



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL REI
CAMPUS ALTO PARAÓPEBA
GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

Elielbert Coura Soares

**CONSTRUÇÃO DE UM BIORREATOR DE BAIXO CUSTO PARA PRODUÇÃO DE
BACTÉRIAS FIXADORAS BIOLÓGICAS DE NITROGÊNIO**

Orientador: Dr. Brener Magnabosco Marra

OURO BRANCO – MG

Abril 2017

Elielbert Coura Soares

**CONSTRUÇÃO DE UM BIORREATOR DE BAIXO CUSTO PARA PRODUÇÃO DE
BACTÉRIAS FIXADORAS BIOLÓGICAS DE NITROGÊNIO**

Trabalho de Conclusão de
Curso apresentado em cumprimento
às exigências do Curso de
Bacharelado em Engenharia de
Bioprocessos da Universidade
Federal de São João Del Rei.

OURO BRANCO – MG

Abril 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL REI
CAMPUS ALTO PARAÓPEBA
GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

**CONSTRUÇÃO DE UM BIORREATOR DE BAIXO CUSTO PARA PRODUÇÃO DE
BACTÉRIAS FIXADORAS BIOLÓGICAS DE NITROGÊNIO**

Elielbert Coura Soares

A Banca Examinadora, composta pelos membros abaixo, avaliou este TCC:

Orientador: Prof. Dr. – Brener Magnabosco Marra

1º Examinador: Prof. Dr. – Boutros Sarrouh

2º Examinador: Prof. Dr. – Edson Romano Nucci

Ouro Branco 27/04/2017

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho de conclusão de curso a Deus e aos amigos espirituais que me inspiraram e intuíram como contornar cada dificuldade encontrada durante o trabalho.

Dedico à minha querida mãe Luzia Maria Coura Soares por todo carinho e apoio nas horas difíceis de minha vida e sempre dando oportunidade para que eu pudesse chegar onde estou. Dedico ao meu pai Umberto Soares por ter me ensinado as engenharias práticas que ele pôde aprender ao longo da vida.

Dedico aos professores de boa vontade que contribuíram para o meu conhecimento.

Dedico a todos aqueles que lutam por uma sociedade mais igualitária e mais justa em que todos possam desfrutar de bons alimentos em qualidade e em abundância.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao orientador Brenner Magnabosco Marra (professor de Bioenergia, Bioquímica Tecnológica e Biotecnologia Ambiental) pela oportunidade de me proporcionar esse trabalho de suma importância para a agronomia, para a sociedade.

Ao 1º integrante da banca examinadora Boutros Sarrouh (professor de Estequiometria Industrial, Tópicos em Operações Unitárias I e II).

Ao 2º integrante da banca examinadora Edson Romano Nucci (professor de Modelagem e Dinâmica de Bioprocessos).

Ao José Carlos Guimarães (professor de Biologia Geral, Microbiologia e Laboratório Biotecnológico).

Ao Ênio Nazaré (professor de Mecânica dos Fluidos, Laboratório de Engenharia de Bioprocessos II e Laboratório Biotecnológico).

Ao Pedro Mitsuo Shiroma (professor de Projeto e Computação Gráfica I).

Ao Sandro Adriano Fasolo (professor de Eletrotécnica).

Ao Antônio Helvécio Tótolá (professor de Bioquímica Básica e Imunologia).

À Flávia Donária (professora de Projeto de Biorreatores, Cinética e Cálculo de Biorreatores).

À Isabel Braga (professora de Biotecnologia Ambiental e Biologia Molecular).

Ao Laboratório Farroupilha por gentilmente ceder as bactérias.

Ao Wesley (técnico de laboratório de Microbiologia).

À Priscilla (técnica de Laboratório Biotecnológico).

À Giceli (técnica de Laboratório de química).

Ao Ricardo (técnico de Elétrica).

Aos colegas Engenheiros de Bioprocessos: Willer Ferreira, Marcos Bittencourt, Ligiane Félix, Felipe Lucas, Thaís Moraes, Iara Alvarenga e Túlio Almeida.

Ao porteiro Miguel.

Ao companheiro de república Tiago Chaves (Engenheiro Mecatrônico) pela inestimável ajuda desde os primeiros esboços dos biorreatores, até a montagem dos mesmos.

**“As melhores ideias são inúteis se
forem mantidas apenas com os
seus idealizadores” .
(Autor Desconhecido)**

O objetivo do presente trabalho foi construir um biorreator de baixo custo com o propósito de multiplicar bactérias fixadoras de nitrogênio; bastante utilizadas em agricultura na fixação biológica de nitrogênio como forma alternativa e sustentável de adubação biológica a ser usada pelos produtores rurais barateando seus custos de produção. Com auxílio de um *software* de computação gráfica o *AUTOCAD* foi possível desenhar em escala real que ao fim culminou em um biorreator de volume útil de 50L, usando materiais encontrados facilmente em lojas de materiais de construção ao custo total de R\$ 100 reais. Foi utilizado neste biorreator o inoculante líquido contendo a bactéria *Azospirillum brasilense* cepa Ab-V5 de concentração 10^8 UFC/mL. Além do biorreator de volume útil de 50L foi construído um mini biorreator utilizando garrafa PET de 2L e de volume útil de 1,5L como ensaio em pequena escala. Utilizou-se um meio de cultura alternativo composto por fubá de milho 15g/L (como fonte de vitaminas e minerais), açúcar 30g/L (como fonte de carbono), ureia 6g/L (como fonte de nitrogênio), ácido fosfórico 0,15g/L (como fonte de fósforo) e bicarbonato de sódio (0,25 g/L (como alcalinizante). Segundo dados de literatura, o pH ótimo de crescimento dessa bactéria é na faixa de 6,0 a 7,0 e temperatura ótima de crescimento de 30 a 33°C. Tanto no biorreator de 2L quanto no de 55L foi usado pH inicial 7,22 e temperatura de 33°C em ambos com auxílio de um aquecedor com termostato de potência 200W e 110V. Obteve-se bons resultados quanto a multiplicação do *Azospirillum brasilense* nos dois biorreatores que por método de espectrofotometria foi possível o cálculo do rendimento no biorreator PET 2L baseando-se nas informações contidas no rótulo do produto AZOS que foi cedido pelo Laboratório Farroupilha. Este indica a aplicação de 500mL/hectare e de posse desses dados e cálculos foi possível mensurar a área fertirrigada pelo sistema PET 2L, sendo de 1,3 hectares/batelada ao custo de 0,68 reais/hectare e pelo biorreator de 55L foi 44,44 hectares/batelada ao custo de 0,61 reais/batelada.

O rendimento do sistema PET 2L foi 230 vezes o número de bactérias iniciais, já o rendimento em biorreator de 55L foi de 148 vezes o número de bactérias inicial. O menor rendimento deste biorreator pode ter sido ocasionado por uma menor aeração do meio de cultivo devido a baixa potência do compressor de ar.

Palavras Chave: Biorreator Fixação Biológica de Nitrogênio; Bactérias; *Azospirillum brasilense*; Espectrofotômetro.

Figura 1: <i>Azospirillum brasilense</i>	7
Figura 2: <i>Rhizobium</i> sp.	7
Figura 3: Mecanismo de fixação de nitrogênio.....	8
Figura 4: Estrutura da raiz pós infecção por bactéria diazotrófica.....	9
Figura 5 : Fixação biológica de Nitrogênio pelo complexo enzimático.....	10
Figura 6 : Desenho esquemático do biorreator tipo coluna de bolhas.....	14
Figura 7 : Desenho esquemático do biorreator <i>airlift</i> tipo “ <i>split cylinder</i> ”.....	16
Figura 8 : Desenho esquemático de um biorreator tipo <i>airlift</i> de cilindros concêntricos.....	16
Figura 9 : Curva de crescimento microbiano indicando fase lag, log, estacionária e declínio.....	18
Figura 10: Ilustração de um Espectrofotômetro.....	20
Figura 11: Transmitância. I_0 (Feixe de luz incidente) , I (feixe de luz transmitido), b espessura da cubeta.....	21
Figura 12: Biorreator PET 2L e seus componentes.....	22
Figura 13: Desenho 2D indicando as dimensões das peças e suas disposições no biorreator de 55L	25
Figura 14: Desenho 3D da vista lateral do módulo interno do biorreator de 55L.....	25
Figura 15: Foto do módulo interno do biorreator de 55 L.....	26
Figura 16: Sistema de aquecimento, aferição de temperatura e aeração.....	26
Quadro 1: Diluição do produto AZOS em meio de cultura para construção de uma “curva padrão”.....	30
Figura 17: Curva padrão do <i>Azospirillum brasilense</i> diluído em meio de cultura alternativo.....	31
Figura 18: Produto comercial AZOS.....	39
Figura 19: Disposição do sistema PET 2L.....	39
Figura 20: Biorreator PET 2L contendo meio de cultura alternativo e inóculo <i>Azospirillum brasilense</i> cepa Ab-V5 em tempo zero (logo após inoculação)....	40
Figura 21: Biorreator PET 2L contendo meio de cultura alternativo e inóculo <i>Azospirillum brasilense</i> cepa Ab-V5 vinte e quatro horas após inoculação.....	40

Figura 22: Curva de crescimento do <i>Azospirillum brasilense</i>	41
Figura 23: Curva de pH do meio de cultura do biorreator PET 2L ao longo de 24 horas.....	42
Figura 24: Biorreator de 55L e seu sistema de aeração por compressor de 80W e 110V.....	43
Figura 25: Interior do biorreator de 55L 24horas após inoculação com <i>Azospirillum brasilense</i> cepa Ab-V5	43
Figura 26: Tubos Falcon.....	43
Figura 27: Visualização microscópica de uma lâmina contendo produto comercial AZOS (<i>Azospirillum brasilense</i>) corado com verde malaquita e com aumento de 100 vezes.....	45
Figura 28: Visualização microscópica de uma lâmina contendo <i>Azospirillum brasilense</i> 28 horas após inoculação em biorreator de 55L, corado com safranina e com aumento de 100 vezes.....	45
Figura 29: Curva de crescimento do <i>Azospirillum brasilense</i> em biorreator de 55L.....	46
Figura 30: Curva de pH do meio de cultura do biorreator de 55L ao longo de 48 horas.....	47

Tabela 1: Tabela de absorvância à 600nm do meio de cultura do biorreator PET 2L e seus respectivos tempos.....41

Tabela 2: pH do meio de cultura do biorreator PET 2L e seus respectivos tempos.....42

Tabela 3: Absorvância do meio de cultura do biorreator de 55 L e seus respectivos tempos.....46

Tabela 4: pH do meio de cultura do biorreator de 55L e seus respectivos tempos.....47

SUMÁRIO

Páginas

RESUMO.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	ii
LISTA DE TABELAS.....	iii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1 . O Que é Fixação Biológica de Nitrogênio?.....	4
3.2. Microrganismos Fixadores de Nitrogênio.....	6
3.3. Processo de Infecção das Raízes pelas Bactérias da FBN.....	8
3.4. Obtenção de Nitrogênio por Síntese Biológica.....	9
3.5. Inoculação.....	11
3.6. Condições Ótimas de Cultivo do <i>Azospirillum brasilense</i>	11
3.7. Impactos Ambientais Causados pelo Uso de Adubação Inorgânica.....	12
3.8. Importância Econômica dos Inoculantes Agrícolas como Alternativa Sustentável.....	13
3.9. Biorreatores Pneumáticos.....	14
3.10. Cultura de Microrganismos.....	17
3.11. Quantificação de Microrganismos por Espectrofotometria.....	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
4.1. Biorreator PET 2L	21
4.1.1. Materiais usados na Construção do Biorreator PET 2L.....	21
4.1.2. Preparo do meio de Cultura do Biorreator PET 2L.....	22
4.1.3. Inoculação do meio de cultura do Biorreator PET 2L.....	23
4.1.4. Construção da Curva de Crescimento do <i>Azospirillum brasilense</i> em Biorreator PET 2L.....	23
4.1.5. Construção da Curva de pH do <i>Azospirillum brasilense</i> em Biorreator PET 2L.....	24
4.2. Biorreator de 55L.....	24
4.2.1. Desenho do Biorreator de 55L.....	24
4.2.2 Materiais Usados na Construção do Biorreator de 55L.....	27
4.2.3. Preparo do meio de cultura do Biorreator de 55L.....	27
4.2.4. Inoculação do <i>Azospirillum brasilense</i> em Biorreator de 55L.....	28

4.2.5. Construção da Curva de Crescimento do <i>Azospirillum brasilense</i> em Biorreator de 55L.....	29
4.2.6. Construção da Curva de pH do <i>Azospirillum brasilense</i> em Biorreator de 55L.....	29
4.3. Quantificação do <i>Azospirillum brasilense</i> em Biorreator PET 2L.....	30
4.4. Quantificação do <i>Azospirillum brasilense</i> em Biorreator de 55L.....	32
4.5. CUSTOS.....	33
4.5.1. Custo de Cada Batelada em Biorreator PET 2L.....	33
4.5.1.1. Custos dos Reagentes.....	33
4.5.1.2. Custo da Aeração.....	33
4.5.1.3. Custo do Aquecimento.....	34
4.5.2. Custo de Cada Batelada em Biorreator de 55L.....	35
4.5.2.1. Custos dos Reagentes.....	35
4.5.2.2. Custo da Aeração.....	36
4.5.2.3. Custo do Aquecimento.....	36
4.6. CÁLCULO DE ÁREA DE FERTIRRIGAÇÃO.....	37
4.6.1. Cálculo de Área Fertirrigada pelo Biorreator PET 2L.....	37
4.6.2. Cálculo de Área Fertirrigada pelo Biorreator de 55L.....	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5.1. Biorreator PET 2L.....	39
5.1.1. Inoculação do Meio de Cultura do Biorreator PET 2L	39
5.1.2. Curva de Crescimento do <i>Azospirillum brasilense</i> em Biorreator PET 2L.....	41
5.1.3. Curva de pH do <i>Azospirillum brasilense</i> em Biorreator PET 2L	42
5.2. Biorreator de 55L.....	43
5.2.1. Inoculação do Meio de Cultura em Biorreator de 55L.....	43
5.2.2. Curva de Crescimento do <i>Azospirillum brasilense</i> em Biorreator de 55L.....	46
5.2.3. Curva de pH do <i>Azospirillum brasilense</i> em Biorreator de 55L.....	47
CONCLUSÃO.....	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

1. INTRODUÇÃO

O crescimento da população mundial, que deve atingir 8 bilhões de pessoas em 2030, demanda maior oferta de alimentos, para sua produção será necessário o desenvolvimento e utilização de tecnologias que garantam a segurança alimentar, mas preservem o meio ambiente. É evidência a urgência em manter os recursos naturais, pois, somente nas últimas cinco décadas, estima-se que cerca de 2 dos 8,7 bilhões de hectares de terras agricultáveis, pastagens permanentes e florestas do mundo tenham sido degradadas (HUNGRIA *et al.*, 2007).

O nitrogênio (N), por ser um constituinte dos ácidos nucleicos e de proteínas, é o nutriente requerido em maior quantidade pelas plantas. A soja *Glycine max.*, por ter teor elevado de proteínas nos grãos a demanda em nitrogênio é elevada e pode obter esse nitrogênio de quatro fontes: 1- o solo, principalmente pela decomposição da matéria orgânica; 2- a fixação não-biológica (resultante de processos naturais, como a reação de descargas elétricas com o N₂, a combustão e o vulcanismo; 3- os fertilizantes nitrogenados; e 4- o processo de fixação biológica do nitrogênio atmosférico N₂ (*Ibidem*).

Sob elevadas temperaturas (entre 500 °C e 600 °C) e alta pressão (cerca de 300 bar), o N₂ combina-se com hidrogênio formando amônia. As condições extremas são necessárias para atingir a alta energia de ativação da reação. Essa reação de fixação de nitrogênio, conhecida como *processo Haber-Bosch*, é o ponto de partida para a fabricação de muitos produtos para a indústria e agricultura (RIBEIRO, D., 2013). Mas essas condições são obtidas industrialmente com alto consumo de combustíveis fósseis, principalmente gás natural, fazendo com que a sustentabilidade energética dos sistemas agrícolas de produção seja comprometida. Além disso, por sua natureza solúvel e pelas transformações que sofre no solo, uma grande parte do nitrogênio aplicado no campo é perdido para o ambiente, podendo eutrofizar corpos d'água, contaminar o lençol freático, e liberar potentes gases de efeito estufa como N₂O (BODDEY *et al.*, 2007 *apud* FERNANDES, V. H. *et al.*, 2014).

O nitrogênio, perfaz 78% da atmosfera na forma gasosa N_2 . Quando o nitrogênio está nessa forma gasosa as plantas não conseguem assimilá-lo. Somente quando certas bactérias, (denominadas diazotróficas ou fixadoras biológicas de nitrogênio), quando em contato com as raízes de soja infectam as mesmas, via pêlos radiculares formando os nódulos. Dentro desses nódulos, as bactérias do gênero *Rhizobium* (ver Figura 2) ou *Azorhizobium* por intermédio de um complexo enzimático formado pela enzima dinitrogenase e nitrogenase redutase, presente em apenas alguns organismos procariontes, conseguem romper a tripla ligação covalente do nitrogênio atmosférico provocando a sua redução até amônia (NH_3). A esta mesma amônia são incorporados íons H^+ , abundantes nas células das bactérias, ocorrendo à transformação em íons NH_4^+ , que serão fornecidos para a planta de soja e milho e assimilados na forma de nitrogênio orgânico. Este processo ocorre na simbiose e associação entre as plantas leguminosas e gramíneas respectivamente quando essas plantas são infectadas por bactérias (HUNGRIA *et al.*, 1997 *apud* BÁRBARO, 2008).

A utilização dos microrganismos na forma de inoculantes biológicos pode ajudar o mercado agrícola, por se tratar de uma tecnologia eficiente para substituir métodos tradicionais de adubação com fertilizantes à base de ureia e, atualmente é utilizado principalmente em culturas de leguminosas e gramíneas, com muito sucesso na cultura de soja e milho (SILVEIRA, 2008 *apud* BITTENCOURT, J.V.M. *et al.*, 2010).

As bactérias pertencentes ao gênero *Rhizobium* (ver Figura 2) são aeróbicas, gram negativas, usualmente produzem poli-b-hidroxibutirato, são móveis, sua temperatura ótima de crescimento está entre 25-30 °C e pH 6-7. Algumas estirpes, porém, podem crescer em extremos de temperatura (4 e 42,5 °C) e pH (4,5 e 9,5). São quimiorganotróficas, utilizando uma série de carboidratos e sais de ácidos orgânicos como fontes de carbono, sem a formação de gás. Celulose e amido não são utilizados. Produzem uma reação ácida em meio contendo sais minerais e manitol ou outros carboidratos e reação alcalina oriunda de uma reação proteolítica. Sais de amônio, nitrato, nitrito e muitos aminoácidos podem servir como fontes de nitrogênio (JORDAN, 1984 *apud* MARIN, A. V. *et al.*, 1999).

As bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) tais como *Azospirillum brasilense* (ver Figura 1) correspondem a um grupo de microrganismos benéficos às plantas devido à capacidade de colonizar a superfície das raízes, rizosfera, filosfera e tecidos internos das plantas. As BPCP podem estimular o crescimento das plantas por diversas maneiras, sendo as mais relevantes: capacidade de fixação biológica de nitrogênio; aumento na atividade da redução do nitrato quando crescem endofiticamente nas plantas; produção de hormônios como auxinas, citocininas, giberilinas, etileno e uma variedade de outras moléculas; solubilização de fosfato; e por atuarem como agente de controle biológico de patógenos. Em geral, acredita-se que as BPCP beneficiam o crescimento das plantas por uma combinação de todos esses mecanismos (STRZELCZYK *et al.*, 1994 apud HUNGRIA, 2011).

Biorreatores são equipamentos utilizados em engenharia de bioprocessos para conversão de matérias primas em produtos de interesse econômico utilizando-se microrganismos, células animais, células vegetais ou enzimas. Dentre as variedades de biorreatores, os mais usados em processos fermentativos, são os do tipo tanque agitado por impelidores e aerados e os biorreatores pneumáticos. Os reatores agitados pneumaticamente se caracterizam basicamente pela ausência do agitador mecânico, sendo a agitação do líquido efetuada apenas pelo borbulhamento de um gás (normalmente ar) no reator. Como consequência da ausência do agitador mecânico, resultam, nesse tipo de reator, menores tensões de cisalhamento, o que os torna atraentes para o cultivo de células animais, células vegetais e bactérias da fixação biológica de nitrogênio (FBN) e bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCP) (SCHMIDELL, W. *et al.*, 1983).

Diante da necessidade de adubação foi proposto a construção de um biorreator de baixo custo para atender os produtores rurais de forma que os mesmos possam construir e operar esses biorreatores em suas propriedades. Diminuindo assim seus custos de produção de alimentos.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral:

- Produzir um biorreator de baixo custo de 55L.

Objetivos Específicos:

- Multiplicar bactérias promotoras do crescimento de plantas;
- Multiplicar, Quantificar e elaborar a curva de crescimento cinético do *Azospirillum brasilense* em cada biorreator;
- Divulgar o sistema de produção nos principais mercados agrícolas do Brasil.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 . O Que é Fixação Biológica de Nitrogênio?

O processo de fixação biológica de nitrogênio é definido como sendo a conversão do nitrogênio molecular (N_2) em amônia ($N_2 \rightarrow 2 NH_3$). Existem, basicamente, duas alternativas para a realização do processo: a) fixação química (industrial) e b) fixação biológica do nitrogênio (FBN).

A fixação química corresponde a reação do nitrogênio com hidrogênio, sob alta temperatura e pressão, conhecido como processo de *Harber-Bosch*, desenvolvido no início do século XX na Alemanha, e tem sido a base de produção dos adubos nitrogenados para a agricultura moderna:

A fixação Biológica do nitrogênio (FBN) corresponde, essencialmente, à mesma reação, porém realizada por microrganismos denominados fixadores de nitrogênio ou diazotróficos:

A fixação biológica de nitrogênio é representada pela equação abaixo:

complexo enzimático



Assim, o processo de fixação biológica de nitrogênio é a redução do N_2 atmosférico até nitrogênio amoniacal através de um complexo enzimático formado pelas enzimas dinitrogenase e nitrogenase redutase (ver Figura 5) com consumo de prótons, elétrons, trifosfato de adenosina e a liberação de hidrogênio, difosfato de adenosina, radical livre fosfato inorgânico e nitrogênio amoniacal e este é disponível para microrganismos e plantas. Devido à alta estabilidade do N_2 ($\text{N}\equiv\text{N}$), esta reação tem um custo energético alto, o que restringe este processo a poucos grupos de microrganismos adaptados à condição diazotrófica (ver Figura 3). Os requerimentos essenciais para este processo são:

- a) **Microrganismos procarióticos:** todo processo de FBN é realizado somente por determinados grupos de bactérias e actinomicetos.
- b) **Presença de nitrogenase (Nase):** A nitrogenase é um complexo enzimático responsável pela redução do N_2 até NH_3 , e somente alguns grupos de microrganismos procarióticos apresentam os determinantes genéticos de sua produção. Tais microrganismos são denominados diazotróficos.
- c) **Exclusão do Oxigênio molecular.** A reação de fixação do N_2 corresponde a uma redução. Desse modo a presença de um forte agente oxidante causa a sua inibição. Entretanto, vários microrganismos aeróbios podem realizar a FBN, desde que apresente algum mecanismo de proteção da Nase tais como: produção de leghemoglobina (rizóbio-leguminosas), produção de heterocistos (cianobactérias), proteção respiratória (*Azotobacter*), produção de mucopolissacarídeos (*Derxia*, *Beijerickia*).
- d) **Fonte de Carbono orgânico:** Devido ao alto consumo energético da reação de fixação, o processo deve estar ligado a um suprimento contínuo e eficaz de carbono orgânico, para geração de ATP .

(CASSINI, 2005)

3.2. Microrganismos Fixadores de Nitrogênio

Existem na natureza três grandes sistemas fixadores:

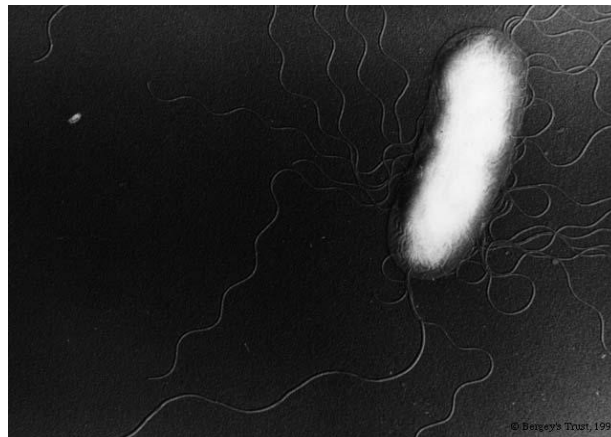
- a) **Vida livre;**
- b) **Associativo**
- c) **Mutualístico.**

a) Vida livre . Correspondem aos microrganismos que podem ser encontrados nos mais diversos ambientes de solos ou mesmo aquáticos, não estando necessariamente associado ou fazendo parte de estruturas mutualísticas. Estes microrganismos podem ser organotróficos, ou seja dependentes de fonte de carbono orgânico ou fotossintéticos. Podem apresentar também um metabolismo diversificado com relação ao oxigênio, representado pelos grupos aeróbios (*Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Derxia*), Facultativos (*Klebsiella*, *Bacillus*, *Azospirillum*), e anaeróbios (*Clostridium*, *Desulfovibrio*, *Metanobactérias*). Entre os microrganismos fotossintéticos de vida livre podemos citar: Cianobactérias (Nostoc), Bactérias púrpuras (*Rhodospirillum*, *Chromatium*, *Thiocapsa*). A contribuição desses microrganismos, em termos de seu potencial de adição de N combinado ($N-NH_3$) nos ecossistemas é pequena, variando de 2,0 a 10,0 kg N ha.⁻¹ ano⁻¹ (CASSINI, 2005).

b) Associativo. A superfície e tecidos de plantas constitui um habitat com fonte de carbono, umidade onde podem se instalar alguns tipos de microrganismos diazotróficos. No caso de Gramíneas C4, verificou-se que tanto a rizosfera quanto os tecidos internos de folhas, podem conter microrganismos que além de promover a fixação de nitrogênio podem secretar hormônios de crescimento vegetal , situação que confere grande auxílio no crescimento e desenvolvimento da planta. Os microrganismos de ocorrência natural nos tecidos das plantas são denominados de endofíticos. Como exemplos podemos citar os gêneros *Azospirillum*, *Acetobacter* (Cana-de-açúcar), *Herbaspirillum*. A contribuição dos sistemas associativos em termos de potencial de fixação de nitrogênio, ainda está sob estudo, mas, observações recentes evidenciam o elevado potencial dessa interação, podendo adicionar de 20 a 100 kg N há.⁻¹ ano⁻¹ (CASSINI, 2005).

c) Mutualístico. Neste tipo de interação, ocorre uma interdependência entre plantas e bactérias, com formação de estruturas especializadas, como por exemplo os Líquens (Cianobactérias + fungos), nódulo radicular (rizóbio + leguminosa) (ver Figura 4), actinorriza (acinomiceto + essências florestais), lobulos foliares (*Azolla* + cianobactéria). Os sistemas fixadores mutualísticos apresentam uma alta eficiência de fixação devido ao suprimento adequado de carbono orgânico aliado com mecanismos específicos de proteção ao oxigênio, como por exemplo os nódulos radiculares com produção de leghemoglobina. O potencial deste sistema fixador é alto, podendo atingir de 30 a 200 kg N há.⁻¹ ano⁻¹ dependendo do sistema considerado (CASSINI, 2005).

Figura 1: *Azospirillum brasilense*. Bactéria Promotora de Crescimento em Plantas.



Fonte: <http://commtechlab.msu.edu/sites/dlc-me/zoo/zdrs0160.jpg>

Figura 2: *Rhizobium* sp. Bactéria Fixadora de Nitrogênio em Plantas.

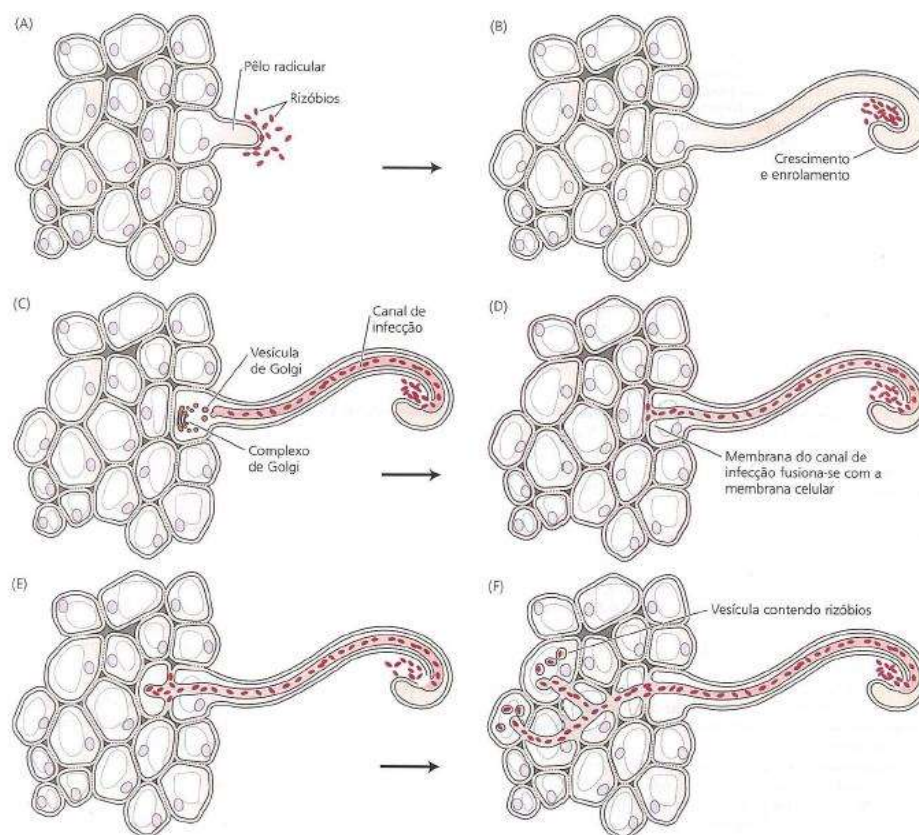


Fonte: <http://organicsoiltechnology.com/bean-seed-inoculation.html>

3.3. Processo de Infecção das Raízes pelas Bactérias da FBN

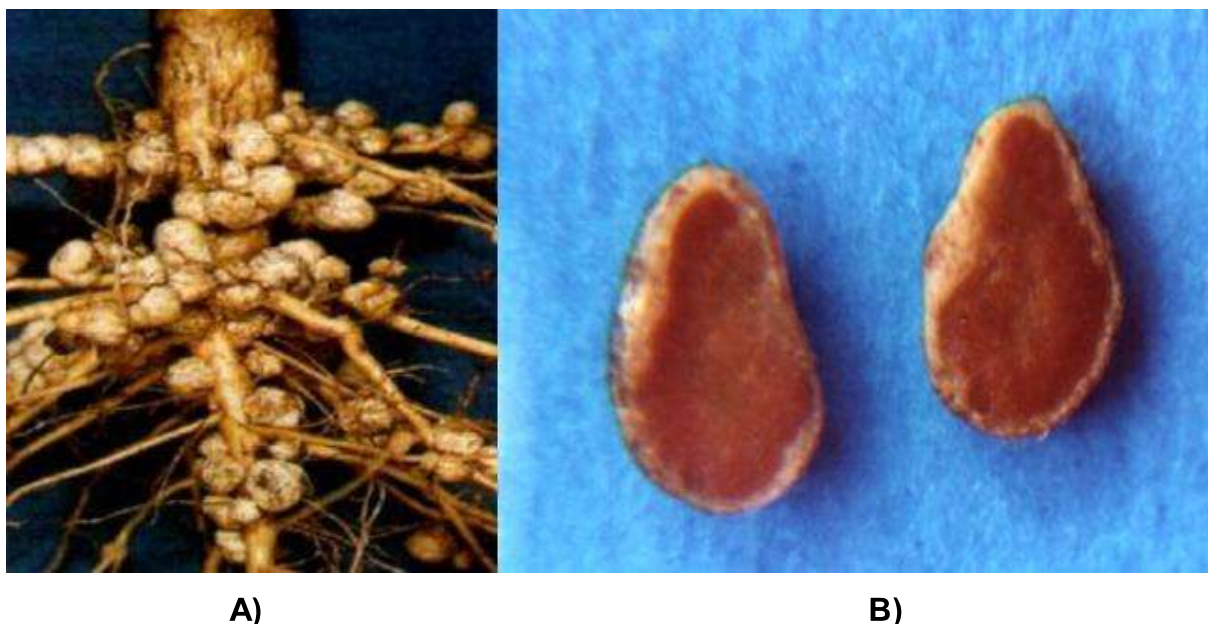
O processo de infecção durante a organogênese do nódulo. (A) Os rizóbios ligam-se a um pêlo radicular em formação, em resposta a atrativos químicos liberados pela planta. (B) Em resposta aos fatores produzidos pela bactéria, o pêlo radicular apresenta um enrolamento anormal e as células dos rizóbios crescem dentro dos enrolamentos. (C) A degradação localizada da parede celular do pêlo radicular leva à infecção e à formação do canal de infecção a partir das vesículas secretoras do Golgi das células da raiz. (D) O canal de infecção atinge a extremidade da célula e sua membrana funde-se com a membrana plasmática da célula do pêlo radicular. (E) Os rizóbios são liberados no apoplasto e penetram no complexo da lamela média da membrana plasmática da célula supradérmica, iniciando um novo canal de infecção, o qual forma um canal aberto com o primeiro. (F) O canal de infecção estende-se e se ramifica até atingir as células-alvo, onde as vesículas constituídas por membranas do vegetal, contendo bactérias, são liberadas no citosol.

Figura 3: Mecanismo de fixação de nitrogênio.



Fonte: http://www.nutricaoodeplantas.agr.br/site/downloads/assimilacaodenutrientes_cap12.pdf

Figura 4: Estrutura da raiz pós infecção por bactéria diazotrófica. a) Raízes de leguminosas contendo nódulos. b) Nódulo visto em corte.



Fonte: <http://www.elementos.buap.mx/num38/htm/43.htm>

3.4. Obtenção de Nitrogênio por Síntese Biológica

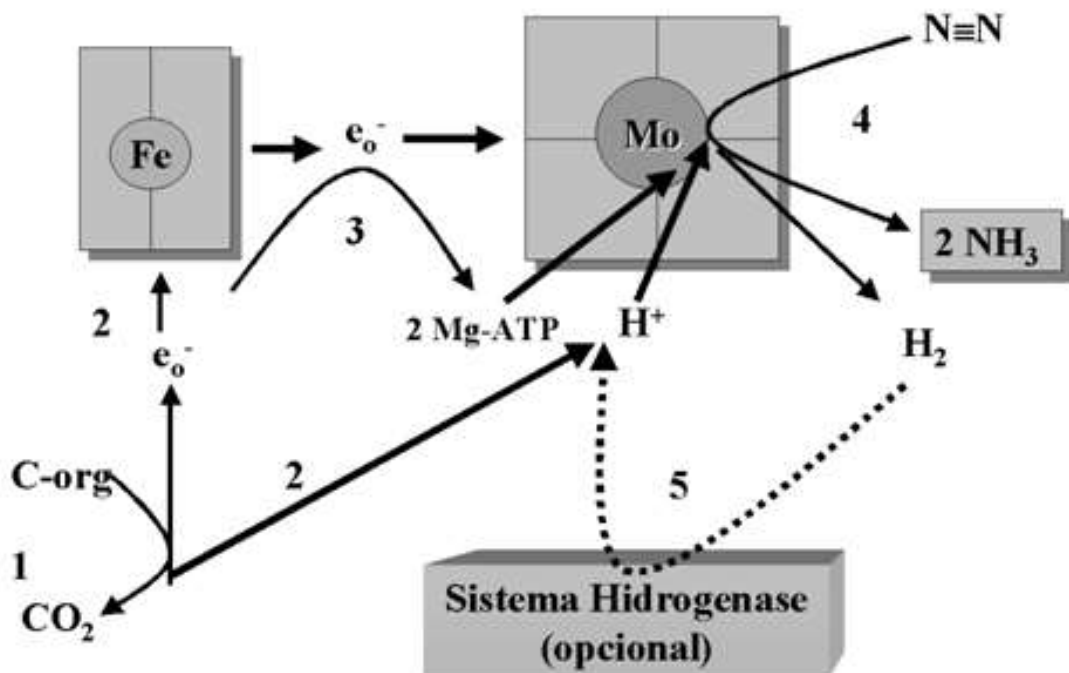
O O_2 tem papéis ambíguos na FBN. Sua presença é essencial para as células vivas, mas a nitrogenase desnatura-se rápida e irreversivelmente, em sua presença, representando assim um grande problema de ordem fisiológica. Alguns microrganismos aeróbicos desenvolveram, então, mecanismos que controlam a concentração de O_2 nos sítios de fixação. Em leguminosas, ocorrem associações simbióticas com bactérias diazotróficas que levam à formação de órgãos vegetais diferenciados, os nódulos, onde as referidas bactérias encontram um micro habitat ideal para fixação de nitrogênio. A endoderme é a primeira barreira que impede a difusão do excesso de O_2 para o interior do nódulo. No interior dos nódulos há um pigmento vermelho chamado leghemoglobina cuja função é transportar o oxigênio. Sua alta afinidade com o O_2 faz com que seja capaz de liberar este gás para o bacteróide em teores nunca prejudiciais à nitrogenase. A presença de leghemoglobina confere proteção à mesma (NEVES, 1992 *apud* CAMPOS *et al.* 1999).

O complexo enzimático da nitrogenase consiste de duas frações (I e II). A fração II é uma proteína com núcleo prostético de Fe, sendo denominada

Nitrogenase redutase. Apresentando uma estrutura dímera (2 subunidades). A fração I contém Molibdênio (Mo) e é denominada molibdo proteína ou dinitrogenase., apresentando estrutura tetramérica (4 subunidades). As frações I e II estão agrupadas de modo a permitir um contínuo fluxo de elétrons (e_o^-) da Fração II para I.

O funcionamento do complexo nitrogenase depende de um suprimento contínuo de elétrons (e_o^-) e prótons (H^+) para promover a redução do N_2 até NH_3 , por meio de moléculas carreadoras denominadas ferredoxina ou flavodoxinas. Estes elétrons são captados pela nitrogenase redutase (Fração II) que tem 2 moléculas de Mg.ATP associada. Este complexo da Fração II, elétrons e ATP liga-se à Fração I, a dinitrogenase contendo Mo, liberando elétrons e ATP. Nos sítios de Molibdênio ocorre a redução de $N\equiv N$ até NH_3 . O esquema da Figura 6 ilustra o funcionamento da nitrogenase nos sistemas diazotróficos (CASSINI, 2005).

Figura 5 : Fixação biológica de Nitrogênio pelo complexo enzimático. (1) Geração de poder redutor (Fonte de C-org e metabolismo oxidativo). (2) Fluxo de prótons e elétrons para as frações I e II da nitrogenase, respectivamente. (3) Transferência de elétrons da Fração II (Ferro-proteína reduzida) para fração I (molibdo-proteína) com geração de ATP. (4) Redução do N_2 ao nível do cofator Mo da fração I com geração de amônia e hidrogênio. (5) Sistema opcional de reciclagem de prótons e elétrons pela enzima hidrogenase, que pode promover um aumento da eficiência do sistema de fixação de nitrogênio.



Fonte: (CASSINI, 2005)

3.5. Inoculação

A inoculação é o processo por meio do qual as bactérias fixadoras de nitrogênio, selecionadas em laboratórios, são adicionadas às sementes das plantas antes da semeadura ou após o plantio das mesmas (MENDES, 2010).

A tecnologia da inoculação chega ao agricultor através da compra do produto chamado inoculante. O inoculante é composto de um caldo contendo bactérias e é misturado a um veículo, que pode ser um solo muito rico em matéria orgânica denominado turfa (inoculante em pó), formulações líquidas (inoculante líquido), ou combinações de turfa-líquido ou géis. O produto final deve conter no mínimo 1 bilhão de células de bactérias fixadoras de nitrogênio vivas por cada mL de inoculante (MENDES, 2010).

A operação de inoculação deve ser feita à sombra, nas horas mais frescas do dia (pela manhã ou à noite). Devem-se seguir as recomendações de dosagem e aplicação fornecidas pelo fabricante do inoculante. Em solos de primeiro ano de plantio, a dose recomendada é o dobro da dosagem normal. Sementes bem inoculadas ficam recobertas, por uma camada fina e uniforme de inoculante. Após a inoculação, as sementes devem ser secas à sombra e semeadas em no máximo, 24 horas, desde que fiquem protegidas do sol e umidade. Caso isso não seja possível, deve-se repetir a inoculação no dia do plantio (*ibidem*).

3.6. Condições Ótimas de Cultivo do *Azospirillum brasilense*

Segundo (PERDOMO *et al.*, 2015) avaliou-se o efeito da temperatura e do pH sobre a viabilidade celular do *Azospirillum brasilense* estirpe do C16. Cinco temperaturas (entre 28 e 36 ° C) e valores de pH (4,5-8,5). O efeito da temperatura foi avaliada medindo o crescimento radial (mm) da estirpe, em um papel filtro em agar de batata-doce. Cultivados em fermentador agitado de turbina; Eram as condições de fermentação: 400 rpm e 30 ° C, durante 24 horas. A temperatura de 30°C foi a mais positiva para a estirpe, com 23,21 mm de crescimento radial; enquanto que a temperatura mais elevada do que ou igual a

34°C inibiu o crescimento. Os melhores resultados foram obtidos com um valor de pH de 6,8, em comparação com os outros. Sob esta condição valoriza a maior taxa de crescimento ($1,79 \text{ h}^{-1}$) e o valor mais baixo do tempo de duplicação ($1,09 \text{ h}^{-1}$) foram obtidas. Estes resultados têm aplicabilidade biotecnológica, e são muito importantes no controle de forma a proporcionar as melhores condições de produção do *Azospirillum brasilense*.

3.7. Impactos Ambientais Causados pelo Uso de Adubação Inorgânica

Os fertilizantes nitrogenados estão entre os fertilizantes mais utilizados e são os que causam maior impacto ambiental. De acordo com a Associação Internacional de Fertilizantes (IFA), a produção desses compostos é responsável por 94% do consumo de energia de toda produção de fertilizantes. Os principais combustíveis utilizados são o gás natural (73%) e o carvão mineral (27%), ambos fósseis, cujas emissões de dióxido de carbono (CO_2) contribuem com o processo de desequilíbrio do efeito estufa, logo, favorecendo o processo de aquecimento global. A fabricação consome aproximadamente 5% da produção anual de gás natural. Quando o fertilizante entra em contato com o solo, ocorre reação química em que bactérias, principalmente as do gênero *Pseudomonas* liberam óxido nitroso (N_2O), um poderoso gás de efeito estufa ao lado do dióxido de carbono (CO_2) (ISHERWOOD, K.F., 2000).

O uso de fertilizantes inorgânicos pode acarretar a contaminação de lençóis freáticos, rios e lagos por conter poluentes orgânicos persistentes (POPs), como dioxinas e metais pesados em sua composição, que podem contaminar, animais plantas que vivem na água ou o próprio ser humano (Metehemoglobinemia). O NO_3^- ingerido é transformado em NO_2^- durante o processo de digestão. Este NO_2^- ao chegar na corrente sanguínea oxida a hemoglobina, formando a metehemoglobina, bloqueando o transporte de O_2 , podendo levar a asfixia e a morte. A contaminação da água pode levar à sua eutrofização que é um processo em que, compostos nitrogenados ou fosfatados, ao chegarem à rios, lagos e zonas costeiras favorecem o crescimento e o aumento do número de algas, que por sua vez levam à diminuição do oxigênio e à morte diversos organismos (ISHERWOOD, K.F., 2000).

3.8. Importância Econômica dos Inoculantes Agrícolas como Alternativa Sustentável

Existe um interesse crescente pelo uso de inoculantes contendo bactérias que promovem o crescimento e incrementam a produtividade de plantas, devido ao alto custo dos fertilizantes químicos e a uma conscientização em prol de uma agricultura sustentável e menos poluente. O Brasil tem longa tradição de pesquisa em fixação biológica de nitrogênio por *Azospirillum* em associações com gramíneas, mas até recentemente não havia inoculantes comerciais com essas bactérias no País. A Embrapa Soja e a UFPR selecionaram e avaliaram estirpes de *Azospirillum* com as culturas do milho (*Zea mays* L.) e do trigo (*Triticum aestivum* L.), seguindo os protocolos da legislação brasileira. Foram conduzidos nove ensaios em Londrina e Ponta Grossa, avaliando nove estirpes de *Azospirillum* em veículo turfoso. Foram identificadas quatro estirpes para cada cultura, que aumentaram a produção de grãos do milho em 24% a 30% em relação ao controle não inoculado e, em trigo, em 13% a 18%. Em uma segunda etapa, oito ensaios avaliaram as estirpes Ab-V5 e Ab V6 de *Azospirillum brasilense* em veículo líquido e turfoso e observou-se um aumento médio na produtividade de milho de 26% e de 31% na do trigo.

Estudos sobre formulações e aditivos levaram ao desenvolvimento de um inoculante líquido comercial da Embrapa Soja em parceria com a iniciativa privada. Novos ensaios conduzidos pela Embrapa Soja têm confirmado os benefícios pela inoculação de milho e trigo com *Azospirillum* em patamares mais elevados de rendimento. Pode-se concluir que, no caso do trigo cultivado após a soja, a inoculação com a aplicação de 20 kg N/ha permite a obtenção de rendimentos de grãos da ordem de 2600 kg/ha. No caso do milho, a inoculação com a aplicação de apenas 24 kgN/ha resulta em rendimentos da ordem de 3400 kg/ha, que são interessantes economicamente no caso de milho safrinha, ou para agricultura familiar (HUNGRIA, M., 2011).

Com a suplementação adicional de 30 kg/ha em cobertura os rendimentos do milho sobem para 7000 kg/ha. Estima-se que a economia resultante pela inoculação com *Azospirillum* possa ser da ordem de 2 bilhões de dólares por ano. Testes de eficiência agrônômica estão sendo conduzidos com outras gramíneas e

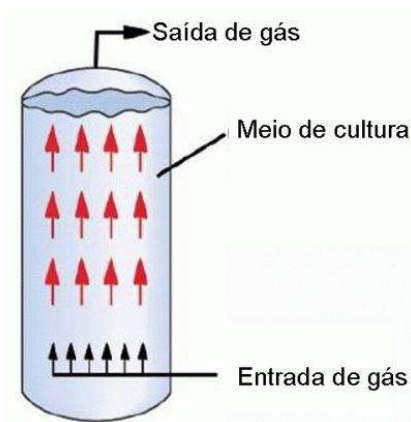
em co-inoculação com leguminosas. O aumento da produtividade devido à inoculação com *Azospirillum* nos ensaios conduzidos no Brasil foi correlacionado não só com o aumento do N, mas também com outros nutrientes, como o P e K, fato também relatado em outros países (*ibidem*).

3.9. Biorreatores Pneumáticos

Biorreatores pneumáticos são equipamentos onde a homogeneização e agitação são realizadas apenas pela injeção de gás. Estes biorreatores têm se tornado interessantes na biotecnologia, frente ao modelo convencional tipo tanque agitado e aerado, por conta de suas altas transferências de oxigênio aliadas a um consumo de energia menor e facilidade no projeto, construção e facilidade de aumento de escala destes equipamentos (SCHMIDELL, W. *et al.*, 1983)

Biorreatores tipo coluna de bolhas (ver Figura 6) e *airlift* (ver Figura 7 e 8) são os dois tipos mais utilizados de biorreatores agitados pneumaticamente. Pelas suas várias vantagens operacionais (maior transferência de oxigênio), o tipo *airlift* tem sido mais utilizado em bioprocessos frente ao modelo coluna de bolhas. O biorreator tipo coluna de bolhas é classificado como não convencional, ou também pneumático, apresenta uma constituição muito simples. A homogeneização do meio, bem como a aeração é realizada via borbulhamento de ar no fundo do vaso cilíndrico (*ibidem*).

Figura 6 : Desenho esquemático do biorreator tipo coluna de bolhas.



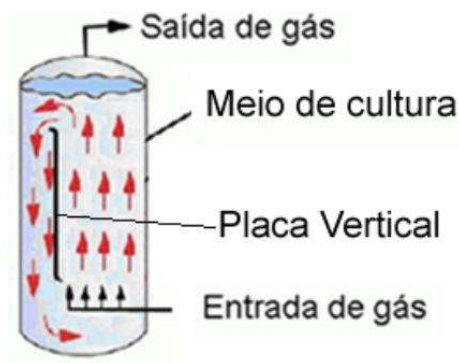
Fonte: (CHISTI, M.Y., 1989)

O biorreator *airlift* é um tipo especial de biorreator empregado em bioprocessos aeróbios. O equipamento clássico para dispersão do gás na fase líquida, especialmente em bioprocessos aeróbios é o tipo tanque agitado e aerado, no qual o oxigênio é transferido para o meio líquido com auxílio de agitação mecânica. Porém esse tipo de biorreator apresenta uma série de desvantagens, especialmente em processos de grande escala, como o alto gasto de energia, alta complexidade de construção e dificuldades no aumento de escala (CHISTI, M.Y., 1989).

Estas desvantagens são superadas pelo biorreator *airlift*, pois este modelo não apresenta partes móveis, e a dispersão gás-líquido é realizada pelo próprio ar de entrada no aspersor. O meio de cultura nesse tipo de biorreator é movido de baixo para cima impulsionado pelo deslocamento de bolhas de ar que são alimentadas no fundo do vaso de cultivo, retornando de cima para baixo por uma região distinta da região de subida. Todos os tipos de biorreatores *airlift* consistem de uma região aspergida por gás, denominada de região de subida e uma região de descida por onde retorna o meio reacional. A região de subida e de descida são interligadas no topo e na base do biorreator. A diferença entre as retenções gasosas das regiões de subida e descida causa uma diferença entre densidades da dispersão nestas regiões, resultando na circulação do fluido com escoamentos ascendente na região de subida (“riser”) e descendente na região de descida (“downcomer”) (CHISTI, M.Y., 1989).

Os biorreatores *airlift* de circulação interna, ainda podem ser subdivididos em dois tipos de equipamentos, o *airlift* tipo “split-cylinder” (ver Figura 7) e o *airlift* de cilindros concêntricos ou com tubo interno (ver Figura 8). As regiões de subida (“riser”) e de descida (“downcomer”) para biorreatores *airlift* tipo “split-cylinder” são separadas por uma placa vertical, e o gás é aspergido apenas pela área de seção de uma das regiões definida como “de subida”. O biorreator *airlift* com circulação interna é constituído de uma única coluna dividida em duas regiões internas de circulação.

Figura 7 : Desenho esquemático do biorreator *airlift* tipo “split cylinder”.



Fonte: (CHISTI, M.Y., 1989)

Nos biorreatores *airlift* com circulação interna, a mistura e a circulação de líquido são induzidos pela injeção de ar pelo interior do tubo concêntrico (tubo interno) ou opcionalmente pelo espaço anular. O movimento ascendente do gás aspergido na base do reator transporta a fase líquida e as células que compõem o caldo de fermentação, pelo interior do tubo interno ou pelo espaço anular, dependendo da localização do aspersor. No topo do reator, a maior parte do gás se desprende do líquido e o líquido parcialmente sem gás desce por uma região distinta daquela por onde ascendeu.

Na base do biorreator que é uma região de baixa pressão, o fluido descendente encontra a corrente ascendente de gás, sendo novamente transportado ascendentemente por esta, o que confere ao meio reacional uma circulação interna contínua (CHISTI, M.Y., 1989)

Figura 8 : Desenho esquemático de um biorreator tipo *airlift* de cilindros concêntricos.



Fonte: (CHISTI, M.Y.; M. Moo Young, 1987)

3.10. Cultura de Microrganismos

As bactérias podem ser divididas em grupos com base em suas exigências nutritivas. A principal separação corresponde aos grupos fototróficos (organismos que utilizam a energia radiante como fonte de energia) e quimiotróficos (organismos incapazes de utilizar a energia radiante; dependem da oxidação de compostos químicos para a obtenção de energia). Assim como as bactérias variam com relação às exigências nutritivas, também demonstram respostas diversas às condições físicas do ambiente tais como: temperatura, pH, exigências atmosféricas (BOSSOLAN, 2014).

A) Temperatura: o crescimento bacteriano pode ter seu ritmo e quantidade determinados pela temperatura, uma vez que esta influencia as reações químicas do processo de crescimento. Cada espécie de bactéria cresce sob temperaturas situadas em faixas características e, sendo assim, são classificadas nos seguintes grupos:

- 1) **Bactérias psicrófilas:** são capazes de crescer a 0° C ou menos, embora seu ótimo seja entre 15° C ou 20° C.
- 2) **Bactérias mesófilas:** crescem melhor numa faixa de 25 a 40° C.
3. **Bactérias termófilas:** crescem melhor a temperaturas de 45 a 60° C.

B) Exigências atmosféricas: os principais gases que afetam o crescimento bacteriano são o oxigênio e o dióxido de carbônico. Como as bactérias apresentam grande variedade de resposta ao oxigênio livre, elas são divididas em:

- 1) **Bactérias aeróbias:** crescem na presença de oxigênio livre.
- 2) **Bactérias anaeróbias:** crescem na ausência de oxigênio livre.
- 3) **Bactérias anaeróbias facultativas:** crescem tanto na presença como na ausência do oxigênio livre.
- 4) **Bactérias microaerófilas:** crescem na presença de quantidades pequenas de oxigênio livre.

C) Acidez e alcalinidade (pH): para a maioria das bactérias, o pH ótimo de crescimento localiza-se entre 6,5 e 7,5. Embora poucos microrganismos possam desenvolver-se nos limites extremos de pH, as variações mínimas e máximas, para a maior parte das espécies, estão entre pH 4 e pH 9 (BOSSOLAN, 2014).

D) Crescimento Microbiano

O crescimento microbiano é composto por quatro fases (ver Figura 9):

1) Fase Lag ou (de adaptação) em que ocorre ausência de divisão celular. Durante esse tempo, as células se encontram em um estado de latência. Esta população está passando por um período de intensa atividade metabólica, principalmente síntese de enzimas e de moléculas variadas.

2) Fase Log ou (fase exponencial) em que se iniciam seu processo de divisão entrando no período de crescimento. Durante esse período, a reprodução celular encontra-se extremamente ativa, e o tempo de geração atinge um valor constante, é o período de maior atividade metabólica da célula.

3) Fase Estacionária em que ocorre a diminuição da velocidade de crescimento, o número de morte celular é equivalente ao número de células novas, e a população se torna estável. A atividade metabólica de cada célula também decresce nesse estágio, há pouco nutriente e acúmulos de produtos metabólicos.

4) Fase de Declínio em que ocorre a morte celular, pois o número de células mortas excede o de células novas. Essa fase continua até que a população tenha diminuído para uma pequena fração do número de células da fase anterior, ou até que tenha desaparecido totalmente devido a indisponibilidade de nutrientes (BOSSOLAN, 2014).

Figura 9 : Curva de crescimento microbiano indicando fase lag, log, estacionária e declínio



Fonte: http://microbiologiaja.blogspot.com.br/2013/03/crescimento-microbiano_28.html

3.11. Quantificação de Microrganismos por Espectrofotometria

A espectroscopia de absorção molecular baseia-se nas medidas da transmitância da luz através do caminho óptico. A partir da luz transmitida se calcula a absorbância. Ou seja, qualquer perda de potência do feixe incidente é interpretada pelo equipamento como absorbância de um cromóforo. No entanto a perda de potência pode ocorrer devido a difração e refração. Assim a presença de partículas em suspensão podem afetar as medidas de absorção, assim como substâncias que mudem a refração do caminho óptico. Uma vez determinada a transmitância esta pode ser convertida em absorbância pela equação:

$$A = - \log T \quad (1)$$

Onde, **A** representa a absorbância e **T** a transmitância (HOLLER, 2009).

Pela lei de Beer-Lambert podemos relacionar a absorbância com a concentração pela equação:

$$A = \epsilon bc \quad (2)$$

Onde, **A** representa a absorbância, **ϵ** é a absortividade molar, **b** o caminho óptico e **c** representa a concentração do analito em mol/L (HOLLER, 2009).

Na análise espectrofotométrica, a fonte de radiação utilizada alcança a região ultravioleta e visível do espectro, por meio da escolha do comprimento de onda de radiação bem definidos e com largura de banda menor que 1nm, o que torna necessário o uso de um espectrofotômetro (CIENFUEGOS, 2000).

O Espectrofotômetro óptico (ver Figura 10) é um instrumento composto de um sistema óptico, que aplica uma radiação eletromagnética permitindo a medida da quantidade de radiação transmitida em determinados comprimentos de onda selecionados na faixa espectral (CIENFUEGOS, 2000).

Figura 10: Ilustração de um Espectrofotômetro.



Fonte: www.google.com/espectrofotometro

É definido como transmitância T (ver Figura 11) a razão entre a luz transmitida I e a luz incidente I_0 .

$$T = I / I_0 \quad (3)$$

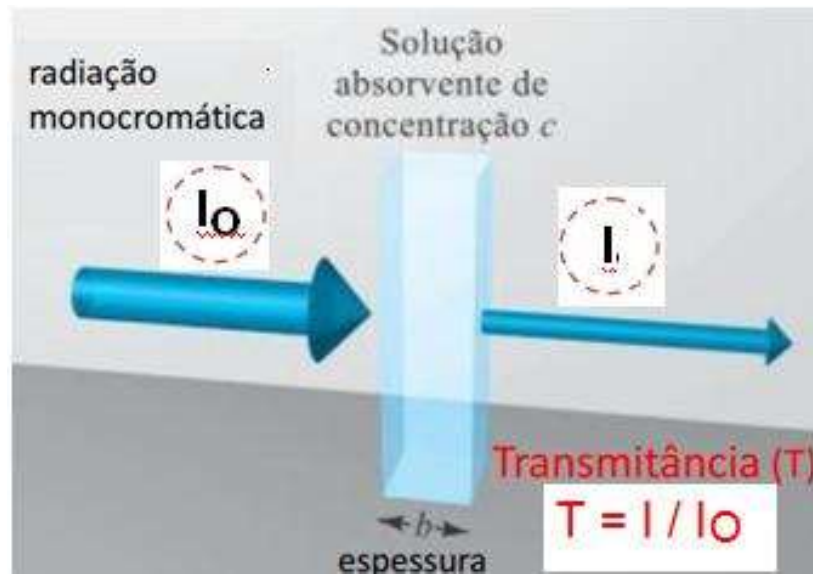
Pela expressão acima, observa-se que uma solução que absorva energia apresentará uma transmitância menor do que 1 (CIENFUEGOS, 2000).

Pela lei de Lambert-Beer, que estabelece relação entre transmitância, concentração das espécies que absorvem e a espessura da amostra. A absorbância é proporcional à concentração de soluto e ao comprimento da solução percorrida pelo raio luminoso. A partir desta definição obtém-se a equação 5 (CIENFUEGOS, 2000).

$$\text{Log}_{10} (I_0 / I) = kcb = A \quad (4)$$

Em que, **A** corresponde a absorbância; **K** é a constante característica do soluto; **c** corresponde a concentração do soluto e **b** ao comprimento do caminho óptico através da amostra (CIENFUEGOS, 2000).

Figura 11: Transmitância. I_0 (Feixe de luz incidente) , I (feixe de luz transmitido), b espessura da cubeta.



Fonte: (SKOOG, 2009)

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Biorreator PET 2L

4.1.1. Materiais usados na Construção do Biorreator PET 2L

- 1 garrafa PET 2L com tampa perfurada;
- 1 mangueira de ar para aquário;
- 1 pedra porosa para aquário;
- 1 tubo de silicone;
- 1 tubo de massa epóxi;
- 1 pincel preto;
- 1 furadeira;
- 1 broca 1/4" para furadeira.

Figura 12: Biorreator PET 2L e seus componentes: Garrafa, tampa perfurada, mangueira de silicone, pedra porosa e massa epóxi.



Fonte: Próprio autor.

4.1.2. Preparo do meio de Cultura do Biorreator PET 2L

- 1-Adicionou-se em um Erlenmeyer de 2L o volume de 1600mL de água destilada;
- 2-Pipetou-se 160 μ L de ácido fosfórico 85% de pureza e que foram adicionados à água destilada;
- 3-Pesou-se 9,6 gramas de uréia e que foi guardada para ser adicionada antes da inoculação com *Azospirillum brasilense*;
- 4-Pesou-se 0,4g de bicarbonato de sódio e que foram adicionados à água destilada;
- 5-Pesou-se 48g de fubá e que foram adicionados à água destilada;
- 6- Pesou-se 24g de açúcar e que foram adicionados à água destilada;
- 7-Agitou-se a solução em um Erlenmeyer de 2L;
- 8-A solução foi filtrada em uma peneira de 200 mesh e posteriormente filtrada à vácuo com papel filtro;
- 9-A solução foi esterilizada em autoclave a 121°C por 20 minutos.

4.1.3. Inoculação do meio de cultura do Biorreator PET 2L

- 1-Limpou-se a capela de fluxo laminar com toalha de papel e álcool 70% e ligou-se luz UV por 15 minutos, findado os 15 min , a luz UV foi desligada;
- 2-Na capela de fluxo laminar adicionou-se 9,6g de ureia em 1600mL do meio de cultura e agitou-se;
- 3-Retirou-se 100mL do meio de cultura e que foi separado em um Erlenmeyer de 100mL de forma a ser utilizado como “branco” este foi guardado em geladeira à 4°C;
- 4-Com auxílio de uma pipeta de 5mL, retirou-se uma alíquota de 3,0 mL do inóculo homogeneizado previamente e contendo *Azospirillum brasilense* e que foi dividido em dois volumes de 1,5 mL cada e adicionados em dois micro tubos de 1,5 mL;
- 5-Adicionou-se 1500mL de meio do cultura no biorreator PET 2L;
- 6-Adicionou-se os inóculos dos micro tubos no biorreator PET 2L;
- 7- O biorreator PET 2L foi tampado com tampa não furada e homogeneizado;
- 8-O biorreator PET 2L foi imerso em um Banho Maria (composto por um balde com tampa, 20L de água, aquecedor com termostato de 110 volts e 200 Watts e dois termômetros) à temperatura de 33°C. Um dos termômetros aferia a temperatura do fundo da água e o outro aferia a temperatura da superfície da água;
- 9-Ligou-se um mini compressor de ar de 5W e 110V ao biorreator PET 2L e tampou-se o balde.

4.1.4. Construção da Curva de Crescimento do *Azospirillum brasilense* em Biorreator PET 2L

- 1- Verteu-se 3mL de solução Branco em um tubo Falcon, homogeneizou-se em vórtex e verteu-se a solução em uma cubeta de 3mL para calibração do espectrofotômetro;
- 2- Com auxílio de uma pipeta de 3mL e uma pera pipetou-se uma alíquota de 3mL de solução contida no biorreator PET 2L e que foi adicionada em um tubo Falcon de 15mL. Homogeneizou-se a alíquota em vórtex e a mesma foi vertida em uma cubeta de vidro e inserida em espectrofotômetro a 600nm de comprimento de onda e feito a leitura de absorbância e anotou-se o valor;

3- Os procedimentos citados acima foram repetidos no tempo 0, 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 23 e 24 horas após a inoculação com *Azospirillum brasilense* e ao final foi construída a curva de crescimento do *Azospirillum brasilense*. Absorbância 600nm de comprimento de onda em função do tempo, através do software Excel.

4.1.5. Construção da Curva de pH do *Azospirillum brasilense* em Biorreator PET 2L

1 – Após a leitura da absorbância da alíquota em espectrofotômetro, verteu-se a mesma alíquota da cubeta em tubo Falcon e mediu-se o pH através de peagâmetro;

2- Anotou-se o valor do pH indicado pelo peagâmetro

2- Os procedimentos citados acima foram repetidos no tempo 0, 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 23 e 24 horas após a inoculação com *Azospirillum brasilense* e ao final foi construída a curva de pH do *Azospirillum brasilense*; pH em função do tempo, através do software Excel.

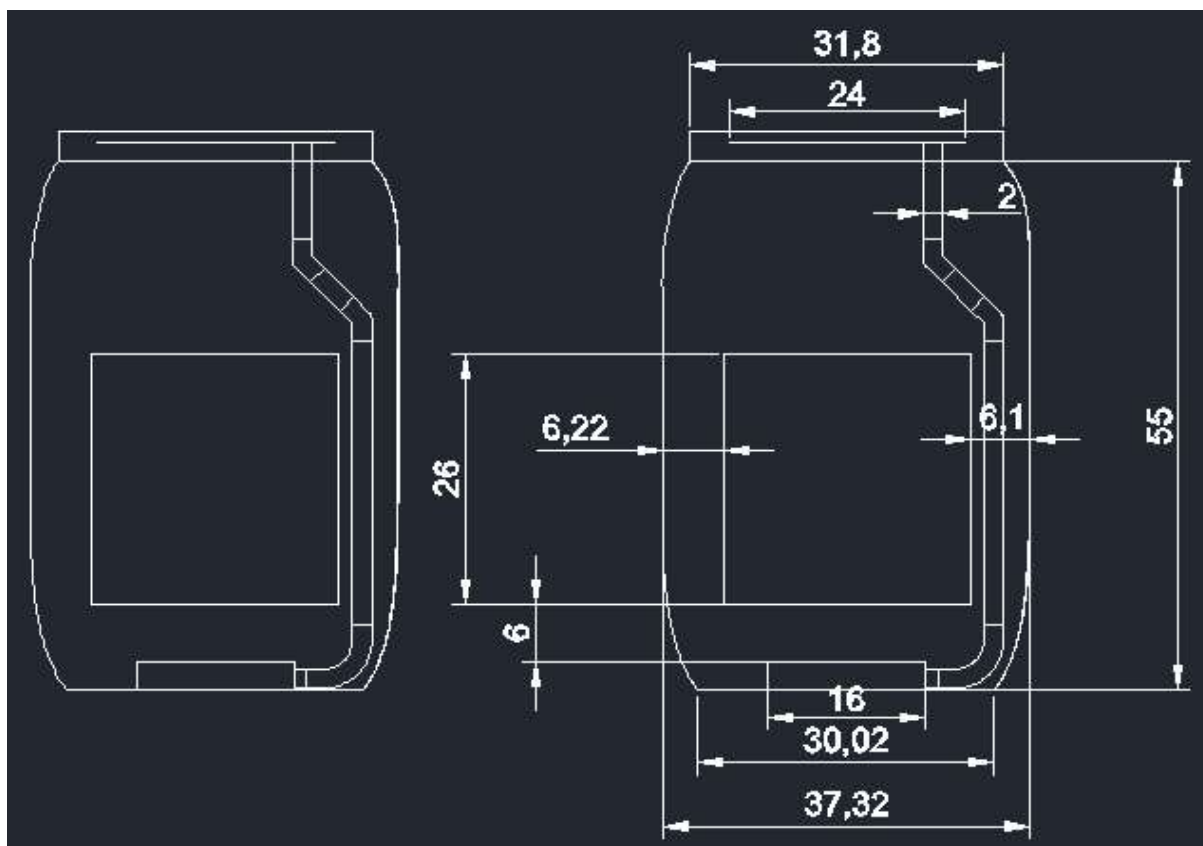
4.2. Biorreator de 55L

4.2.1. Desenho do Biorreator de 55L

Para a construção do biorreator de 55L foi estabelecido 4 condições a serem atendidas:

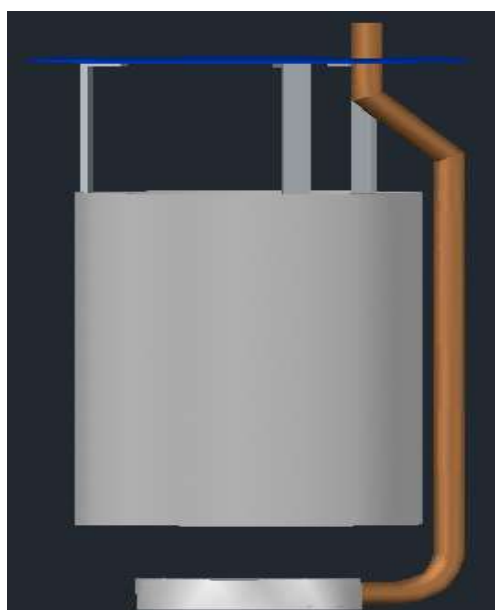
- ✓ Disponibilidade de itens no mercado;
- ✓ Facilidade de montagem;
- ✓ Boas condições de fluxo no biorreator;
- ✓ Facilidade de higienização.

Figura 13: Desenho 2D indicando as dimensões das peças e suas disposições no biorreator de 55L .



Fonte: Próprio autor.

Figura 14: Desenho 3D da vista lateral do módulo interno do biorreator de 55L.



Fonte: Próprio autor.

Figura 15: Foto do módulo interno do biorreator de 55 L. a) Módulo interno mostrando bico de injeção de ar no canto esquerdo do topo. b) Módulo interno mostrando o formador de bolhas na parte inferior.



a)



b)

Fonte: Próprio autor.

Figura 16: Sistema de aquecimento, aferição de temperatura e aeração. a) Aquecimento do meio de cultura. Mediante aquecedor com termostato de 110 volts e 200 watts. b) Aferição de temperatura mediante termômetro acoplado à rolha de borracha. c) Injeção de ar (indicada pela seta azul) através de compressor.



a)



b)



c)

Fonte: Próprio autor.

4.2.2 Materiais Usados na Construção do Biorreator de 55L

- 1 tambor plástico de 55L;
- 1 tubo de PVC de 250mm de diâmetro e 260mm de comprimento;
- 1 chuveiro de 16cm de diâmetro com entrada para tubo PVC de diâmetro 1/2”;
- 3 adaptadores curtos para tubo PVC de diâmetro 1/2”;
- 1 adaptador com flanges para tubo de PVC de diâmetro 1/2”;
- 2 joelhos de PVC de 45° de diâmetro 1/2”;
- 1 curva de PVC de 90° de 1/2”;
- 50cm de tubo de PVC de diâmetro 1/2”;
- 3 suportes metálicos para calha;
- 9 parafusos curtos de 15mm de comprimento x 1/4” de diâmetro;
- 9 porcas de 1/4” de diâmetro interno;
- 9 arruelas de 1/4” de diâmetro interno;
- 1 bico metálico rosqueável de 1/2” de diâmetro;
- 1 furadeira;
- 1 broca 1/4” de diâmetro.
- 1 serra copo 1/2” de diâmetro;
- 1 luva 1/2” de diâmetro;
- 1 tubo de cola PVC;
- 1 lixa 150 *mesh* para metal.

4.2.3. Preparo do meio de cultura do Biorreator de 55L

1- Adicionou-se 48 litros de água ao biorreator. Com auxílio de uma pipeta de 10mL e uma pera pipetou-se uma alíquota de água. Com auxílio de um peagâmetro mediu-se o pH da água sendo igual a 8,16;

2- Com auxílio de uma fita isolante fixou-se a mangueira do compressor ao bico de injeção de ar situado no terceiro orifício da tampa do biorreator;

3- Acionou-se o compressor;

4 – Pipetou-se 5mL de ácido fosfórico e que foram adicionados aos 48 L de água. Com auxílio de uma pipeta de 10mL e uma pera, pipetou-se 10 mL da alíquota. Com

- auxílio de um peagâmetro mediu-se o pH da alíquota obtendo valor de 3,32;
- 5- Pesou-se 150g de ureia e que foram adicionados à solução anterior. Com auxílio de uma pipeta de 10mL e uma pera pipetou-se 10mL de alíquota. Através de um peagâmetro mediu-se o pH da alíquota obtendo valor de 3,52;
- 6- Pesou-se 12,0 g de bicarbonato de sódio e que foram adicionados à solução anterior. Pipetou-se 10mL de alíquota. Através de um peagâmetro mediu-se o pH da alíquota obtendo valor de igual a 6,96;
- 7- Pesou-se 1500g de açúcar e que foram adicionados à solução anterior. Pipetou-se 10mL de alíquota. Através de um peagâmetro mediu-se o pH da alíquota obtendo valor de 6,95;
- 8- Pesou-se 750g de fubá de milho e que foram adicionados à solução anterior. Pipetou-se 10mL de alíquota. Através de um peagâmetro mediu-se o pH da alíquota obtendo valor de 6,88.

4.2.4. Inoculação do *Azospirillum brasilense* em Biorreator de 55L

- 1) Inseriu-se no primeiro orifício da tampa do biorreator o termômetro acoplado à rolha de borracha;
- 2) Para acelerar o aumento da temperatura do meio de cultura usou-se um ebulidor e um termômetro até que a temperatura do meio atingisse 33°C.
- 2- Atingindo-se 33°C através do ebulidor, desligou-se o mesmo e esperou-se 5 min para que o aparelho pudesse diminuir sua temperatura e não se danificar. Retirou-se o mesmo. Tampou-se o biorreator com sua tampa e inseriu-se no segundo orifício da tampa o aquecedor com programação de regulação de aquecimento para 33°C;
- 4- Através do termômetro acompanhou-se o aquecimento do meio até que foi atingido a temperatura que se manteve-se em torno de 33°C;
- 5- Com auxílio de uma fita isolante fixou-se a mangueira do compressor ao bico de injeção de ar situado no terceiro orifício da tampa do biorreator;
- 7- Abriu-se a caixa e retirou-se a sacola de 2L contendo solução de *Azospirillum brasilense* e que foi homogeneizada previamente;
- 8- Com auxílio de uma proveta mediu-se 150mL de solução contendo *Azospirillum brasilense* de concentração 10^8 UFC/mL;

- 9- Retirou-se o termômetro do primeiro orifício da tampa do biorreator e verteu-se os 150mL de solução contendo *Azospirillum brasilense* de concentração 10^8 UFC/mL;
- 10- Introduziu-se o termômetro no primeiro orifício da tampa do biorreator.

4.2.5. Construção da Curva de Crescimento do *Azospirillum brasilense* em Biorreator de 55L

- 1- Desligou-se o compressor e o aquecedor;
- 2- Retirou-se a tampa do biorreator e que foi colocada em um balde limpo;
- 3- Homogeneizou-se o meio de cultura com auxílio de uma colher plástica de 1m de comprimento;
- 4- Com auxílio de um béquer, retirou-se uma alíquota de 10 mL e que foi vertida em um tubo Falcon de 15mL;
- 5 – Filtrou-se a alíquota de 10mL através de um sistema à vácuo composto por, funil de Büchner, Kitassato, rolha de borracha, bomba à vácuo e filtro de papel;
- 6 – Veteu-se em um tubo Falcon a alíquota filtrada;
- 7- Veteu-se 3mL de solução Branco em um tubo Falcon, homogeneizou-se em vórtex e veteu-se a solução em uma cubeta de 3mL para calibração do espectrofotômetro a 600 nm e usando lâmpada de tungstênio;
- 8 –A alíquota que foi filtrada foi vertida em uma cubeta de 3mL
- 9 - Procedeu-se a leitura da absorbância a 600nm e anotou-se o valor;
- 10- Os procedimentos citados acima foram repetidos no tempo 0, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 20, 21, 22, 27, 28 e 48 horas após a inoculação com *Azospirillum brasilense* e ao final foi construída a curva de crescimento do *Azospirillum brasilense*. Absorbância 600nm em função do tempo, através do *software Excel*.

4.2.6. Construção da Curva de pH do *Azospirillum brasilense* em Biorreator de 55L

- 1 – Após a leitura da absorbância da alíquota em espectrofotômetro, veteu-se a mesma alíquota da cubeta em tubo Falcon e mediu-se o pH através de peagâmetro;

2- Os procedimentos citados acima foram repetidos no tempo 0, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 20, 21, 22, 27, 28 e 48 horas após a inoculação com *Azospirillum brasilense* e ao final foi construída a curva de pH do *Azospirillum brasilense*. pH em função do tempo, através do *software Excel*.

4.3. Quantificação do *Azospirillum brasilense* em Biorreator PET 2L

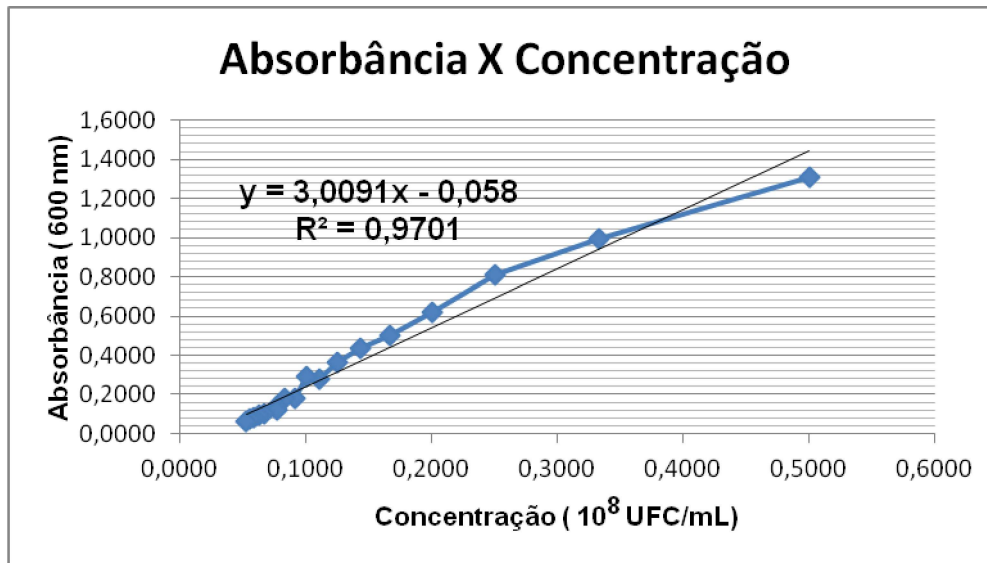
Através de sucessivas diluições do produto AZOS (solução biológica contendo bactérias fixadoras de nitrogênio de concentração 10^8 UFC/mL) em meio de cultura alternativo e analisadas em espectrofotômetro, foi possível produzir um gráfico através do *software Excel* a partir de dados do quadro 1.

Quadro 1: Diluição do produto AZOS em meio de cultura para construção de uma “curva padrão”. Concentração inicial de 10^8 UFC/mL. Leitura de densidade optica a 600nm em espectrofotômetro utilizando lâmpada de tungstênio.

CURVA PADRÃO DO PRODUTO AZOS	CONCENTRAÇÃO (10^8 UFC/mL)	ABSORBÂNCIA (600 nm)
AZOS CONCENTRADO	1,0000	1,650
1 PARTE DE AZOS : 2 PARTES DE MEIO DE CULTURA	0,5000	1,330
1 PARTE DE AZOS : 2 PARTES DE MEIO DE CULTURA	0,3333	0,995
1 PARTE DE AZOS : 3 PARTES DE MEIO DE CULTURA	0,2500	0,807
1 PARTE DE AZOS : 4 PARTES DE MEIO DE CULTURA	0,2000	0,619
1 PARTE DE AZOS : 5 PARTES DE MEIO DE CULTURA	0,16660	0,505
1 PARTE DE AZOS : 6 PARTES DE MEIO DE CULTURA	0,1428	0,438
1 PARTE DE AZOS : 7 PARTES DE MEIO DE CULTURA	0,1250	0,366
1 PARTE DE AZOS : 8 PARTES DE MEIO DE CULTURA	0,1111	0,280
1 PARTE DE AZOS : 9 PARTES DE MEIO DE CULTURA	0,1000	0,289
1 PARTE DE AZOS : 10 PARTES DE MEIO DE CULTURA	0,0909	0,181
1 PARTE DE AZOS : 11 PARTES DE MEIO DE CULTURA	0,0833	0,179
1 PARTE DE AZOS : 12 PARTES DE MEIO DE CULTURA	0,0769	0,138
1 PARTE DE AZOS : 13 PARTES DE MEIO DE CULTURA	0,0771	0,119
1 PARTE DE AZOS : 14 PARTES DE MEIO DE CULTURA	0,0666	0,103
1 PARTE DE AZOS : 15 PARTES DE MEIO DE CULTURA	0,0625	0,094
1 PARTE DE AZOS : 16 PARTES DE MEIO DE CULTURA	0,0588	0,083
1 PARTE DE AZOS : 17 PARTES DE MEIO DE CULTURA	0,0555	0,072
1 PARTE DE AZOS : 18 PARTES DE MEIO DE CULTURA	0,0526	0,060

Fonte: Próprio autor.

Figura 17: Curva padrão do *Azospirillum brasilense* diluído em meio de cultura alternativo.



Fonte: Próprio autor.

Equação da curva Padrão:

$$Y = 3,0091 X - 0,058$$

A maior absorbância obtida no biorreator PET 2L foi 1,327.

Cálculo do Número de Bactérias por mL:

$$Y = 3,0091 X - 0,058$$

$$1,327 = 3,0091 X - 0,058$$

$$3,0091 X = 1,327 + 0,058$$

$$X = (1,327 + 0,058) / 3,0091$$

$$X = 0,46027 \times 10^8 \text{ UFC/mL}$$

Cálculo do Número de Bactérias Totais:

$$1500\text{mL} \times 0,46027 \times 10^8 \text{ UFC/mL} = 6,90405 \times 10^{10} \text{ UFC}$$

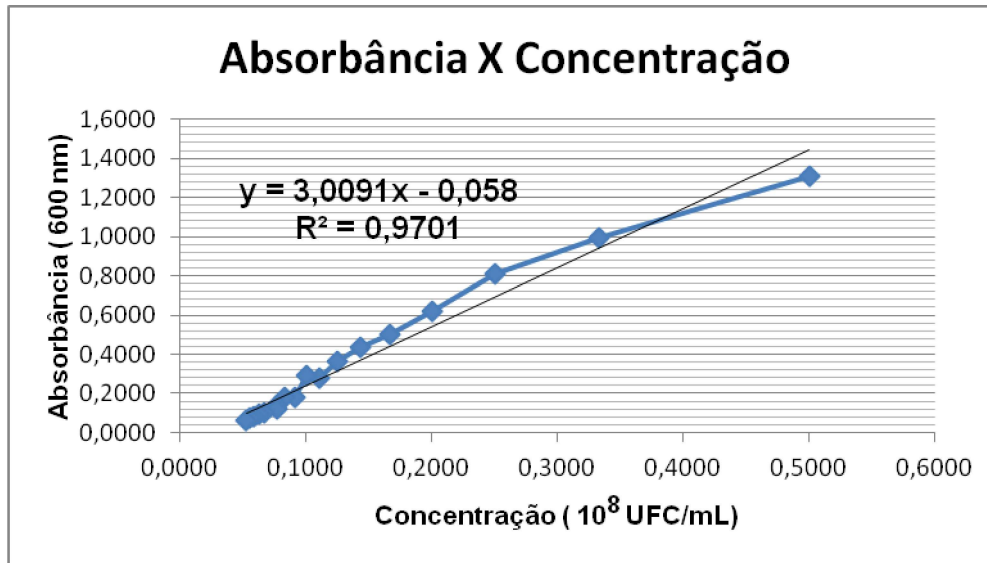
Cálculo do Rendimento:

Nº de bactérias final / Nº de bactérias inicial

$$(6,90405 \times 10^{10} \text{ UFC}) / (3\text{mL} \times 10^8 \text{ UFC/mL}) = 230 \text{ vezes}$$

4.4. Quantificação do *Azospirillum brasilense* em Biorreator de 55L

Figura 17: Curva padrão do *Azospirillum brasilense* diluído em meio de cultura alternativo.



Fonte: Próprio autor.

Equação da curva Padrão:

$$Y = 3,0091 X - 0,058$$

A maior absorbância obtida no biorreator de 55L foi 1,335.

Cálculo do Número de Bactérias por mL:

$$Y = 3,0091 X - 0,058$$

$$1,335 = 3,0091 X - 0,058$$

$$3,0091 X = 1,335 + 0,058$$

$$X = (1,335 + 0,058) / 3,0091$$

$$X = 0,46293 \times 10^8 \text{ UFC/mL}$$

Cálculo do Número de Bactérias Totais:

$$48000\text{mL} \times 0,46293 \times 10^8 \text{ UFC/mL} = 2,2222 \times 10^{12} \text{ UFC}$$

Cálculo do Rendimento:

Nº de bactérias final / Nº de bactérias inicial

$$(2,2222 \times 10^{12} \text{ UFC}) / (150\text{mL} \times 10^8 \text{ UFC/mL}) = 148 \text{ vezes}$$

4.5. CUSTOS

4.5.1. Custo de Cada Batelada em Biorreator PET 2L

4.5.1.1. Custos dos Reagentes

15 reais → 1000g ureia

x1 → 9,6 g ureia

x1 = 0,144 reais

15 reais → 5000L água

x5 → 1,6L água

x5 = 0,0048 reais

3 reais → 1000g fubá

x2 → 48g

x2 = 0,144 reais

25 reais → 1000mL ácido fosfórico

x6 → 0,16mL ácido fosfórico

x6 = 0,004 reais

10 reais → 5000g açúcar

x3 → 24g açúcar

x3 = 0,048 reais

200 reais → 2000mL Produto AZOS

x7 → 3mL Produto AZOS

x7 = 0,3 reais

5 reais → 100g bicarbonato de sódio

x4 → 0,4 bicarbonato de sódio

x4 = 0,02 reais

4.5.1.2. Custo da Aeração

O compressor de ar de 5W usado no biorreator PET 2L funcionando por 24 horas ao custo de 0,5 reais/kW.h

Energia consumida = potência x tempo (5)

Energia consumida = 0,005 Kw x 24h

Energia consumida = 0,12Kw.h

$$\text{Custo de Aeração} = \text{tarifa} \times \text{energia consumida} \quad (6)$$

$$\text{Custo do aquecimento} = 0,5 \text{ reais/kW.h} \times 0,12 \text{ Kw.h}$$

$$\text{Custo do aquecimento} = 0,06 \text{ reais}$$

$$\text{x8} = 0,06 \text{ reais}$$

4.5.1.3. Custo do Aquecimento

Considerando perdas mínimas de energia no Sistema PET 2L usando um aquecedor de 200W de 110V para aquecer o biorreator PET 2L em “Banho Maria de capacidade 20L” variando a temperatura de 20°C até 33°C consome:

$$Q = m.c.\Delta T \quad (7)$$

Q = energia (Joules ou Watts.segundo)

m = massa de água (Kg)

c = calor específico da água (4,18J/(g.°C))

ΔT = variação de temperatura da água (°C)

$$Q = (20000\text{g}) \times (4,18\text{J/(g.°C)}) \times (13\text{°C})$$

$$Q = 1,0868 \times 10^6 \text{ J}$$

$$1\text{J} = 1\text{ watt.segundo}$$

$$Q = 1,0868 \times 10^6 \text{ w.s ou } 1,0868 \times 10^3 \text{ Kw.s}$$

Convertendo em Kw.h temos:

$$Q = (1,0868 \times 10^3 \text{ Kw.s}) \times (1\text{h}/3600\text{s})$$

$$Q = 0,3 \text{ Kw.h}$$

$$\text{Custo do aquecimento} = \text{tarifa} \times \text{energia consumida} \quad (6)$$

$$\text{Custo do aquecimento} = 0,5 \text{ reais/(Kw.h)} \times 0,3 \text{ Kw.h}$$

$$\text{Custo do aquecimento} = 0,15 \text{ reais}$$

$$\text{x9} = 0,15 \text{ reais}$$

$x_1 + x_2 + x_3 + x_4 + x_5 + x_6 + x_7 + x_8 + x_9 = 0,88$ reais por batelada em biorreator PET 2L.

Se 666 produtores rurais multiplicarem o *Azospirillum brasilense* ao custo de 0,88 reais por batelada, gastarão 586 reais e poderão fertirrigar uma área de 866 hectares ao custo de **0,68 reais/hectare**.

4.5.2. Custo de Cada Batelada em Biorreator de 55L

4.5.2.1. Custos dos Reagentes

15 reais → 1000g ureia

$x_1 \rightarrow 300$ g ureia

$x_1 = 4,5$ reais

15 reais → 5000L água

$x_5 \rightarrow 50$ L

$x_5 = 0,15$ reais

3 reais → 1000g fubá

$x_2 \rightarrow 750$ g

$x_2 = 2,25$ reais

25 reais → 1000mL ácido fosfórico

$x_6 \rightarrow 5$ mL

$x_6 = 0,125$ reais

10 reais → 5000g açúcar

$x_3 \rightarrow 1500$ g açúcar

$x_3 = 3$ reais

200 reais → 2000mL Produto AZOS

$x_7 \rightarrow 150$ mL

$x_7 = 15$ reais

5 reais → 100g bicarbonato de sódio

$x_4 \rightarrow 12,5$ g bicarbonato de sódio

$x_4 = 0,63$ reais

4.5.2.2. Custo da Aeração

Para a aeração no biorreator de 55L foi usado um compressor de ar tipo nebulizador de 80w funcionando por 28 horas ao custo de 0,5 reais/kW.h

Energia consumida = potência x tempo (5)

Energia consumida = 0,08 Kw x 28h

Energia consumida = 2,24 Kw.h

Custo de Aeração = tarifa x energia consumida (6)

Custo de Aeração = 0,5 reais/kW.h x 2,24 Kw.h

Custo de Aeração = 1,12 reais

x8 = 1,12 reais

4.5.2.3. Custo do Aquecimento

Considerando perdas mínimas de energia no biorreator de 55L usando um aquecedor de 200W e 110V variando a temperatura de 20°C até 33°C consome:

$$Q = m.c.\Delta T \quad (7)$$

Q= energia (Joules ou Watts.segundo)

m= massa de água (Kg)

c= calor específico da água ((4,18J/(g.°C)

ΔT = variação de temperatura da água (°C)

Q= (50000g) x (4,18J/(g.°C) x (13°C)

Q=2,717 x 10⁶J

1J = 1watt.segundo

Q=2,717 x 10⁶J ou 2,717 x 10³ Kw.s

Convertendo em Kw.h temos:

$$Q = (2,717 \times 10^3 \text{ Kw.}\text{€}) \times (1 \text{ h}/3600\text{€})$$

$$Q = 0,755 \text{ Kw.h}$$

Custo do Aquecimento = tarifa x energia consumida (6)

$$\text{Custo do aquecimento} = 0,5 \text{ reais}/(\text{Kw.h}) \times 0,755 \text{ Kw.h}$$

$$\text{Custo do aquecimento} = 0,3775 \text{ reais}$$

$$\mathbf{x_9 = 0,3775 \text{ reais}}$$

$$x_1 + x_2 + x_3 + x_4 + x_5 + x_6 + x_7 + x_8 + x_9 = 27,15 \text{ reais por batelada em biorreator de 55L}$$

Se 13 produtores rurais multiplicarem o *Azospirillum brasilense* ao custo de 27,15 reais por batelada. Gastarão 353 reais e poderão fertirrigar uma área de 578 hectares ao custo de **0,61 reais/hectare**.

4.6. CÁLCULO DE ÁREA DE FERTIRRIGAÇÃO

4.6.1. Cálculo de Área Fertirrigada pelo Biorreator PET 2L

O produto Azos contendo *Azospirillum brasilense* cepa Ab-V5 de concentração 10^8 UFC/mL seguindo a recomendação do Laboratório Farroupilha, 500mL do produto Azos servem para ser aplicados em 1 hectare = 10 mil metros quadrados que corresponde 5×10^{10} UFC/hectare.

Utilizando-se 3mL de produto AZOS de concentração 10^8 UFC/mL em um processo de batelada em biorreator PET 2L, produz-se ao final de 24 horas **$6,90405 \times 10^{10}$ UFC** segundo cálculos na página 31.

$$10000 \text{ metros quadrados} \rightarrow 5 \times 10^{10} \text{ UFC/mL}$$

$$(\text{X metros quadrados}) \rightarrow 6,90405 \times 10^{10} \text{ UFC}$$

$$\mathbf{X = 1,3 \times 10^4 \text{ metros quadrados ou } X = 1,3 \text{ hectares}}$$

Uma bolsa do produto AZOS contém 2000mL e produzem 666 doses de 3mL. Se 666 produtores rurais utilizarem o biorreator PET 2L, ao todo produzirão bactérias para aplicarem em $666 \times 1,3$ hectares = **866 hectares**

4.6.2. Cálculo de Área Fertirrigada pelo Biorreator de 55L

O produto Azos contendo *Azospirillum brasilense* cepa Ab-V5 de concentração 10^8 UFC/mL seguindo a recomendação do Laboratório Farroupilha, 500mL do produto Azos servem para ser aplicados em 1 hectare = 10 mil metros quadrados que corresponde 5×10^{10} UFC/hectare.

Utilizando-se 150mL de produto AZOS de concentração 10^8 UFC/mL em um processo de batelada em biorreator de 55L, produz-se ao final de 28 horas **$2,2222 \times 10^{12}$ UFC** segundo cálculos na página 32.

10000 metros quadrados $\rightarrow 500\text{ml} \times 10^8\text{UFC/mL}$
(X metros quadrados) $\rightarrow 2,2222 \times 10^{12}$ UFC
 $X = 4,444 \times 10^5$ metros quadrados ou
X = 44,44 hectares

Uma bolsa do produto AZOS contém 2000mL e produzem 13 doses de 150mL. Se 13 produtores rurais utilizarem o biorreator de 55L, ao todo produzirão bactérias para aplicarem em $13 \times 44,44$ hectares = **578 hectares**

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Biorreator PET 2L

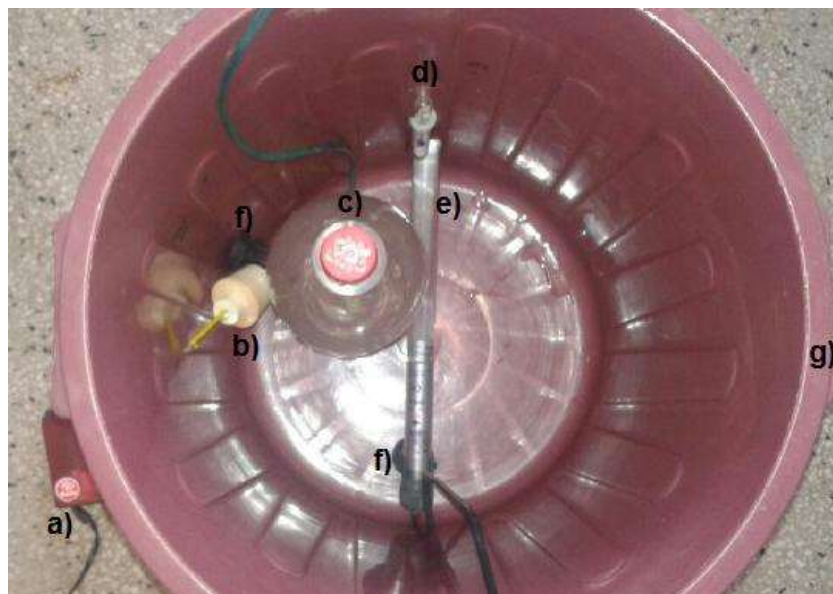
5.1.1. Inoculação do Meio de Cultura do Biorreator PET 2L

Figura 18: Produto comercial AZOS. Cedido pelo Laboratório Farroupilha contendo inoculante líquido baseado em uma bactéria diazotrófica *Azospirillum brasilense* cepa Ab-V5 com concentração de 10^8 UFC/mL.



Fonte: <http://www.labfarroupilha.com/Portifolio/azos>

Figura 19: Disposição do sistema PET 2L. a) Compressor 5W. b) Termômetro de fundo acoplado á rolha de borracha. c) Biorreator PET 2L. d) Termômetro de topo com ventosa. e) Aquecedor com termostato de 200W e 110V. f) Ventosas. g) Tambor de plástico.



Fonte: Próprio autor.

Figura 20: Biorreator PET 2L contendo meio de cultura alternativo e inóculo *Azospirillum brasilense* cepa Ab-V5 em tempo zero (logo após inoculação).



Fonte: Próprio autor.

Figura 21: Biorreator PET 2L contendo meio de cultura alternativo e inóculo *Azospirillum brasilense* cepa Ab-V5 vinte e quatro horas após inoculação. Nota-se a turvação do meio.



Fonte: Próprio autor

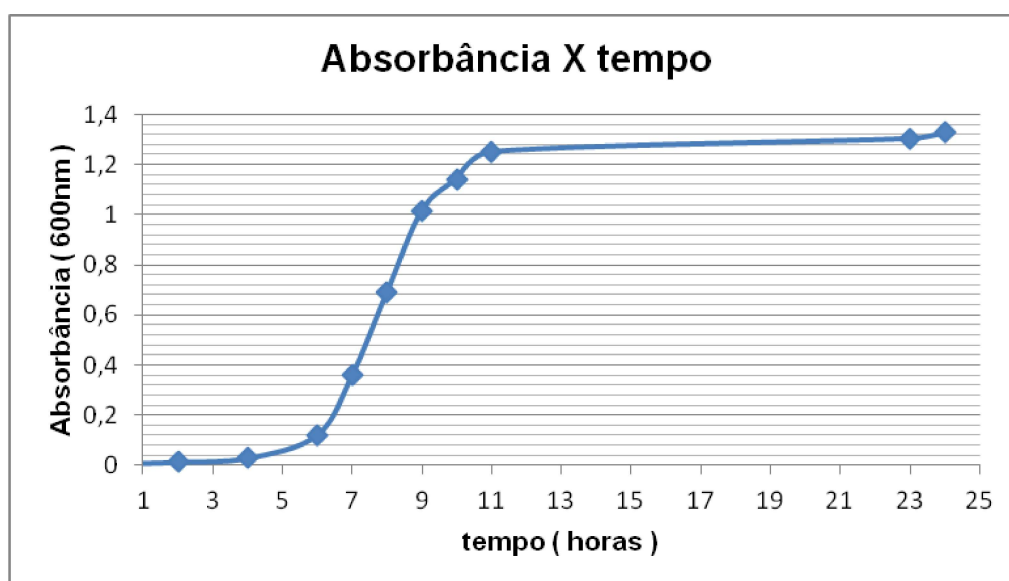
5.1.2. Curva de Crescimento do *Azospirillum brasilense* em Biorreator PET 2L

Tabela 1: Tabela de absorvância à 600nm do meio de cultura do biorreator PET 2L e seus respectivos tempos.

tempo (horas)	Absorvância 600nm
0	0,006
2	0,013
4	0,029
6	0,121
7	0,36
8	0,692
9	1,016
10	1,143
11	1,25
23	1,302
24	1,327

Fonte: Próprio autor.

Figura 22: Curva de crescimento do *Azospirillum brasilense*. Absorvância à 600nm do meio de cultura do biorreator PET 2L versus tempo.



Fonte: Próprio autor.

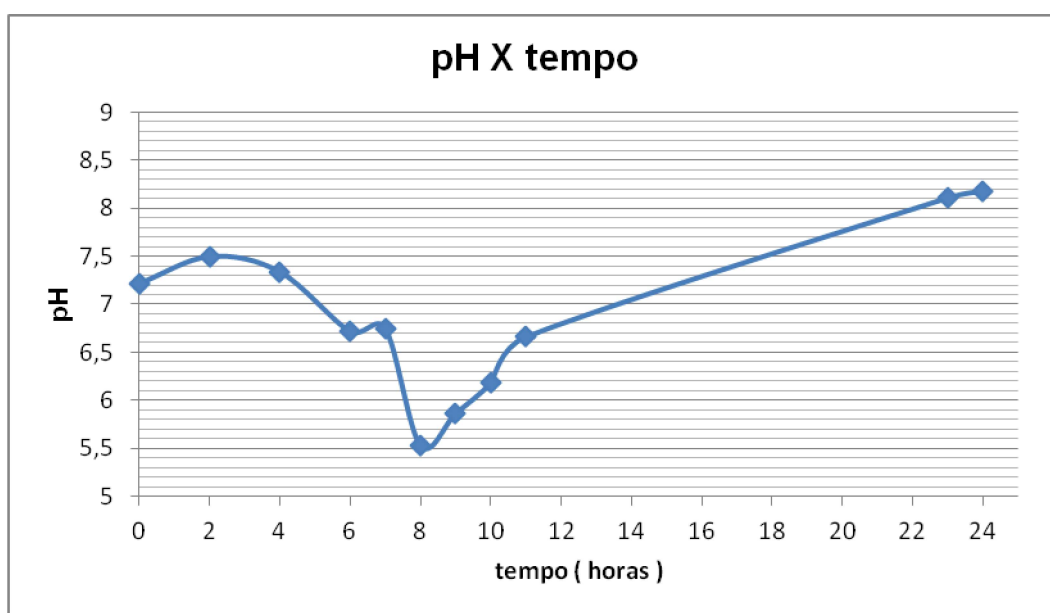
5.1.3. Curva de pH do *Azospirillum brasilense* em Biorreator PET 2L

Tabela 2: pH do meio de cultura do biorreator PET 2L e seus respectivos tempos.

tempo (h)	pH
0	7,22
2	7,5
4	7,34
6	6,72
7	6,75
8	5,53
9	5,86
10	6,18
11	6,66
23	8,11
24	8,18

Fonte: Próprio autor.

Figura 23: Curva de pH do meio de cultura do biorreator PET 2L ao longo de 24 horas.



Fonte: Próprio autor.

5.2. Biorreator de 55L

5.2.1. Inoculação do Meio de Cultura em Biorreator de 55L

Figura 18: Produto comercial AZOS cedido pelo Laboratório Farroupilha contendo inoculante líquido baseado em uma cepa da bactéria diazotrófica *Azospirillum brasilense* cepa Ab-V5 com concentração de 10^8 UFC/mL.



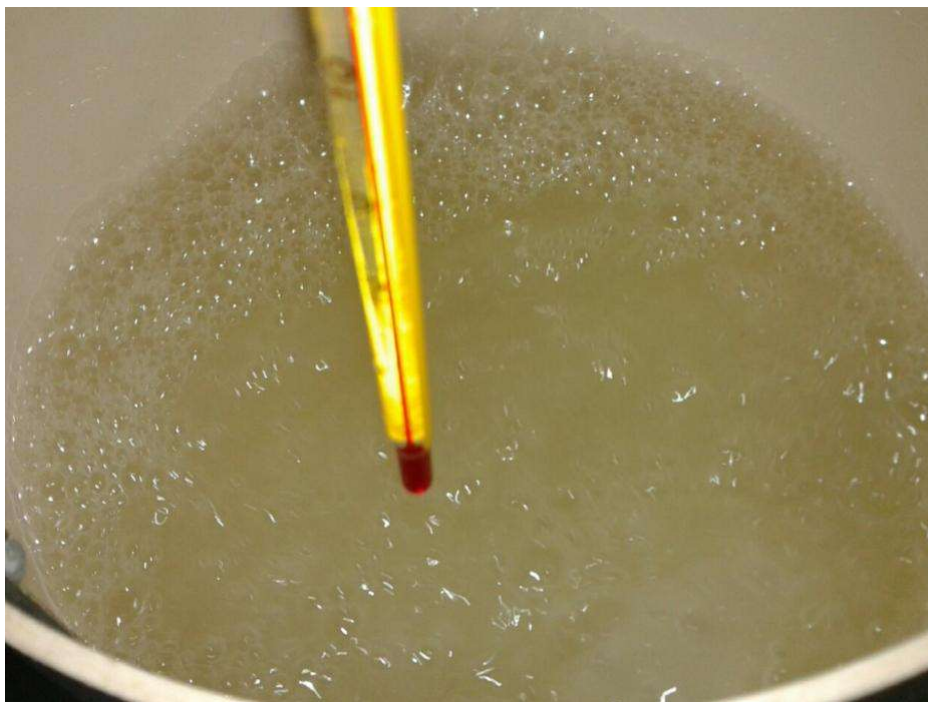
Fonte: <http://www.labfarroupilha.com/Portifolio/azos>

Figura 24: Biorreator de 55L e seu sistema de aeração por compressor de 80W e 110V.



Fonte: Próprio autor.

Figura 25: Interior do biorreator de 55L 24 horas após inoculação com *Azospirillum brasilense* cepa Ab-V5 . Nota-se a formação de bolhas.



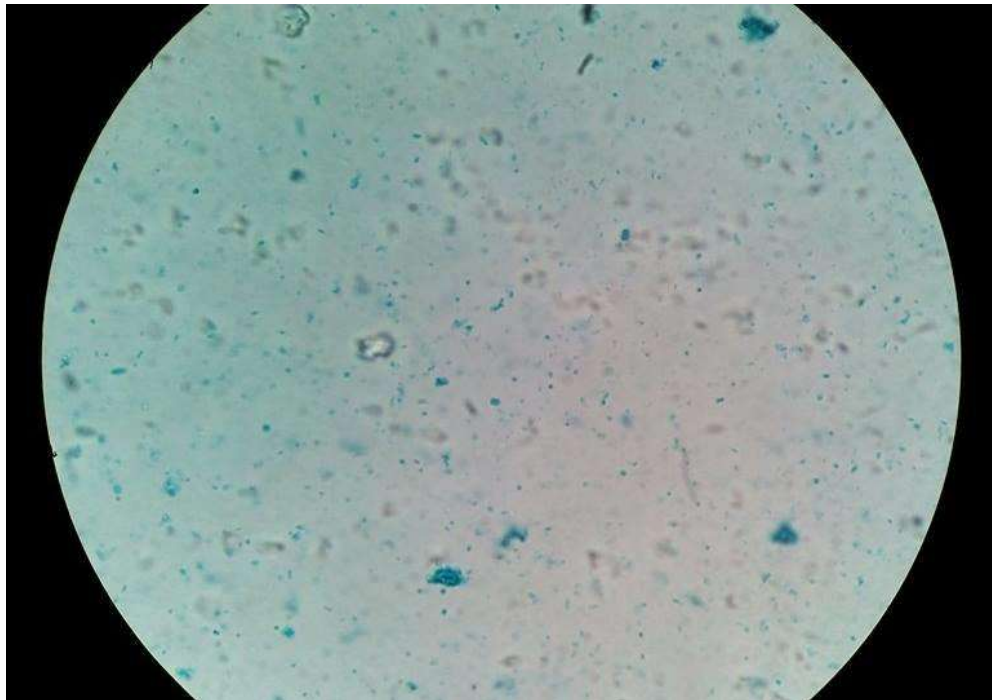
Fonte: Próprio autor.

Figura 26: Tubos Falcon. Da esquerda para direita tubo Falcon contendo meio de cultura sem *Azospirillum brasilense* ("Branco"), tubo Falcon contendo meio de cultura retirado do biorreator de 55L 24 horas após inoculação com *Azospirillum brasilense*, tubo Falcon contendo produto comercial AZOS de concentração 10^8 UFC/mL.



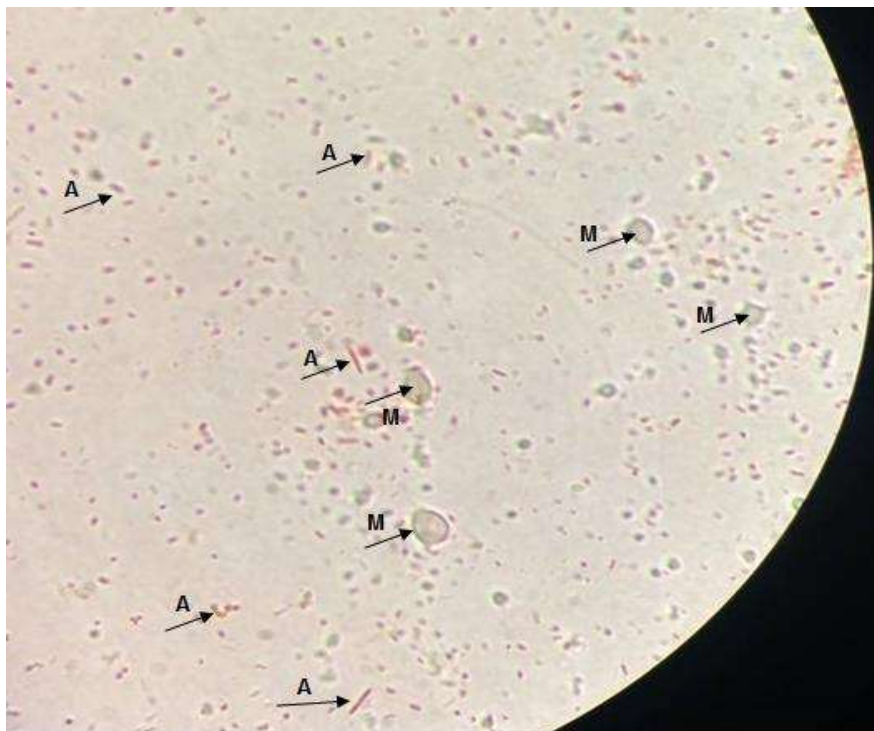
Fonte: Próprio autor.

Figura 27: Visualização microscópica de uma lâmina contendo produto comercial AZOS (*Azospirillum brasilense*) corado com verde malaquita e com aumento de 100 vezes.



Fonte: Próprio autor.

Figura 28: Visualização microscópica de uma lâmina contendo *Azospirillum brasilense* 28 horas após inoculação em biorreator de 55L, corado com safranina e com aumento de 100 vezes. Setas indicam: microalgas representadas por M e *Azospirillum brasilense* representados por A.



Fonte: Próprio autor.

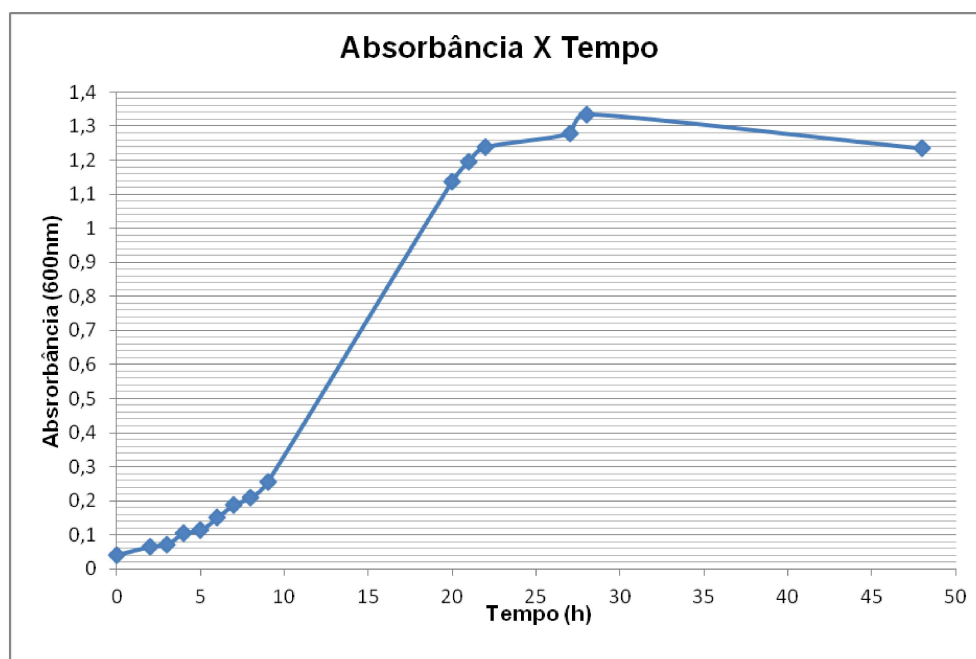
5.2.2. Curva de Crescimento do *Azospirillum brasilense* em Biorreator de 55L

Tabela 3: Absorbância do meio de cultura do biorreator de 55 L e seus respectivos tempos.

tempo(h)	absorbância 600 nm,
0	0,041
2	0,065
3	0,071
4	0,105
5	0,113
6	0,15
7	0,188
8	0,209
9	0,255
20	1,138
21	1,196
22	1,238
27	1,278
28	1,335
48	1,234

Fonte: Próprio autor.

Figura 29: Curva de crescimento do *Azospirillum brasilense* em biorreator de 55L. Absorbância à 600nm versus tempo.



Fonte: Próprio autor.

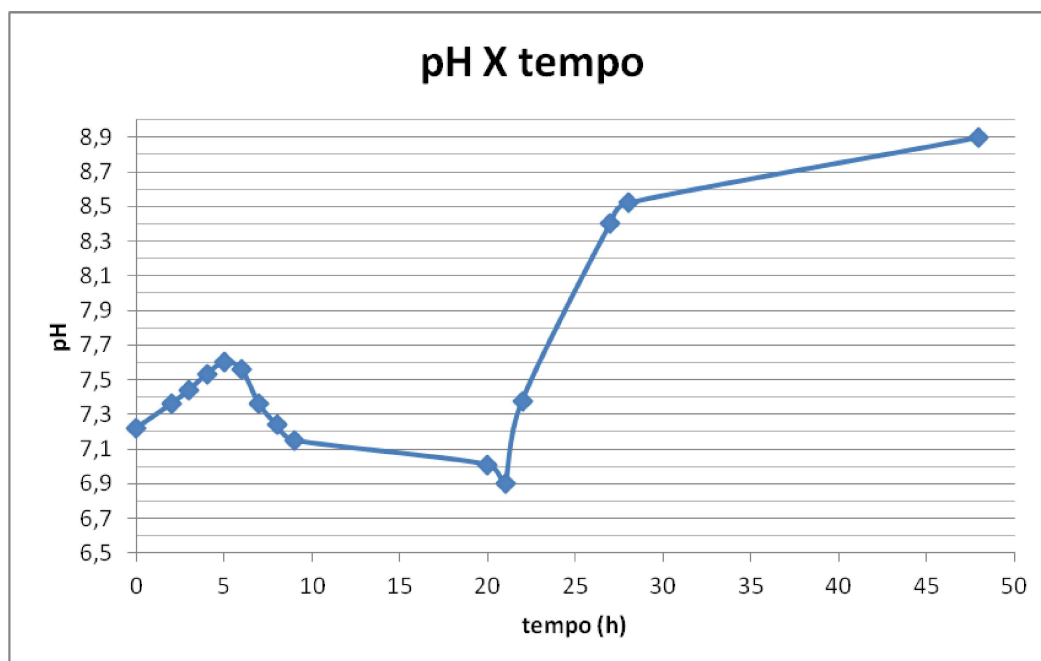
5.2.3. Curva de pH do *Azospirillum brasilense* em Biorreator de 55L

Tabela 4: pH do meio de cultura do biorreator de 55L e seus respectivos tempos.

tempo(h)	pH
0	7,22
2	7,36
3	7,44
4	7,53
5	7,6
6	7,56
7	7,36
8	7,24
9	7,15
20	7,01
21	6,9
22	7,38
27	8,4
28	8,52
48	8,9

Fonte: Próprio autor.

Figura 30: Curva de pH do meio de cultura do biorreator de 55L ao longo de 48 horas.



Fonte: Próprio autor.

Quanto ao sistema PET 2L, observou-se uma absorbância inicial no valor de 0,006. Nove horas após a inoculação nota-se maior crescimento microbiano devido a inclinação da reta nesse ponto. Na nona hora em diante ocorre a diminuição do crescimento microbiano devido a indisponibilidade de alguns nutrientes e inibição do crescimento por ação de produção de certos metabólitos. Vinte e quatro horas após a inoculação ocorre término de crescimento microbiano. As primeiras quatro horas após a inoculação observou-se a fase Lag (indicada pela pequena inclinação da curva do gráfico) em que ocorre pouco crescimento do *Azospirillum brasilense*, devido a adaptação do microrganismo ao meio de cultura. Da quarta hora até a décima hora após a inoculação, observa-se a fase Log (indicada pela grande inclinação do gráfico) período em que ocorre grande crescimento do *Azospirillum brasilense*. Da décima hora até a vigésima quarta hora observa-se a fase estacionária (indicada pela pequena inclinação do gráfico) em que ocorre a diminuição do crescimento microbiano. Não foi possível observar a fase de declínio por limitação do método espectrofotométrico, uma vez que tal método mede a absorbância do meio de cultura e não diferencia microrganismos vivos de microrganismos mortos.

Observou-se o pH inicial no valor de 7,22 que aumentou até o valor 7,5 até a segunda hora. Da segunda hora até a oitava hora o pH decresce até o seu ponto mínimo cujo valor foi de 5,53. A partir desse ponto o pH começa a aumentar até a vigésima quarta hora pós a inoculação cujo valor máximo foi de 8,18. Tal fato pode ter sido ocasionado pela liberação de algumas proteínas do interior das bactérias para o meio de cultura após a morte de algumas dessas bactérias ou por excesso de amônia provinda da desnitrificação da ureia através de bactérias desnitrificantes oriundas da água e esta não é estéril. Pela recomendação do fabricante Laboratório Farroupilha, 500mL do produto Azos de concentração 10^8 UFC/mL servem para ser aplicados em 1 hectare que corresponde 5×10^{10} UFC/hectare.

Em 1500mL de meio de cultura utilizando 3mL de produto AZOS, (que segundo o fabricante laboratório Farroupilha contém bactérias *Azospirillum*

brasiliense de concentração 10^8 UFC/mL) em um processo de batelada em biorreator PET 2L, produz-se ao final de 24 horas uma solução bacteriana de concentração **$0,46027 \times 10^8$ UFC/mL** num total de $6,90405 \times 10^{10}$ UFC que servem para serem usados em 1,3 hectares, tais resultados estão de acordo com o esperado pois, através da especificação da aplicação no rótulo do produto AZOS de concentração 10^8 UFC/mL uma dose de 500mL servem para serem aplicados em 1 hectare, obteve-se nesse biorreator uma solução bacteriana não muito discrepante da solução original.

Quanto ao biorreator de 55L, observou-se uma absorbância inicial no valor de 0,041. Da décima hora posterior a inoculação até a vigésima segunda hora nota-se maior crescimento microbiano devido a inclinação da reta nesse ponto. Na vigésima segunda hora em diante ocorre a diminuição do crescimento microbiano devido a indisponibilidade de alguns nutrientes e inibição do crescimento por ação de produção de certos metabólitos. Quarenta e oito horas após a inoculação ocorre o término de crescimento microbiano. As primeiras três horas após a inoculação observou-se a fase Lag (indicada pela leve inclinação da curva do gráfico) em que ocorre pouco crescimento do *Azospirillum brasiliense*, devido a adaptação do microrganismo ao meio de cultura. Da terceira hora até a vigésima segunda hora após a inoculação, observa-se a fase Log (indicada pela grande inclinação do gráfico) período em que ocorre grande crescimento do *Azospirillum brasiliense*. Da vigésima segunda hora até à quadragésima oitava hora observa-se a fase estacionária (indicada pela pequena inclinação do gráfico) em que ocorre a diminuição do crescimento microbiano. Não foi possível observar a fase de declínio por limitação do método espectrofotométrico, uma vez que tal método mede a absorbância do meio de cultura e não diferencia microrganismos vivos de microrganismos mortos.

Observou-se o pH inicial no valor de 7,22 que aumentou até o valor 7,6 até a quinta hora. Da quinta hora até a vigésima primeira hora o pH decresce até o seu ponto mínimo cujo valor foi de 6,9. A partir desse ponto o pH começa a aumentar até a quadragésima oitava hora pós a inoculação cujo valor máximo foi de 8,9.

Tal fato pode ter sido ocasionado pela liberação de algumas proteínas do interior das bactérias para o meio de cultura após a morte de algumas dessas bactérias ou por excesso de amônia provinda da desnitrificação da ureia através de bactérias desnitrificantes oriundas da água e esta não é estéril..

Utilizando-se 150mL de produto AZOS, (que segundo o fabricante laboratório Farroupilha contém bactérias *Azospirillum brasilense* de concentração 10^8 UFC/mL) em um processo de batelada em biorreator de 55L, produz-se ao final de 48 horas uma solução bacteriana de concentração **$0,46293 \times 10^8$ UFC/mL** num total de **$2,2222 \times 10^{12}$ UFC** que servem para serem usados em 44,44 hectares, tais resultados estão de acordo com o esperado pois, através da especificação da aplicação no rótulo do produto AZOS de concentração 10^8 UFC/mL uma dose de 500mL servem para serem aplicados em 1 hectare ou seja 50L do produto AZOS servem para serem aplicados em 100 hectares. Obteve-se também nesse biorreator uma solução bacteriana não muito discrepante da solução original.

CONCLUSÃO

Através do método espectrofotométrico que proporcionou a análise das absorbâncias no decorrer do tempo pôde-se concluir que ocorreu crescimento microbiano com o meio alternativo composto por: fubá 15g/L, ureia 6g/L, açúcar 30g/L, ácido fosfórico 0,25g/L e bicarbonato de sódio 0,19g/L. Obteve-se bons resultados quanto a multiplicação do *Azospirillum brasilense* nos dois biorreatores por método de espectrofotometria possibilitando o cálculo do rendimento no biorreator PET 2L indicando 230 vezes o número de bactérias inicial, já o rendimento em biorreator de 55L foi de 148 vezes o número de bactérias inicial. O menor rendimento deste biorreator pode ter sido ocasionado por uma menor aeração do meio de cultivo devido a baixa potência do compressor de ar, uma vez que este não acompanhou uma potência proporcional ao aumento de escala do biorreator de 55L. No rótulo do produto AZOS e este possui solução bacteriana com *Azospirillum brasilense* de concentração 10^8 UCF/mL indica a aplicação de 500mL/hectare e de posse desses dados foi possível mensurar a área fertirrigada pelo sistema PET 2L, sendo de 1,3 hectares/batelada ao custo de 0,68 reais/hectare e pelo biorreator de 55L foi 44,44 hectares/batelada ao custo de 0,61 reais/batelada.

As projeções são de que, nos próximos anos, haverá um incremento substancial no uso de fertilizantes no Brasil para atender à intensificação da agricultura e à recuperação de áreas degradadas. O mercado brasileiro de fertilizantes, porém, é frágil e com grande dependência das importações, que hoje são responsáveis pelo fornecimento de 73% do nitrogênio, 49% do fósforo e 90% do potássio consumidos. Embora existam planos de instalação de novas indústrias e abertura de novas áreas de exploração de minerais, a situação nos próximos dez anos é bastante crítica. Desse modo, o uso de bactérias fixadoras de nitrogênio e bactérias promotoras do crescimento de plantas que aumentem a eficiência na assimilação dos fertilizantes, e que aportem nitrogênio via fixação biológica representa uma estratégia viável economicamente, além dos benefícios ambientais associados à redução no uso de fertilizantes.

Em trabalhos futuros será necessário otimizar o processo de multiplicação dessas bactérias usando ferramentas estatísticas como planejamento fatorial, biorreatores de bancada dentro de estufas agitadas, com ventilação e aquecimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BÁRBARO, I.M; BRANCALÃO, S.R.; TICELLI, M. **É possível a fixação biológica de nitrogênio no milho?** 2008. Disponível em: <<http://www.aptaregional.sp.gov.br/acesse-os-artigos-pesquisa-e-tecnologia/edicao-2008/2008-janeiro-junho/539-e-possivel-a-fixacao-biologica-de-nitrogenio-no-milho/file.html>>. Acesso em: 28 agosto 2016.

BITTENCOURT, J.V.M. et al. **Sistemas de Produção Agropecuária (Ciências Agrárias, Animais e Florestais: Inoculantes Agrícolas.** Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *Campus Dois Vizinhos*. p. 323, 2010.

BOSSOLAN, Nelma R. Segnini. **Introdução à Microbiologia.** São Carlos-SP, 2002.

CAMPOS, D.V.B. de; SILVA, G. da; ALENCAR, S.M. de; ALVES, B.J.R.; URQUIAGA, S.; WITTY, J.; BODDEY, R.M. **Utilização de microeletrodos de oxigênio visando a detecção de sítios de FBN em plantas e culturas de bactérias diazotróficas.** Seropédica: Embrapa Agrobiologia, dez. 1999 22p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 111)

CASSINI, Servio Tulio. **Ciclo do Nitrogênio.** Disponível em: http://www.inf.ufes.br/~neyval/Gestao_ambiental/Tecnologias_Ambientais2005/Ecologia/CicloNPS.do c. Acesso em: 31 outubro 2016.

CIENFUEGOS, F.; VAITSMAN, D. **Análise Instrumental.** Rio de Janeiro: Interciência, 2000.

CHISTI, M.Y. **Airlift bioreactors.** 1ª Edição, London, England e New York, USA: Elsevier applied science, 1989.

FERNANDES, V. HUGO et al. **Cultivo de *Azospirillum Amazonense* BR11145 Para Produção de Inoculantes Promotores de Crescimento Vegetal.** Rev. de Ci. Exatas, RJ, Edur, v. 33 n. 2, jan. / jun., p. 87-97, 2014.

Disponível em:

<<http://www.ufrj.br/SEER/index.php?journal=rce&page=article&op=download&path%5B%5D=1833&path%5B%5D=1528>>. Acesso em: 28 agosto 2016.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R., MENDES, I. C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto**

brasileiro. Embrapa Soja. Londrina, PR 2007. Disponível em:<

<https://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwiRmeUoLnLAhXIQ5AKHbyQA70QFggiMAE&url=https%3A%2F%2Fwww.infoteca.cnptia.embrapa.br%2Fbitstream%2Fdoc%2F468512%2F1%2FDocumentos283.pdf&usg=AFQjCNHAXxoptMAQUWBGOx3X0tG0IJknMQ&bvm=bv.116573086,d.Y2I>> Acesso em: 29 agosto 2016.

ISHERWOOD, K.F. **O Uso de Fertilizantes Minerais e o Meio Ambiente.** Paris, França, 2000.

MARIN, A. V.R. *et al.* **Fixação biológica de nitrogênio: Bactérias fixadoras de nitrogênio de importância para a agricultura tropical.** Embrapa Agrobiologia. p.13, 1999. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/598661/fixacao-biologica-de-nitrogenio-bacterias-fixadoras-de-nitrogenio-de-importancia-para-a-agricultura-tropical>>

Acesso em: 28 agosto 2016.

MARTINS , C. R. *et.al.* **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola.** Ciclos Globais de Carbono, Nitrogênio e Enxofre: A Importância da Química na Atmosfera. p.7, 2003. Disponível em: <http://zeus.qui.ufmg.br/~qgeral/downloads/material/quimica_da_atmosfera.pdf> Acesso em: 29 agosto 2016.

NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Bioquímica e fisiologia da fixação de nitrogênio. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. eds. **Microbiologia do solo.** Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p.141-155 .

MENDES, I.; JUNIOR, F. B. R.; CUNHA, M. H.a. **20 Perguntas e respostas sobre fixação biológica de nitrogênio.** EMBRAPA Cerrados, Planaltina-DF, 2010

RIBEIRO, D. **Processo de Haber-Bosch.** Revista de Ciência Elementar. Nº1 , Vol I, 2013. Disponível em: <http://www.fc.up.pt/pessoas/jfgomes/pdf/vol_1_num_1_26_art_processoHaberBosch.pdf>. Acesso em: 28 agosto 2016

SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industria - Engenharia Bioquímica.** São Paulo-SP, EDGARD BLÜCHER. Vol.II, p.179-203, 1983.

SKOOG, D.A.; WEST, D.M.; HOLLER, F.J.;CHOUCH,S.R. **Fundamentos de Química Analítica**, 8ª Edição, São Paulo: Cengage, 2009.

PERDOMO, F. R. *et al.* **Pastos y Forrajes.** Efecto de la temperatura y el pH en la producción de biomasa de *Azospirillum brasilense* C16 aislada de pasto guinea (Factores fsicoquímicos en el crecimiento de *A. brasilense* C16.) Vol. 38, Nº. 3, Laboratorio de Microbiología de Suelos, Centro de

Investigación Tibaitatá, Corporación Colombiana de Investigación
Agropecuaria-Corpoica julio-septiembre, 171-175, 2015 .