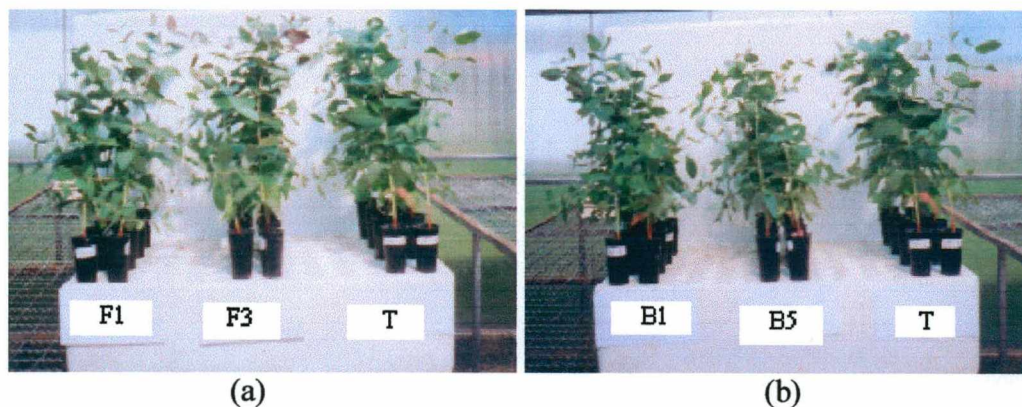


Figura 4.26. (a) Plantas inoculadas com 1 ml (F1) e 3 ml (F3) de suspensão miceliana de *P. microcarpus*. (b) Plantas inoculadas com 1 (B1) e 5 (B5) *pellets* de micélio de *P. microcarpus* em gel de alginato de sódio. (T) são as plantas testemunhas.

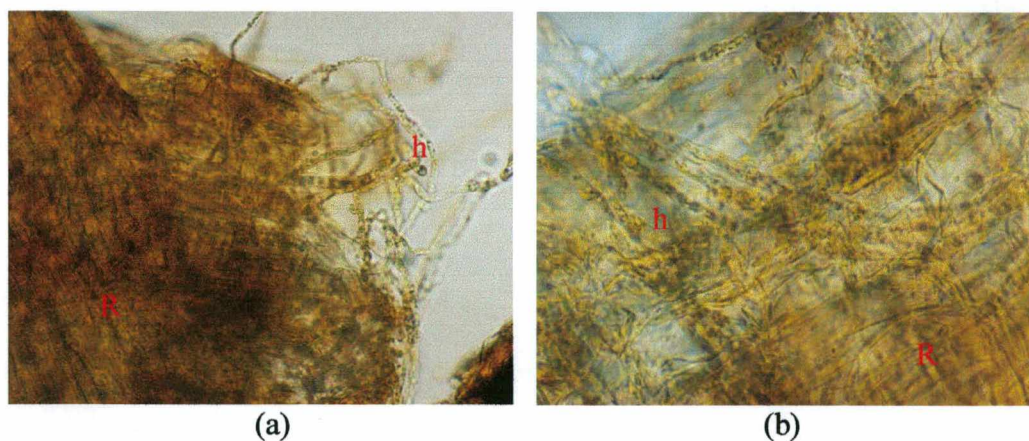


Figura 4.27. Raízes (R) das plantas inoculadas com *P. microcarpus* apresentando intensa acumulação de hifas (h) na superfície. (a) Raízes inoculadas com suspensão micelinana e (b) raízes inoculadas com *pellets*.

5. CONCLUSÕES

O meio L&A/K foi eficiente para produção de inoculante de *P. microcarpus*, permitindo a exaustão completa da glicose, tanto em cultivo estático em frascos quanto em biorreator, em um tempo de apenas 1/3 daquele gasto em meio MNM. O meio de cultivo MNM mostrou-se desbalanceado para cultivo de *P. microcarpus*, não permitindo a exaustão da fonte de carbono, resultando em baixo rendimento. Entretanto, o tamponamento com ácido cítrico e citrato de sódio, e a modificação da relação C/N de 50/1 para 20/1 melhorou a produção de biomassa nesse meio.

O aumento progressivo da pigmentação do meio de cultura pode ser uma ferramenta útil na determinação de curvas de biomassa para cultivo de fungos *Pisolithus* spp., desde que se mantenha o pH em torno de 4, para que não ocorra a precipitação dos pigmentos. Por outro lado, a condutividade elétrica para ser utilizada em correlação com a biomassa, necessita de mais estudos, também com controle do pH. Já a própria variação do pH poderá, também, ser correlacionada com a produção de biomassa em estudos futuros utilizando-se este gênero de fungos.

O processo de fragmentação do micélio reduz significativamente a viabilidade do inóculo, e a utilização de inóculo na forma de suspensão miceliana somente deve ser feita em processos aerados.

O componente extrato de levedura apresentou efeito negativo sobre a produção de biomassa, sendo este resultado contraditório em relação aos de outros autores. Já o componente peptona do meio L&A/K contém fatores importantes para o crescimento do fungo. Como alternativa para redução de custos do meio de cultura, a peptona de carne pode ser substituída pela peptona de soja, sem prejuízos para o rendimento do processo.

O fungo *P. microcarpus* apresentou habilidade de crescer em condições de pH muito baixas, o que favorece sua aplicabilidade nos solos ácidos predominantes nas áreas de plantio.

A cinética de crescimento em biorreator *airlift* apresentou duas velocidades específicas de crescimento, sendo uma na fase exponencial, e outra relacionada com uma fase de

crescimento com inibição, provavelmente devido à carência de oxigênio provocada pela dificuldade de transferência de massa em função da estrutura dos *pellets*.

O resultado de produção de inoculante de *Pisolithus microcarpus* em biorreator *airlift* foi superior aos resultados disponíveis na literatura, tanto em cultivo em biorreatores convencionais, quanto em fermentação no estado sólido. O tempo necessário para consumo total da fonte de carbono no *airlift* foi oito vezes inferior ao tempo necessário em processo no estado sólido.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- ANDERSON, I.C.; CHAMBERS, S.M.; CAIRNEY, J.W.G. Molecular determination of genetic variation in *Pisolithus* isolates from a defined region in New South Wales, Australia. **New Phytol.**, New York, 138:151-162, 1998.
- 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.
- ABUZINADAH, R.A.; READ, D.J. The role of proteins in the nitrogen nutrition of ectomycorrhizal plants. **New Phytol.**, 112: 55-60, 1989.
- BADINO JR., A.C. Modelos de Biorreatores. In: **Curso Fermentation Terchnology- módulo II: Fermentação por fungos filamentosos**, Projeto ALFA-Rede BIOENGE, EQA-UFSC, Florianópolis, 31p., 2000.
- BALLICA, R.; RYU, D.D.Y.; KADO, C. Propane alkaloid production in *Datura stramonium* suspension cultures. **Biotechnol. Bioeng.**, 41:1075-1081, 1993.
- 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 cirlift contactors, **Biotechnol. Bioeng.**, 27:369-381, 1985.

- BENSON, E.E. Cryopreservation. In: Dixon, R.A. e Gonzales, R.A. (eds.), **Plant cell culture – a practical approach**, 2ed., Oxford: Oxford University Press, p.147-167, 1994.
- BERTOLLO, F.B.; BADINO Jr., A.C.; SUAZO, C.A.T. Crescimento do fungo *Penicillium chrysogenum* no bioprocesso de produção de penicilina. In: **Anais 3^o Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, Belo Horizonte, 2000.
- BONFANTE, P.; PEROTTO, S. Tansley Review no.. 82 - Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. **New Phytol.**, 130:3-21, 1995.
- 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.
- BOOKER, C.E. Free and bound amino acids in the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. **Mycol.**, 72: 869-881, 1980.
- 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 comecial tree seedlings nurseries. **C. J. For. Res.** 17:1418-1486, 1987.
- BUSHELL, M.E.; FRYDAY, A. The application of materials balancing to the characterization of sequential secondary metabolite formation in *Streptomyces cattleya*, NRRL 8057. **J. Gen. Microbiol.**, 129: 1733-1738, 1983.
- CANNEL, E.; MOO-YOUNG, M. Solid-state fermentation systems. **Process Biochemistry**, 15:24-28, 1980.
- CAO, W.; CRAWFORD, D.L. Carbon nutrition and hydrolytic and cellulolytic activities in the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. **Can. J. Bot.**, 39:529-535, 1993.

- CAIRNEY, J.W.G. Intraspecific physiological variation: implications for understanding functional diversity in ectomycorrhizal fungi. *Mycor.*, 9:125-135, 1999.
- CAIRNEY, J.W.G; CHAMBERS, S.M. Interactions between *Pisolithus tinctorius* and its hosts: a review of current knowledge. *Mycor.*, 7:117-131,1997.
- CHISTI, M.Y. **Airlift Bioreactors**. Elsevier Applied Sciences, London, 345p, 1989.
- DICKIE, I.A.; KOIDE, R.T.; STEVENS, C.M. Tissue density and growth response of ectomycorrhizal fungi to nitrogen source and concentration. *Mycor.*, 8:145-148, 1998.
- 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.
- ERIKSON, L.E.; PATEL, S.A.; GLASGOW, L.A. LEE. Effects of viscosity and small bubble segregation on mass transfer in airlift fermenters. *Proc. Biochem.*, 18: 16-20, 1983.
- FRANK, B. On the root – symbiosis – depending nutrition through hypogeous fungi of certain trees. *Berichte der deutschen botanischen Gesellschaft*, 3:128-145, 1885.
- 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.
- GARBAYE, J. Utilisation des mycorhizes en sylviculture. In: Strullu, D.G. (ed.) **Les mycorhizes des arbres et plantes cultivées**. Paris: Lavoisier, p.197-248, 1990.
- 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.
- GOMES, E.A.; ABREU, L.M.; BORGES, A.C.; ARAÚJO, E.F. ITS sequences and mitochondrial DNA polymorphism in *Pisolithus* isolates. **Mycol. Research.**, 104:911-918, 2000.
- GRANADE, T.C.; HEHMANN, M.F.; ARTIS, W.M. Monitoring of filamentous fungal growth by *in situ* microspectrophotometry, fragmented mycelium absorbance density and ¹⁴C incorporation: alternatives to mycelial dry weight. **Appl. Environ. Microbiol.**, 49:101-106, 1985.
- HAMER, G. Chemical Engineering and Biotechnology, In: Higgins, I.J.; Best, D.J.; Jones, J., (eds.), **Biotechnology: Principles and Applications**, London: Blackwell Scientific Publications, p.346-414, 1985.
- HANSSON, G., SEIFERT, G. Effects of cultivation techniques and media on yields and morphology of the basidiomycete *Armillaria mellea*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 26:468-473, 1987.
- HARVEY, L.M. Cultivation techniques for the production of ectomycorrhizal fungi. **Biotechnol. Adv.**, 9:13-29, 1991.
- HATCHELL, G.; MARX, D.H. Response of long leaf, sand, and loblolly pines to *Pisolithus* ectomycorrhizae and fertilizer on a Sandhills site in South Carolina. **For. Sci.**, 33:301-315, 1987.
- HEINRICH, P.A.; MULLIGAN, D.R.; PATRICK, J.W. The effect of ectomycorrhizas on the phosphorus and dry weight acquisition of *Eucalyptus* seedlings. **Plant Soil**, 109:147-149, 1988.

- HOBBS, G.; FRAZER, C.M.; GARDNER, D.C.J.; CULLUM, J.A.; OLIVER, S.G. Dispersed growth of *Streptomyces* in liquid culture. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 31:272-278, 1989.
- HODGSON, D.A. Glucose repression of carbon source uptake and metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and its perturbation in mutants resistant to 2-deoxyglucose. **J. Gen. Microbiol.**, 128:2417-2423, 1982.
- 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.
- HUNT, G.R.; STIEBER, R.W. Inoculum development. In: Demain, A.L., Solomon, N.A. (eds.), **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Washington: American Society of Microbiology, p.32-40, 1986.
- HÜPPE, P.; HÖKE, H.; HEMPEL, D.C. Biological treatment of effluents from coal tar refinery using immobilised biomass. **Chem. Eng. Technol.**, 13:3-79, 1990.
- JOLICOEUR, M.; WILLIAMS, R.D.; CHAVARIE, C.; FORTIN, J.A.; ARCHAMBAULT, J. Production of *Glomus intraradices* propagules an arbuscular mycorrhizal fungus, in an airlift bioreactor. **Biotechnol. Bioeng.**, 63:224-232, 1999.
- KESSLER, W.R.; POPOVIC, M.K.; ROBINSON, C.W. Xanthan production in a external-circulations-loop. airlift bioreactors. **Can. J. Chem. Eng.**, 71:101-106, 1993.
- KOENIG, B.; SEEWALD, C.; SHÜGERL, K. Penicillin production in a bubble column airlift loop reactor. **Adv. Biotechnol.**, 1:573-579, 1981.
- KOPE, H.H. FORTIN, J.A. The efficacy and variation in the production, of antifungal antibiotic metabolites by *Pisolithus arhizus*. In: Alen, M.F., Williams, S.E. (eds.), **Proceedings of the 8th North American Conference on Mycorrhizae**, Jackson: Univ. of Wyoming, p.169, 1990.

- KROPACEK, K.; KRISTÍNOVÁ, M.; CHMELÍKOVA E.; CUDLÍN, P. The mycorrhizal inoculation potential of forest soils exposed to different pollution stress. **Agric., Ecosystem. Environ.**, 28:271-277, 1989.
- 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.
- KWOK, K.H.; TSOULPHA, P.; DORAN, P.M. Limitations associated with conductivity measurement for monitoring growth in plant tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 29:93-99, 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.
- LE TACON, F.; GARBAYE, J.; CARR, G. The use of mycorrhizas in temperate and tropical forests. **Symbiosis**, 3:179-205, 1987.
- LE TACON, F.; JUNG, G.; MUGNIER, J.; MICHELOT, P. Efficiency in a forest nursery of an ectomycorrhizal fungus inoculum produced in a fermenteur an entrapped in polymeric gels. **Can. J. Bot.**, 63:1664-1668, 1985.
- LEVEAU, J.Y.; BOUIX, M. Bioengenharia. In: Scriban R., (Coord.), **Biotechnology**, p.124-175, Ed. Manole, 1985.
- LEYVAL, C.; BERTHELIN, J. Interactions between *Laccaria laccata*, *Agrobacterium radiobacter* and beech roots: influence on P, K, Mg, and Fe mobilization from minerals and plant growth. **Plant Soil**, 117:103-110, 1989.
- LITCHFIELD, J.H.; ARTHUR, M.F. Growth of selected ectomycorrhizal fungi in aerated liquid culture. **Develop. Ind. Microbiol.**, 24:289-293, 1983.

- MALFAIT, J.L.; WILCOX, D.J.; MERCER, D.G.; BARKER, L.D. Cultivation of a filamentous mould in a glass pilot scale fermentor. **Biotechnol. Bioeng.**, 23:863-877, 1981.
- MARX, D.H. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic fungi and soil bacteria. **Phytopatol.** 59:153-163, 1969.
- MARX, D.H. *Pisolithus tinctorius* Ectomycorrhizae improve survival and growth of pine seedlings on acid coal spoils in Kentucky and Virginia. **Reclamation Review**, 2:23-31, 1979.
- 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. Soil pH and nitrogen influence *Pisolithus* ectomycorrhizal development and growth of loblolly pine seedlings. **For. Sci.**, 36:224-245, 1990.
- 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. 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.; CORDELL, C.E.; MAUL, S.B.; RUEHLE, J.L. Ectomycorrhizal development on pine by *Pisolithus tinctorius* in bare-root and container seedling nurseries I. Efficacy of various vegetative inoculum formulation. **New Forests**, 3:45-56, 1989.
- 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.
- METZ, B.; KOSSEN, N.W.F. The growth of moulds in the form of pellets – a literature review. **Biotechnol. Bioeng.**, 19:781-787, 1977.
- MEYRATH, J.; SUCHANEK, G. Inoculation techniques – effects due to quality and quantity of inoculum. In: Norris, J.R., Ribbons, D.W. (eds.), **Methods in Microbiology**, p.159-209. London: Academic Press, 1972.
- MITARD, A.; RIBA, J.P. Morphology and growth of *Aspergillus niger* ATCC 26036 cultivated at several shear rates. **Biotechnol. Bioeng.**, 32: 835-841 1988.
- MURANAKA, T.; OHKAWA, H.; YAMADA, Y. Continuous production of scopolamine by a culture of *Duboisia leichhardtii* hairy root clone in a bioreactor system. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 40:219-223, 1993.
- NETTO, W.S. Cinética de processos fermentativos. In: **Curso Fermentation Technology**, Projeto ALFA-Rede BIOENGE, EQA-UFSC, Florianópolis, 27p., 1999.
- NEWSHAM, K.K.; FITTER, A.H.; WATKINSON, A.R. Multi-functionality and biodiversity in arbuscular mycorrhizas, **Tree**, 10:407-411, 1995.
- OLIVEIRA, M.S.; PRADELLA, J.G.C.; LOPES, S.A.R.; SILVA, E.S. Estudo do meio de cultura a ser empregado na obtenção de micélio de *Pisolithus tinctorius*. In: **Resumos do VIII SINA Ferm**, 5p., São Lourenço, 1988.

- 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 3ª. Reunião Brasileira sobre Micorrizas**, Piracicaba, p.102, 1989.
- OLIVEIRA, V.L.; GIACHINI, A.J. Ecologia e aplicação de ectomicorrizas. In: Siqueira, J.O.; Moreira, F.M.S.; Lopes, A.S.; Guilherme, L.R.G.; Faquin, V.; Neto Furtini, A.E.; Carvalho, J.G. (eds.), **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**, Lavras, SBCS, p.775-796, 1999.
- ONKEN, U.; WEILAND, P. Airlift fermenters: construction, behaviour and uses. In: Mizrahi, A; Van Werzel, L. (eds.), **Adv. Biotech. Proc.**, New York: Alan R. Liss, p.67-95, 1983.
- PACKER, H.L.; MOORE, K.; LILLY, M.D.; THOMAS, C.R. Estimation of cell volume and biomass of *Penicillium chrysogenum* using image analysis. **Biotechnol. Bioeng.**, 39:84-91, 1992.
- PEDRINI, M.R.S. **Desenvolvimento e aplicações de um biorreator airlift com circulação externa**. Dissertação de Mestrado (Engenharia Química). Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), 101p., 1997.
- PETERSON, R.L.; PICHÉ, Y.; PLENCHETTE, C. Mycorrhizae and their potential use in the agricultural and forestry industries. **Biotechnol. Advan.**, 2:101-120, 1984.
- PIROZYNSKY, K.A. Interactions between fungi and plants through the ages. **Can. J. Bot.**, 59:1824-1827, 1981.
- 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. Engin.**, 15:279-290, 1996.
- POPOVIC, M.; ROBINSON, C.W.; External-circulation-loop airlift bioreactors: study of the liquid circulating velocity in highly viscous non-Newtonian liquids. **Biotechnol. Bioeng.**, 32:301-312, 1988.

- 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., 1991a.
- 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, 1991b.
- PROSSER, J.I.; TOUGH, A.J. Growth mechanisms and growth kinetics of filamentous microorganisms. **Crit. Rev. Biotechnol.**, 10:253-274, 1991.
- REISENBERG, D.; BERTGER, F. Establishment of a system suitable for analysis of balanced and unbalanced growth of *Streptomyces hygroscopicus*. **J. Gen. Microbiol.**, 130:2543-2549, 1984.
- 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 Journal**, 32:1585-1596, 1986.
- SIEGEL, M.H.; ROBINSON, C.W. Application of airlift gas-liquid-solid reactors in Biotecnology. **Chem. Engin. Sci.**, 47:3387-3394, 1992.
- 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.
- SOUZA, O. **Contribuição ao estudo do cultivo de *Pisolithus* sp. Pt-24 por processo semi-sólido: Influência da concentração inicial de glicose, temperatura de incubação e umidade do meio sobre a produtividade do processo.** Dissertação de Mestrado, USP-IPT-Instituto Butantan. São Paulo, 137p., 1996.

- STANBURY, P.F.; WHITAKER, A.; HALL, S.J. **Principles of Fermentation Technology**, 2ª. edição, New York: Pergamon, 357p., 1995.
- SU, W.W.; HE, B. Secreted enzyme production by fungal pellets in a perfusion bioreactor. **J. Biotechnol.**, 54:43-52, 1997.
- SYLVIA, D.M. Mycorrhizal associations. In: SYLVIA, D.M.; FUHRMANN, J.F.; HARTEL, P.G.; ZUBERER, D.A. (eds.). **Principles and Applications of soil Microbiology**. New Jersey: Prentice Hall, p. 428-426, 1998.
- THEODOROU, C. Introduction of mycorrhizal fungi into soil by spore inoculation of seed. **Austr. For.**, 35:23-26, 1971.
- TINKER, P.B. The role of microorganisms in mediating and facilitating the uptake of plant nutrients from soil. **Plant Soil**, 76:77-91, 1984.
- TISDALL, J.M.; SMITH, S.E.; RENGASAMY, P. Aggregation of soil by fungal hyphae. **Austr. J. Soil Res.**, 35: 55-60, 1997.
- TOMMERUP, I.C.; BOUGHER, N.L. The role of ectomycorrhizal fungi in nutrient cycling in temperate Australian woodlands. In: R.J. Hobbs e C.J. Yates (eds), **Temperate eucalypt woodlands in Australia: biology, conservation, management and restoration**, Chipping Norton: Beatty & Sons, p.190-224, 2000.
- TRINDER, P. Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. **J. Clin. Pathol.**, 22:158-161, 1969.
- TURNBULL, M.H.; GOODALL, R.; STEWART, G.R. The impact of mycorrhizal colonization upon nitrogen source utilization and metabolism in seedlings of *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden and *Eucalyptus maculata* Hook. **Plant, Cell Environ.**, 18:1386-1394, 1995.
- 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 SUIJDAM, J.C.; METZ, B. Influence of engineering variables on the morphology of filamentous moulds, **Biotechnol. Bioeng.**, 23:111-117, 1981.
- VANHOUTTE, B.; PONS, M.N.; THOMAS, C.R.; LOUVEL, L.; VIVIER, H. Characterization of *Penicillium chrysogenum* physiology in submerged cultures by color and monochrome image analysis. **Biotechnol. Bioeng.**, 48:1-11, 1995.
- VITALIS, S.; BIRO, S.; VARGHA, G.; BEKESI, T.; SZABO, G. Differentiation and its regulation in submerged cultures of *Streptomyces griseus*. **Zentralbl. Bakteriol. Abt. 1, Suppl.**, 11:153-159, 1981.
- VODNIK, D.; BYRNE, A.R.; GOGALA, N. The uptake and transport of lead in some ectomycorrhizal fungi in culture. **Mycol. Res.**, 102: 953-958, 1998.
- VOET, D.N.; VOET, J.G. **Biochemistry**, 2 ed., New York, Jonh Wiley & Sons, Inc., 1360p., 1995.
- WILKINS, D.A. The inflence 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.
- 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.
- ZANGIROLAMI, T.C.; JOHANSEN, C.L.; NIELSEN, J.; JØRGENSEN, S.B. Simulation of penicillin production in fed-batch cultivation using a morphologically structured model. **Biotechnol. Bioeng.**, 56:593-604, 1997.

ANEXOS

Dados que geraram as figuras 4.1 e 4.2:

Tempo (dias)	Glicose res. (g.L ⁻¹)	Biomassa PS (g.L ⁻¹)	pH	Condutividade (mS)	Dens.ótica (540 nm)
0	10,03	0,02	5,55	1,082	0,020
7	8,89	0,34	3,25	1,175	0,031
14	6,34	0,93	2,48	1,340	0,037
21	4,40	1,73	2,45	1,357	0,049
24	3,57	1,98	2,52	1,350	0,062
30	3,52	2,01	2,44	1,387	0,111
34	3,57	2,04	2,38	1,398	0,150
37	3,55	2,00	2,43	1,389	0,178

Dados que geraram as tabelas 4.3, 4.4 e 4.5:

ensaio	Níveis codificados das variáveis			Respostas dos experimentos 1, 2 e 3 (g.g ⁻¹)		
	Glicose	Peptona	Extratos	Z _{(1)X/S}	Z _{(2)X/S}	Y _{X/S}
1	-1	-1	-1	0,419	0,443	0,379
2	+1	-1	-1	0,398	0,414	0,374
3	-1	+1	-1	0,476	0,497	0,433
4	+1	+1	-1	0,476	0,455	0,467
5	-1	-1	+1	0,381	0,413	0,395
6	+1	-1	+1	0,392	0,419	0,418
7	-1	+1	+1	0,395	0,432	0,468
8	+1	+1	+1	0,423	0,418	0,526

Dados que geraram as figuras 4.16, 4.17 e 4.18:

Tempo (dias)	Glicose res. (g.L ⁻¹)	Biomassa PS (g.L ⁻¹)	pH	Dens. ótica (480 nm)
0	12,25	0,08	5,65	0,061
3	11,85	0,28	5,24	0,204
5	10,60	0,78	4,62	0,430
7	9,00	1,49	4,28	0,566
9	5,87	3,31	3,37	0,678
10	2,09	4,54	2,63	0,350
11	0,01	5,02	2,56	0,275

Dados que geraram as figuras 4.20 e 4.22:

Tempo (dia e hora)	Glicose res. (g.L ⁻¹)	Biomassa estimada (g.L ⁻¹)	pH
07/09 19:00	11,41	0,09	5,40
09/09 14:40	11,24	0,17	5,35
11/09 17:50	10,54	0,46	5,05
12/09 16:15	9,47	0,91	4,93
13/09 18:00	7,38	1,78	4,61
14/09 14:40	5,92	2,39	4,33
15/09 18:00	3,37	3,46	3,82
16/09 19:00	1,68	4,17	3,50
17/09 10:15	0,08	4,83	3,45
18/09 14:25	0,00	4,87	3,49

Dados das figuras 4.23 e 4.24:

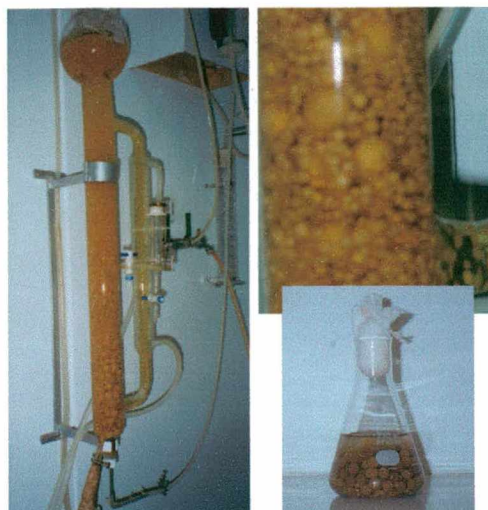
Tempo (dia e hora)	Glicose res. (g.L ⁻¹)	Biomassa estimada (g.L ⁻¹)	pH
07/12/00 13:22	10,57	0,26	5,54
08/12/00 17:30	10,56	0,26	5,63
10/12/00 11:45	10,46	0,28	5,54
13/12/00 15:10	10,55	0,27	5,33
15/12/00 19:20	10,30	0,37	4,56
16/12/00 22:00	9,98	0,50	3,68
17/12/00 20:00	9,40	0,73	3,18
18/12/00 16:15	8,71	1,01	2,82
19/12/00 17:40	8,10	1,26	2,52
20/12/00 18:20	7,17	1,63	2,33
21/12/00 17:00	6,30	1,98	2,22
22/12/00 19:00	4,74	2,62	2,15
23/12/00 14:20	3,73	3,02	2,08
24/12/00 10:00	3,32	3,19	2,06

Dados de cultivo contaminado por *Penicillium* sp.:

Y_x/s₀,594

Data amostragem	Glicose (g.L ⁻¹)	Biomassa estimada (g.L ⁻¹)	pH
11/ago	11,54	0,20	5,45
12/ago	11,65	0,13	5,44
13/ago	11,29	0,35	5,41
14/ago	10,73	0,68	5,42
16/ago	8,31	2,12	4,62
16/ago	6,70	3,07	4,48
17/ago	5,32	3,89	3,40
17/ago	3,96	4,70	3,62
18/ago	0,0	7,05	3,70

Aspecto dos pellets de
Penicillium sp.



A tabela abaixo apresenta uma composição para do de cultura, para cultivo de *P. microcarpus* que pode fornecer conversões de substrato em biomassa da ordem de 50%, com custo aproximadamente 14% inferior ao meio L&A/K:

Ingredientes	L&A/KM (g.L ⁻¹)
Glicose	14,0
Peptona de soja	5,0
Extrato de malte	3,0
NH ₄ NO ₃	1,0
KH ₂ PO ₄	0,264
K ₂ HPO ₄	0,628
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,330
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,0021
MnCl ₂ .4H ₂ O H ₄ NO ₃	0,0004
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,0006
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,0005
Relação C/N	9/1

Protocolo para produção de inoculante de *P. microcarpus*:

1. Cortar aproximadamente 60 discos de micélio de 8 mm de diâmetro, de culturas em placas com aproximadamente 30 dias de idade. Deixar os discos em meio sólido em placas durante dois dias para confirmar a viabilidade;

2. Preparar 300 mL de meio L&A/KM (composição da tabela anterior), corrigir o pH com tampão A/C até pH 5,4, e distribuir 25 mL em 10 erlenmeyers de 250 mL de capacidade. Vedar os frascos com 3 camadas de papel alumínio e duas camadas de papel craft;
3. Esterilizar os frascos durante 20 minutos a 121 °C;
4. Inocular 5 discos de micélio por frasco, tampar com o papel alumínio, lacrar com plástico PVC (para evitar entrada de ácaros) e depois com o papel craft;
5. Incubar durante 12 dias, estaticamente no escuro, a 25 °C;
6. Fragmentar em duas etapas os tapetes micelianos (crescidos nos frascos) em 250 mL de meio fresco esterilizado, utilizando liquidificador durante 6 a 7 segundos. Vedar os frascos com papel alumínio, PVC e papel e incubar até confirmar a viabilidade. Para cada suspensão miceliana,, fazer duas placas de controle, e incubar durante 3 dias para confirmar a viabilidade do inóculo;
7. Preparar 2,5 L de meio L&A/KM, corrigir o pH com tampão A/C até 5,4, e esterilizar durante 40 min. a 121 °C;
8. Inocular a suspensão miceliana do conteúdo de um frasco nos 2,5 L de meio, e transferir 2,3 L para *airlift*, deixando 200 mL para controle;
9. Cultivar no escuro, a temperatura de 25,5 °C, com vazão de ar de 0,8 +/-0,2 L.min⁻¹, até exaustão completa da glicose. Retirar amostra diariamente para verificar a concentração de glicose residual e pH.