



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

CÍVITA TEIXEIRA DE SOUSA

**PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE *Bacillus* sp. RAB9 POR FERMENTAÇÃO
SUBMERSA**

FORTALEZA

2013

CÍVITA TEIXEIRA DE SOUSA

**PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE *Bacillus* sp. RAB9 POR FERMENTAÇÃO
SUBMERSA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientador: Dr. Gustavo Adolfo Saavedra Pinto.

FORTALEZA

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Pós-Graduação em Engenharia – BPGE

S696p Sousa, Cívita Teixeira de.
Sousa. – 2013 Produção de biomassa de *Bacillus* sp. RAB9 por fermentação submersa/Cívita Teixeira de
76 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Departamento
de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2013.
Área de Concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.
Orientação: Prof. Dr. Gustavo Adolfo Saavedra Pinto.
1. Engenharia Química. 2. Fermentação. I. Título.

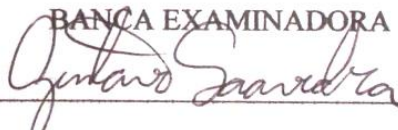
CÍVITA TEIXEIRA DE SOUSA

**PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE *Bacillus* sp. RAB9 POR FERMENTAÇÃO
SUBMERSA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

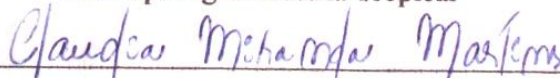
Aprovada em: 04 / 03 / 2013 .

BANCA EXAMINADORA



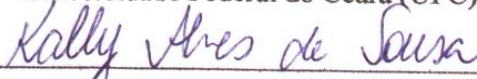
Dr. Gustavo Adolfo Saavedra Pinto (Orientador)

Embrapa Agroindústria Tropical



Dra. Claudia Miranda Martins

Universidade Federal do Ceará (UFC)



Dra. Kally Alves de Sousa

Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos meus pais, Nonato e Célia.

AGRADECIMENTO

A Deus por me guiar a cada dia, dar ânimo nos momentos difíceis, conceder-me sabedoria e serenidade necessária para a caminhada e por muitas alegrias colhidas nas lutas e conquistas.

A Universidade Federal do Ceará, pela oportunidade de realizar a graduação em Engenharia de Alimentos e o mestrado em Engenharia Química.

A Embrapa Agroindústria Tropical, pela oportunidade de realização da parte experimental deste trabalho.

A Capes, pelo apoio financeiro.

Ao Dr. Gustavo Adolfo Saavedra Pinto, pela orientação da dissertação, pelo contínuo aprendizado, formação e pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

Aos meus pais, pelos conselhos, carinho, incentivo, serem mais do que pais, amigos que sempre me escutam e apóiam minhas escolhas.

Aos meus irmãos, familiares e amigos que participaram direto ou indiretamente da minha vida acadêmica pelo apoio e torcida.

Aos colegas da turma de Mestrado pela valiosa companhia nas disciplinas e nos grupos de estudo.

A Dra. Terezinha Feitosa, pela orientação na iniciação científica e a equipe do Laboratório de Microbiologia de Alimentos com quem partilhei bons momentos e obtive grande aprendizado.

A grande família do Laboratório de Bioprocessos, que me concederam momentos de descontração, amizades e sempre uma mãozinha quando precisei, fez toda diferença no meu dia a dia.

Aos participantes da banca examinadora pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

“Tudo posso naquele que me fortalece.”

(Filipenses 4,13)

RESUMO

As bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCP) representam uma parcela funcional ativa da biota do solo, são presentes na rizosfera, no rizoplano e no interior de plantas hospedeiras. O uso biotecnológico dessas bactérias tem se intensificado nos últimos anos. O gênero *Bacillus* vem sendo continuamente citado em estudos relacionados a promoção de crescimento em espécies vegetais. Algumas espécies podem ser aplicadas no tratamento de sementes, órgãos de propagação vegetativa e mudas. Diante disso o presente trabalho teve como objetivo avaliar a produção de biomassa de *Bacillus* sp. (RAB9), com potencial uso na promoção de crescimento de mudas de bananeira. A cepa *Bacillus* sp. (RAB9) pertencente ao grupo das bactérias epifíticas, foi isolada de rabanete, proveniente da Coleção de Culturas do Laboratório de Fitobacteriologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Os experimentos foram realizados em agitador orbital e em reator de bancada. Em agitador orbital foi estudada a curva de crescimento da linhagem a 30°C para observar sua fase exponencial. Para a produção de biomassa foram observados os efeitos da adição do teor de peptona (5,0; 10,0; 25,0 e 50,0 g.L⁻¹) no meio NYD (extrato de carne, extrato de levedura, peptona de carne e dextrose), adição de elementos secundários (K₂HPO₄, MgSO₄) e fonte de nitrogênio inorgânico ((NH₄)₂SO₄). Em reator de bancada foram realizados testes com diferentes vazões de ar em batelada simples, bem como uma comparação com batelada alimentada com o meio modificado. As fermentações nos reatores apresentaram formação de espuma, testes foram feitos com óleos vegetais (milho, canola, girassol, soja) e mineral para verificação do melhor antiespumante. Posteriormente aos testes foram quantificadas a biomassa, o açúcar residual, nitrogênio residual e nitrogênio amoniacal. Com os resultados obtidos foi observado a importância da adição dos elementos (MgSO₄, (NH₄)₂SO₄) ao meio NYD e da vazão de ar sobre o crescimento da cepa. Com os parâmetros estudados foram determinadas as melhores condições para a produção de *Bacillus* sp. RAB9.

Palavras-chave: bactéria promotora de crescimento, fermentação submersa, batelada alimentada

ABSTRACT

The growth-promoting bacteria in plants (BPCP) represents a functional portion of the active biota soil, rhizosphere are present in rhizoplane and within host plants. The biotechnological use of these bacteria has intensified in recent years. The genus *Bacillus* has been continually cited in studies related to growth promotion in plant species. Some species can be applied as a seed treatment, organs for the vegetative propagation and seedling. Therefore this study aimed to assess the biomass of *Bacillus* sp. (RAB9), with potential use in promoting growth of banana plantlets. The strain *Bacillus* sp. (RAB9) belonging to the group of epiphytic bacteria, was isolated from radish from the Culture Collection of the Laboratory of Fitobacteriologia Federal Rural University of Pernambuco. The experiments were performed on an orbital shaker and batch reactor. In orbital shaker was studied growth curve of strain at 30°C to observe their exponential phase. For the production of biomass were observed the effects of adding the content of peptone (5.0, 10.0, 25.0 and 50.0 g.L⁻¹) in NYD medium (meat extract, yeast extract, meat peptone and dextrose), addition of secondary elements (K₂HPO₄, MgSO₄) and inorganic nitrogen source ((NH₄)₂SO₄). In batch reactor tests were conducted with different air flows in simple batch and fed batch with a comparison with the modified medium. The fermentations presented in the reactors foaming tests were made with vegetable oils (corn, canola, sunflower, soybean) and to verify the best mineral defoamer. Later tests were quantified biomass, residual sugar, residual nitrogen and ammonia nitrogen. With the results noted the importance of the addition of elements (MgSO₄, (NH₄)₂SO₄) in half NYD and air flow on the growth of strain. With the studied parameters were determined the best conditions for the production of *Bacillus* sp. RAB9.

Keywords: growth promoting bacteria, submerged fermentation, fed batch

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Fluxograma das etapas de manutenção ao inóculo.....	13
Figura 2: Exemplo de curva padrão da cepa <i>Bacillus</i> sp. RAB9, obtida em julho de 2012....	21
Figura 3: Curva de crescimento da cepa de <i>Bacillus</i> sp. RAB9.....	22
Figura 4: Pareto com efeitos das variáveis sobre a produção de biomassa em 5,0 g.L ⁻¹ de peptona.....	27
Figura 5: Pareto com efeitos das variáveis sobre açúcar residual em 5,0 g.L ⁻¹ de peptona....	28
Figura 6: Pareto com efeitos das variáveis sobre nitrogênio residual em 5,0 g.L ⁻¹ de peptona.....	29
Figura 7: Pareto com efeitos das variáveis sobre produção de biomassa em 50,0 g.L ⁻¹ de peptona.....	31
Figura 8: Pareto com efeitos das variáveis sobre açúcar residual em 50,0 g.L ⁻¹ de peptona.....	32
Figura 9: Pareto com efeitos das variáveis sobre nitrogênio residual em 50,0 g.L ⁻¹ de peptona.....	33
Figura 10: Produção de biomassa nas diferentes concentrações de sulfato de magnésio.....	35
Figura 11: Açúcar residual nas diferentes concentrações de sulfato de magnésio.....	35
Figura 12: Nitrogênio residual nas diferentes concentrações de sulfato de magnésio.....	36
Figura 13: Pareto com efeitos das variáveis sobre a produção de biomassa.....	38
Figura 14: Pareto com efeitos das variáveis sobre açúcar residual.....	39
Figura 15: Pareto com efeitos das variáveis sobre nitrogênio residual.....	40
Figura 16: Pareto com efeitos das variáveis sobre nitrogênio amoniacal.....	41
Figura 17: Efeito dos óleos vegetal e mineral como agentes antiespumante para a cepa RAB9.....	44
Figura 18: Tubos com óleos vegetais e mineral após centrifugação com a cepa RAB9.....	44
Figura 19: Produção de Biomassa com vazões de ar 2, 4, 6 e 8 L/min.....	45
Figura 20: Açúcar residual com vazões de ar 2, 4, 6 e 8 L/min.....	46
Figura 21: Nitrogênio residual com vazões de ar 2, 4, 6 e 8 L/min.....	47
Figura 22: Nitrogênio amoniacal com vazões de ar 2, 4, 6 e 8 L/min.....	47
Figura 23: Produção de biomassa em batelada alimentada com meios 1 e 2.....	50
Figura 24: Açúcar residual obtido em batelada alimentada com meios 1 e 2.....	51

Figura 25: Nitrogênio residual obtido em batelada alimentada com meios 1 e 2.....	51
Figura 26: Nitrogênio amoniacal obtido em batelada alimentada com meios 1 e 2.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Delineamento do planejamento fatorial 2^2 com as variáveis codificadas e reais.....	16
Tabela 2: Delineamento do planejamento fatorial 3^2 com as variáveis codificadas e reais.....	16
Tabela 3: Efeito da adição de peptona na produção de biomassa e açúcar residual para a cepa RAB9.....	24
Tabela 4: Valores comerciais dos componentes do meio NYD.....	25
Tabela 5: Valores da produção de biomassa para as concentrações de peptona no meio de fermentação.....	25
Tabela 6: Efeito da adição de elementos secundários sobre as variáveis dependentes: produção de biomassa, açúcar residual (AR) e nitrogênio residual com $5,0 \text{ g.L}^{-1}$ de peptona.....	26
Tabela 7: Anova dos efeitos das variáveis independentes sobre a produção de biomassa.....	27
Tabela 8: Anova dos efeitos das variáveis independentes sobre o açúcar residual.....	28
Tabela 9: Anova dos efeitos das variáveis independentes sobre nitrogênio residual.....	29
Tabela 10: Efeito da adição de elementos secundários sobre as variáveis dependentes: produção de biomassa, açúcar residual (AR) e nitrogênio residual com $50,0 \text{ g.L}^{-1}$ de peptona.....	30
Tabela 11: Anova dos efeitos das variáveis independentes sobre produção de biomassa.....	30
Tabela 12: Anova dos efeitos das variáveis independentes sobre açúcar residual.....	32
Tabela 13: Anova dos efeitos das variáveis independentes sobre nitrogênio residual.....	33
Tabela 14: Efeito da adição de peptona e sulfato de amônio em meio NYD para biomassa, açúcar residual, nitrogênio residual e amoniacal.....	37
Tabela 15: Anova dos efeitos das variáveis independentes sobre a produção de biomassa....	38
Tabela 16: Anova dos efeitos das variáveis independentes sobre o açúcar residual.....	39
Tabela 17: Anova dos efeitos das variáveis independentes sobre nitrogênio residual.....	40
Tabela 18: Anova dos efeitos das variáveis independentes sobre nitrogênio amoniacal.....	41
Tabela 19: Valores calculados para o meio NYD e NYD modificado.....	42
Tabela 20: Fatores de conversão de substrato em biomassa (Y_{XS}) e rendimentos em biomassa (Y_{RS}) para os testes de fermentação.....	48
Tabela 21: Valores de custos para o processo empregando com diferentes vazões de ar.....	49

SUMÁRIO

I - INTRODUÇÃO.....	1
II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 – BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO (BPCP).....	4
2.2 – OTIMIZAÇÃO DE PROCESSOS FERMENTATIVOS.....	6
2.3 – PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE <i>Bacillus</i>.....	8
2.4 – MEIOS DE CULTIVO DE <i>Bacillus</i>.....	9
III – MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
3.1 - MICRO- ORGANISMO.....	13
3.1.1 - Manutenção e ativação.....	13
3.1.2 - Preparo e inóculo.....	13
3.2 - MEIO DE CULTURA.....	14
3.2.1 - Meio de Manutenção.....	14
3.2.2 - Meio NYD.....	14
3.3 – CURVAS - PADRÃO DE BIOMASSA.....	14
3.4 - PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM FRASCOS AGITADOS.....	15
3.4.1 - Determinação da curva de crescimento em meio NYD.....	15
3.4.2 - Efeito da adição de Peptona.....	15
3.4.3 - Efeito da adição de Sulfato de Magnésio e Fosfato de Potássio.....	15
3.4.4 - Efeito da substituição parcial da Peptona por Sulfato de Amônio.....	16
3.4.5 - Avaliação do antiespumante a ser empregado.....	16
3.5 - PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM BIORREATOR.....	16
3.5.1 - Influência da vazão de ar na produção de biomassa de <i>Bacillus</i> sp. (RAB 9).....	17
Teste preliminar.....	17
Produção de biomassa com meio NYD modificado.....	17
Por Batelada simples.....	17

Por Batelada alimentada.....	18
3.6- DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS.....	18
3.6.1 - Determinação de biomassa.....	18
3.6.2 - Determinação açúcar residual.....	18
3.6.3 - Determinação do pH.....	19
3.6.4 - Determinação nitrogênio residual.....	19
3.6.5 - Determinação nitrogênio amoniacal.....	20
IV – RESULTADOS E DISCURSÃO.....	21
4.1 - DETERMINAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO.....	21
4.2 - EFEITO DA ADIÇÃO DE PEPTONA.....	23
4.3 - EFEITO DA ADIÇÃO DE SULFATO DE MAGNÉSIO E FOSFATO DE POTÁSSIO.....	25
4.3.1 - Avaliação da concentração de Sulfato de Magnésio.....	34
4.4 - EFEITO DA SUBSTITUIÇÃO PARCIAL DA PEPTONA POR SULFATO DE AMÔNIO.....	36
4.5 - TESTES PRELIMINARES EM BIORREATOR.....	42
4.6 - SELEÇÃO DO ANTIESPUMANTE A SER UTILIZADO NO PROCESSO EM BIORREATOR.....	43
4.7 - FERMENTAÇÃO COM O MEIO NYD MODIFICADO.....	44
4.8 - TESTE EM BIORREATOR EM BATELADA ALIMENTADA.....	49
V - CONCLUSÕES.....	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

I - INTRODUÇÃO

A cultura da banana ocupa o segundo lugar em volume de frutas produzidas no Brasil, perdendo apenas para a laranja. O consumo aparente per capita nacional é estimado em torno de 20 kg/hab./ano. A produção de banana é distribuída por todas as regiões do país, sendo a região Nordeste a maior produtora, seguida das regiões Sudeste, Norte, Sul e Centro-Oeste. A região nordeste detém uma produção de 2.702.683 toneladas em 207.796 mil hectares, que representa um rendimento anual de 13.591 toneladas. O Estado do Ceará apresentou, em 2011, a segunda maior produção de banana do Nordeste.

A evolução da bananicultura brasileira foi possível em virtude dos progressos obtidos no que se refere à disponibilidade de material genético diversificado, à disponibilidade de mudas sadias e de boa qualidade genética, às práticas culturais de manejo pré e pós-colheita, às técnicas fitossanitárias desenvolvidas, às técnicas de nutrição e de irrigação, e à melhoria do nível técnico e organizacional do bananicultor brasileiro.

O sucesso do empreendimento agrícola depende em grande parte da qualidade da muda. Preferencialmente, devem ser escolhidas mudas de bananeira procedentes de cultura de tecidos ou de viveiros com plantas em idade não superior a três anos, ou seja, mudas originárias de áreas estabelecidas com a finalidade exclusiva de produção de material propagativo ou mudas de qualidade superior.

Uma agricultura sustentável requer a utilização de estratégias que permitam o aumento da produção de alimentos sem prejuízo ao meio ambiente e saúde, dentro do contexto econômico, social e político de cada região. Uma das alternativas potenciais para atingir este objetivo é o uso das bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP), considerando sua fácil aplicação em tratamento de sementes, raízes e também da parte aérea. Por outro lado, estas bactérias são nativas nos solos ou plantas, não interferindo no equilíbrio ecológico e, portanto enquadrando-se plenamente na realidade da agricultura orgânica e sustentável.

BPCPs podem ser introduzidas em cultura de tecidos em estádios iniciais de multiplicação e propagadas por sucessivas gerações como epifíticas ou endofíticas multiplicando-se por explantes nodais sem precisar reinocular, influenciando a resposta a estresses bióticos e abióticos. Esses organismos podem agir também por competição, ocupando sítios e tornando-os indisponíveis aos patógenos. No âmbito da agricultura sustentável, certos grupos de organismos podem beneficiar mais de uma cultura num sistema

de rotação no campo e misturas rizobactérias-micorrizas podem, além da ação direta, atuar indiretamente melhorando a agregação do solo.

As BPCP atuam indiretamente pela supressão de doenças e diretamente pela produção de ácido cianídrico (HCN), produção ou alteração da concentração de fitohormônios, fixação de nitrogênio, solubilização de fosfatos minerais ou outros nutrientes do solo, oxidação do enxofre elementar, aumento de permeabilidade das raízes e produção de sideróforos. Os principais efeitos observados na promoção de crescimento das plantas são o aumento da taxa de germinação, crescimento das raízes, crescimento de colmos ou caules, aumento do número de folhas e área foliar, crescimento de tubérculos, aumento do número de flores e aumento de rendimento.

Isolados de *Bacillus* são considerados micro-organismos seguros e de notável capacidade de sintetizar uma grande variedade de substâncias benéficas. O crescimento das plantas pode ser diretamente estimulado através da produção bacteriana de auxinas, citocininas, giberelinas ou de compostos semelhantes. Além destes mecanismos, podem também melhorar a aquisição de nutrientes pela planta, especialmente por meio de fixação de nitrogênio ou através de solubilização de oligo elementos de ferro, fósforo e outros. Outros compostos tais como a acetoina volátil e butandiol emitida por algumas estirpes de *Bacillus* estão também envolvidos na estimulação do crescimento da planta.

A produção de biomassa bacteriana em cultivos semi-sólidos sobre meio agarizado, não atenderia a demanda de uma biofábrica destinada a produção de mudas de bananeira. A ampliação da escala de produção de biomassa para meio líquido, em biorreator pode permitir a obtenção de quantidades de biomassa, a custo razoável, para atender a produção superior a 500.000 mudas/ano.

Este trabalho teve como objetivo geral avaliar a ampliação de escala de produção de biomassa de *Bacillus* sp. RAB9 por processo submerso.

Assim sendo, visou atender os seguintes objetivos específicos:

- Estudar o crescimento de *Bacillus* sp. para determinação da fase exponencial;
- Avaliar a produção de biomassa de *Bacillus* sp. em fracos agitados;
- Avaliar o efeito da adição de peptona, peptona com elementos secundários e substituição parcial da fonte orgânica de nitrogênio no meio de cultura sobre a produção de biomassa *Bacillus* sp.;
- Avaliar o impacto de alterações da composição do meio NYD (extrato de levedura, extrato de carne, peptona, dextrose) sobre a produção de biomassa *Bacillus* sp.;

- Avaliar a produção de biomassa *Bacillus* sp. em agitador orbital e em biorreator por batelada simples;
- Avaliar a utilização de uma estratégia de alimentação para incremento da produção de biomassa de *Bacillus* sp. em biorreator.

II-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO (BPCP)

Uma agricultura sustentável requer a utilização de estratégias que permitam o aumento da produção de alimentos sem prejuízo ao meio ambiente e saúde, dentro do contexto econômico, social e político de cada região. Uma das alternativas potenciais para atingir este objetivo é o uso das BPCP, considerando sua fácil aplicação em tratamento de sementes, raízes e também da parte aérea. Por outro lado, estas bactérias são nativas nos solos, ou plantas, não interferindo no equilíbrio ecológico, e portanto enquadrando-se plenamente na realidade da agricultura orgânica e sustentável (MARIANO et al., 2004).

Bactérias, em habitats naturais, colonizam o interior e exterior de órgãos de plantas e podem ser benéficas, neutras ou prejudiciais ao seu crescimento. As bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) fazem parte da população residente das plantas como epifíticas ou endofíticas e não são fitopatogênicas. Podem ser utilizadas para tratamento de sementes, explantes e mudas micropropagadas, incorporadas ao substrato de plantio, tratamento de estacas, tubérculos e raízes, pulverizações na parte aérea incluindo folhagem e frutos, e em pós-colheita (MARIANO et al., 2004). Atuam promovendo diretamente o crescimento pela produção de ácido cianídrico, fitohormônios, enzimas como a ACC-deaminase, mineralização de nutrientes, solubilização de fosfatos, fixação do nitrogênio e aumento da absorção pelas raízes, entre outros (CONN et al., 1997; LAZAROVITS, 1997).

As BPCP atuam indiretamente pela supressão de doenças e diretamente pela produção de ácido cianídrico (HCN), produção ou alteração da concentração de fitohormônios, fixação de nitrogênio, solubilização de fosfatos minerais ou outros nutrientes do solo, oxidação do enxofre elementar, aumento de permeabilidade das raízes e produção de sideróforos (CATTELAN, 1999; MARIANO et al., 2000). Os principais efeitos observados na promoção de crescimento das plantas são o aumento da taxa de germinação, crescimento das raízes, crescimento de colmos ou caules, aumento do número de folhas e área foliar, crescimento de tubérculos, aumento do número de flores e aumento de rendimento (SILVEIRA, 2001).

BPCP podem ser introduzidas em cultura de tecidos em estádios iniciais de multiplicação e propagadas por sucessivas gerações como epifíticas ou endofíticas multiplicando-se por explantes nodais sem precisar reinocular, influenciando a resposta a estresses bióticos e abióticos. Esses organismos podem agir também por competição,

ocupando sítios e tornando-os indisponíveis aos patógenos. No âmbito da agricultura sustentável, certos grupos de organismos podem beneficiar mais de uma cultura num sistema de rotação no campo e misturas rizobactérias-micorrizas podem, além da ação direta, atuar indiretamente melhorando a agregação do solo (MARIANO et al., 2004).

As principais BPCP são encontradas entre as *Pseudomonas* spp. não fluorescentes e fluorescentes; espécies de *Bacillus*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Acetobacter* e *Herbaspirilu*, *Agrobacterium radiobacter*, *Enterobacter cloacae* e *Burkholderia cepacia*, entre outras.

Na China, as BPCP são conhecidas e comercializadas como bactérias que aumentam a produtividade (KLOEPPER, 1997). Nesse país, aumentos de produtividade tão significativos como 23,1 e 22,5 % têm sido obtidos pela aplicação dessas bactérias respectivamente em batata doce e batata (ZHANG et al., 1996).

Em condições de campo, o tratamento das sementes de trigo com *Bacillus* sp., *Bacillus subtilis* aumentou a produção de 18 a 31 % (PERONDI et al., 1996). Visando a promoção de crescimento de plantas de helicônia, Assis (2002) testou 50 bactérias isoladas de folhas e sementes de plantas de helicônia sadias em casa de vegetação. Após quatro meses as mudas foram avaliadas quanto ao diâmetro do pseudocaule (DPC), matéria seca da parte superior - folhas e pseudocaule (MSS), matéria seca da parte inferior - rizoma e raiz (MSI) e altura do pseudocaule (AP). Os três isolados mais eficientes HPS6, HPF14 e HNF15 foram identificados como *B. pumilus*, *B. thuringiensis* subvar. *kurstakii* e *Bacillus cereus*, respectivamente, testados quanto à compatibilidade e utilizados em misturas.

Gomes et al. (2003) avaliaram isolados bacterianos epifíticos e endofíticos, obtidos de plantas sadias de alface, para promoção de crescimento de mudas e plantas de alface, respectivamente em estufa e campo de cultivo orgânico (Chã Grande - PE). Em campo, foram utilizados os isolados mais eficientes, C25 (*Bacillus thuringiensis* subvar. *kenyae*) e C116 (*Bacillus pumilus*), separadamente e em mistura, após teste de compatibilidade. Os efeitos benéficos das BPCP sobre mudas micropropagadas são principalmente, aumento de área foliar, diâmetro de pseudocaule, número de folhas e matéria seca, com conseqüente redução do tempo de aclimatização e maior sobrevivência das mudas após o transplante. No campo, observa-se proteção contra doenças e aumento de produtividade (MARIANO et al., 2004).

Mello et al. (2002) avaliaram a eficiência de 19 isolados bacterianos na promoção decrescimento de mudas micropropagadas de abacaxi cv. Pérola utilizando diferentes métodos de bacterização. As variáveis altura da planta, número de folhas, área foliar, peso da matéria seca da parte aérea e peso da matéria seca do sistema radicular foram avaliadas trinta dias

após o transplântio. Dentre os isolados testados, os mais eficientes foram espécies de *Bacillus*. Espécies de *Bacillus* possuem também aplicabilidade no tratamento de sementes, órgãos de propagação vegetativa e mudas (MELO, 1998; MELLO et al., 2002).

Isolados de *Bacillus* são considerados microorganismos seguros e de notável capacidade de sintetizar uma grande variedade de substâncias benéficas (STEIN, 2005). O crescimento das plantas pode ser diretamente estimulado através da produção bacteriana de auxinas, citocininas, giberelinas ou de compostos semelhantes. Além destes mecanismos, de planta associado as bactérias, podem também melhorar a aquisição de nutrientes pela planta, especialmente por meio de fixação do azoto ou através de solubilização de oligo elementos de ferro, fósforo e outros. Outros compostos tais como a acetoína volátil e butandiol emitida por algumas estirpes de *Bacillus* estão também envolvidos na estimulação do crescimento da planta (RYU et al., 2003).

O potencial de bactérias promotoras de crescimento em mudas de bananeira foi analisado por Ting et al. (2008) com isolados de fungos e bactérias. Os isolados mostraram resultados promissores de promoção do crescimento nas propriedades avaliadas, como altura, diâmetro do pseudocaule, massa de raízes, número de folhas.

2.2 – OTIMIZAÇÃO DE PROCESSOS FERMENTATIVOS

Em escala industrial, muitos processos são adaptados com vista a otimizar a produção. O processo descontínuo por sua vez, também foi sendo adaptado de modo a atender ao objetivo de diferentes indústrias. As fermentações descontínuas clássicas, ou simplesmente fermentações descontínuas, vêm sendo utilizadas pelo homem desde a Antigüidade e, ainda hoje, são as mais empregadas para a obtenção de vários produtos fermentados. São também conhecidas por fermentação em batelada, seu modo de operação pode ser descrito assim: no instante inicial a solução nutriente esterilizada no fermentador é inoculada com microorganismos e incubada, de modo a permitir que o processo ocorra sob condições ótimas.

No decorrer do processo fermentativo nada é adicionado, exceto oxigênio (quando necessário ou quando o agente do processo desenvolver metabolismo aeróbio), antiespumante, e ácido e base para o controle do pH. Terminada a fermentação, o meio fermentado é retirado e submetido a tratamentos finais. Desta forma, se não ocorrer adição de soluções no controle do processo nem perda de líquido por evaporação, o volume no decorrer da fermentação permanece constante. Pode levar a baixos rendimentos e/ou produtividades quando o substrato adicionado de uma só vez no início do processo exerce efeitos de inibição,

repressão ou desvia o metabolismo celular a produtos que não interessam (CARVALHO et al., 2001a).

Os processos descontínuo alimentado, semicontínuos e contínuos normalmente aparecem como uma alternativa na otimização dos processos descontínuos. Os processos descontínuo alimentado, também chamados de fermentação descontínua alimentada ou processo por batelada alimentada, é definida como uma técnica onde um, ou mais nutrientes são adicionados ao fermentador durante o cultivo e em que os produtos aí permaneçam até o final da fermentação. Em alguns casos, os nutrientes são gradualmente alimentados, em uma vazão constante ou variável com o tempo. A adição pode ser de forma contínua ou intermitente e a variação no volume pode ou não ocorrer de acordo com a concentração do substrato adicionado e a taxa de evaporação do sistema. Estes processos são principalmente utilizados nos casos em que a concentração de substrato interfere no metabolismo celular e na produtividade do produto desejado, e quando ocorre a formação de produtos do metabolismo que são tóxicos ao micro-organismo (CARVALHO et al., 2001b).

Os processos fermentativos são comumente classificados quanto ao modo de cultivo, em processos em estado sólido ou submerso (REGULY, 2000). As principais desvantagens do processo fermentativo em estado sólido com relação ao processo fermentativo submerso são: os micro-organismos utilizados são limitados àqueles que crescem em baixos níveis de umidade; dificuldades para remoção do calor gerado pelo processo de respiração do micro-organismo; dificuldade na medida e controle dos níveis de umidade, pH, oxigênio e gás carbônico; escassez de dados de engenharia e de projetos para fermentadores; dificuldade do aumento de escala (COSTA, 1996; MITCHELL et al., 2000). O processo fermentativo submerso tem como característica principal a utilização de um meio de cultura líquido, com nutrientes solúveis (ALONSO, 2001). Apresenta relativa facilidade de cultivo em grande escala, já que garante homogeneidade do meio e facilidade no controle dos parâmetros de processo, principalmente se monitorados por sensores adequados (COUTO et al., 2006).

Para uma fermentação industrial o meio utilizado e a condição do processo desempenha um papel crítico, para efetuar a formação de concentração, na produção de um determinado produto. Portanto para um processo econômico é importante levar em conta a otimização do meio de fermentação e as condições do processo, a fim de maximizar os lucros do processo de fermentação (SCHIMIDT, 2005).

Na otimização dos processos fermentativos diferentes combinações e sequências de condições de processo e de componentes do meio são necessidades a serem investigadas

para determinar o estado de crescimento que produz mais biomassa com o melhor estado fisiológico constituído para a formação do produto (STANBURY et al., 1997).

2.3 – PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE *Bacillus*

Bacillus são organismos atraentes industriais por uma variedade de razões, como taxa de crescimento elevado, que levam a tempos de fermentação de ciclo curtos e capacidade para secretar proteínas para o meio extracelular. Estes organismos são uma fonte importante de enzimas extracelulares industriais, incluindo proteases e amilases. O gênero *Bacillus* produz várias classes de antibióticos, tal como linear e ciclo oligopeptídeos, peptídeos básicos e antibióticos. Alguns dos produtos com aplicações industriais são: endotoxinas biopesticidas, purinas, nucleotídeos, potenciadores de flavor, polihidroxibutirato etc. *Bacillus* têm defendido a sua posição como bactérias dominantes em fermentações industriais como avanços feitos na tecnologia de DNA recombinante (SCHALLMEY et al, 2004). *Bacillus subtilis* tem sido usado comercialmente para o biocontrole de enfermidades de plantas, assim como para aumentar a produtividade de culturas (NGUGIA et al., 2005; YAO et al., 2006). Como e porque esse biocontrole é exercido e ainda um tema que carece de maiores estudos. O efeito *in situ* pela exposição de células vivas de *Bacillus subtilis* pode ocasionar a promoção de crescimento e/ou o biocontrole (HAMMAMI et al., 2009).

A produção de *Bacillus* varia de acordo com o objetivo de estudo. Para produção de enzimas, por exemplo, o cultivo de *Bacillus* em ágar inclinado ou em placas para a produção do inóculo, é transferido posteriormente para o meio de cultura em frascos incubados sob agitação. Carvalho et al. (2008) em estudo com *Bacillus* sp. SMIA-2 para produção de amilases inoculou 1 mL da cultura preparada de véspera (pré-inóculo) incubada em um agitador rotatório operando a 180 rpm em temperatura de 50 °C. Em todos os experimentos foram utilizados 25 mL de meio de cultura (em g.L⁻¹: amido solúvel 5,0; proteínas do soro de leite 0,5; peptona 2,0; MgSO₄ 0,5; K₂HPO₄ 0,87; KCl 0,3; CaCl₂ 0,29 e traços de metais (ZnO 2,5 x 10⁻³; FeCl₃.6H₂O 2,7 x 10⁻²; MnCl₂.4H₂O 1,0 x 10⁻²; CuCl₂.2H₂O 8,5 x 10⁻⁴; CoCl₂.6H₂O 2,4 x 10⁻³; NiCl₃.6H₂O 2,5 x 10⁻⁴; H₃BO₃ 3,0 x 10⁻⁴ e Na₂MoO₄ 1,0 x 10⁻³, pH 7,5) em erlenmeyer de 250 mL. Nascimento et al. (2007) em estudo com a mesma linhagem para a produção de protease partiu de método semelhante com cultivo do meio (em g.L⁻¹: citrato trissódico 10; NH₄NO₃ 10,0; peptona 1; KCl 0,3; MgSO₄ 0,5; K₂HPO₄ 2,0; CaCl₂ 2,2 x 10⁻³; ZnO 2,0 x 10⁻³; FeCl₃.6H₂O 2,7 x 10⁻²; MnCl₂.4H₂O 1,0 x 10⁻²; CuCl₂.2H₂O 8,5 x 10⁻⁵; CoCl₂.6H₂O 2,4 x 10⁻³; NiCl₃.6H₂O 2,5 x 10⁻⁴ e H₃BO₃ 3,0 x 10⁻⁴, pH 7,5) a 150 rpm em

temperatura de 50 °C por 60 horas. Heck et al. (2002) verificaram a produção de celulase e xilanase por *Bacillus subtilis* por cultivo semi-sólido, utilizando resíduos da indústria da soja como substrato. A maior atividade específica para a celulase foi obtida em 24h de cultivo. As cinco cepas de *Bacillus* utilizados neste estudo foram selecionadas de acordo com suas atividades celulolíticas e xilanolíticas. As estirpes foram mantidas em meio de ágar contendo 0,1% de goma de tragacanto e 0,1% de carboximetilcelulose. O meio com a seguinte composição(g.L⁻¹: MgSO₄ 0,2; KHPO₄ 1,0; K₂HPO₄ 1,0; NH₄NO₃ 1,0; CaCl₂ 0,02; FeCl₂ 0,05) foi utilizado para preparação do inóculo preparado em frascos de 200 ml contendo 1,2 g de IFSR e 40 mL de meio de base mineral líquido. Os frascos foram inoculados com uma única colônia de uma cultura em placa de ágar e incubou-se durante 18-20 h a 37 ° C, sob agitação 125 rpm. A fermentação foi realizada em biorreator após a inoculação com todo o conteúdo do frasco, o cultivo passou a 37 ° C por 72 horas. Durante o cultivo, o ar estéril foi umidificada a uma taxa constante de 150 mL/min.

Santos et al. (2006) estudou quatro isolados de *Bacillus* para controle biológico da mancha-aquosa em melão: *Bacillus subtilis* R14, *Bacillus megaterium* pv. *cerealis* RAB7, *Bacillus pumilus* C116 e *Bacillus* sp. MEN2, mantidos em meio ágar nutritivo e fermentados em meio contendo em g.L⁻¹: glicose, 40; K₂HPO₄ 10,5; (NH₄)₂SO₄ 11,5; MgSO₄·7H₂O 0,5; NaH₂PO₄·2H₂O 1,7; MnSO₄·H₂O 0,04 e extrato de levedura 0,5, pH 8,0. *Bacillus* spp. foram cultivados em caldo nutritivo durante 24 horas a 30°C, suspensões de cada isolado foram preparadas (McFarland 1,5 x 10⁹ cel/mL) e 25 mL colocados em frascos, contendo 500 mL do meio de fermentação. Os frascos foram acondicionados em mesa incubadora rotativa a 30 °C e 150 rpm, durante 72 horas. Lazzaretti et al. (2005) em estudo com *Bacillus subtilis* como promotor de crescimento em feijoeiro realizou o cultivo da bactéria por sete dias em fracos, sob agitação constante a 180 rpm e a 28°C, nos seguintes meios de cultura: GPL (em g.L⁻¹: glucose 10,0; peptona 10,0; extrato de levedura 5,0; NaCl 3,0; KH₂PO₄ 1,0; MgSO₄·7H₂O 0,5, pH-6,0); caldo nutriente (CN) e batata-dextrose (BD).

2.4 – MEIOS DE CULTIVO DE *Bacillus*

A definição adequada do micro-organismo a ser empregado, assim como do meio de cultura para este micro-organismo, é etapa fundamental para o sucesso de um processo fermentativo.

Algumas características gerais do meio de cultura, que devem ser consideradas, são:

- Ser o mais barato possível;
- Atender às necessidades nutricionais do micro-organismo;
- Auxiliar no controle do processo, como é o caso de ser ligeiramente tamponado, o que evita variações drásticas de pH, ou evitar uma excessiva formação de espuma;
- Não provocar problemas na recuperação do produto;
- Os componentes devem permitir algum tempo de armazenagem, a fim de estarem disponíveis todo tempo;
- Ter composição razoavelmente fixa;
- Não causar dificuldades no tratamento final de efluentes.

Todas essas são características importante, destacando-se o custo do meio de cultura, que deve ser o menor possível, desde que atenda às necessidades do micro-organismo selecionado (SCHMIDELL et al., 2001).

Os micro-organismos utilizam como fonte de carbono e, frequentemente de energia, diversos açúcares, tais como: glicose, sacarose, frutose, ou ainda polissacarídeos, como amido e a celulose. Como fonte de nitrogênio são frequentemente utilizados sais, como o sulfato de amônio, fosfato de amônio, ou aminoácidos, ou uréia. Como fontes de fósforo utilizam-se os fosfatos solúveis, como o monoamônio fosfato, ou diamônio fosfato, os quais passam a ser fontes de nitrogênio e fósforo simultaneamente. Ainda necessita-se adicionar outros elementos, como: Na, K, Ca, Fe, Cu, Mg, Mn, Co etc., em concentrações frequentemente muito reduzidas, na forma de seus sais solúveis. Meios de cultura constituídos apenas por essas substâncias costumam ser chamados de meios definidos, ou meios sintéticos, cuja composição química é sempre muito bem conhecida. Para suprir as necessidades de linhagens mais exigentes e, em geral, pode-se adicionar certos materiais complexos como: extrato de levedura, extrato de carne, extrato de malte, peptona etc (SCHMIDELL et al., 2001).

A escolha do meio de cultivo adequado é extremamente importante para o sucesso de um produto. Esta escolha deve proporcionar a máxima produção com o mínimo custo (COUCH, 2000).

Bacillus são organismos com atrativo industrial por possuírem diversas características vantajosas, tais como: sua alta taxa de crescimento, levando a um curto tempo para a fermentação; sua capacidade de secretar proteínas para um meio extracelular e o estado GRAS (Generally Recognized As Safe) (CORREA, 2009).

Os meios de cultivo para espécies de *Bacillus*, como para a espécie *Bacillus thuringiensis*, segundo Angelo et al., 2010, geralmente possuem uma fonte de nitrogênio, outra de carbono e sais minerais. Algumas vezes se adicionam ao meio alguns tampões e antiespumantes a fim de facilitar o processo. A fonte de carbono, além de fornecer matéria prima para muitos compostos celulares, serve como fonte de energia. O nitrogênio é requerido principalmente para síntese de proteínas e ácidos nucléicos. Os sais minerais atuam como co-fatores, sendo também importantes no controle da osmolaridade celular.

Há uma vasta composição de meios de culturas para cultivos de espécies de *Bacillus*, algumas podem ser observadas na tabela seguinte:

Tabela 1: Meios de cultura utilizados para espécies de *Bacillus*.

Micro-organismo	Meio de Cultura (g. L ⁻¹)	Fonte
<i>Bacillus</i> sp.	Citrato trissódico: 10,0; NH ₄ NO ₃ : 10,0; peptona: 1,0; KCl: 0,30; MgSO ₄ : 0,5; K ₂ HPO ₄ : 2,0; CaCl: 22,2.10 ⁻³ ; ZnO: 2,0.10 ⁻³ ; FeCl ₃ .6H ₂ O: 0,20; MnCl ₂ .4H ₂ O: 0,01; CuCl ₂ .2H ₂ O: 8,5. 10 ⁻⁵ ; CoCl ₂ .6H ₂ O: 2,4.10 ⁻³ ; NiCl ₃ .6H ₂ O: 2,5. 10 ⁻⁴ ; H ₃ BO ₃ : 3,0. 10 ⁻⁴	Nascimento et al., 2007
	Glicose: 10,0; (NH ₄) ₂ SO ₄ : 2,0; K ₂ HPO ₄ : 4,8; NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O: 1,1; (NH ₄) ₂ HC ₆ H ₅ O ₇ : 0,5; MgSO ₄ : 2 mM, CaCl ₂ : 0,50; FeCl ₃ : 16,7; ZnSO ₄ .7H ₂ O: 0,18; CuSO ₄ .5H ₂ O: 0,16; MnSO ₄ .H ₂ O: 0,15; CoCl ₂ .6H ₂ O: 0,18, EDTA de sódio: 20,1; C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₄ S: 0,10	Tran et al., 2010
	Amido: 20,0; extrato de levedura: 20,0; Na ₂ CO ₃ : 10,0; K ₂ HPO ₄ : 1,0; KH ₂ PO ₄ : 1,0; MgSO ₄ .7H ₂ O: 0,20; CaCl ₂ : 0,20; MnCl ₂ : 0,20	Kuo et al., 2009
<i>Bacillus subtilis</i>	Caldo GPL (glicose:10,0; peptona: 10,0; extrato de levedura: 5,0; NaCl: 3,0; KH ₂ PO ₄ : 1,0; MgSO ₄ .7H ₂ O: 0,5); caldo nutriente e caldo batata-dextrose	Lazzaretti et al., 2005
	Glicose: 100,0; peptona de peixe: 30,0; extrato de levedura: 10,0 e sais de amônio (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ : 9,4; (NH ₄) ₂ SO ₄ : 14,4; (NH ₄) ₂ CO ₃ : 8,9; NH ₄ NO ₃ : 9,1; CH ₃ COONH ₄ : 0,17; (NH ₄) ₂ C ₂ O ₄ .H ₂ O: 0,14)	Zhu et al., 2010a
	Glicose: 100,0; extrato de levedura: 25,0; (NH ₄) ₂ HPO ₄ : 30,0	Zhu et al., 2010b
	Glicose: 9,0; glutamina: 2,1; (NH ₄) ₂ SO ₄ : 1,89; kanamicina: 0,20; Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ : 2,0; K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O: 14,0; KH ₂ PO ₄ : 6,0; Tripitofano: 2,4; MgSO ₄ : 0,60; CaCl ₂ .2H ₂ O: 0,018; ZnCl ₂ : 0,90; MnSO ₄ : 0,80; CuCl ₂ .2H ₂ O: 0,24; CoCl ₂ .6H ₂ O: 0,36; Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O: 0,24; FeCl ₃ .6H ₂ O: 3,6	Lyubenova et al., 2011
	Glicose: 0 – 100,0; peptona: 50,0; NH ₄ Cl: 3,0; K ₂ HPO ₄ : 1,0; MgSO ₄ .7H ₂ O: 2,0; MnSO ₄ .H ₂ O: 0,02; FeSO ₄ .7H ₂ O: 0,05; CoCl ₂ .6H ₂ O: 0,01; CaCl ₂ .2H ₂ O: 5,0; ZnCl ₂ : 0,01	Kwon et al., 2011
<i>Bacillus licheniformis</i>	Glicose: 5,0; extrato de malte: 40,0; extrato de levedura: 20,0; (NH ₄) ₂ HPO ₄ : 16,0; KH ₂ PO ₄ : 1,5; MgSO ₄ .7H ₂ O: 0,50; CaCl ₂ .2H ₂ O: 0,45; MnSO ₂ .4H ₂ O: 0,04; ZnSO ₄ .7H ₂ O: 0,02; FeSO ₄ .7H ₂ O: 0,02; Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O: 0,01; CuSO ₄ .5H ₂ O: 0,01	Hancocks et al., 2010
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Glicose: 30,0; extrato de levedura: 12,0; (NH ₄) ₂ SO ₄ : 3,0; CaCl ₂ .2H ₂ O: 0,12; MgSO ₄ .7H ₂ O: 1,5; MnSO ₄ .H ₂ O: 0,09; K ₂ HPO ₄ : 1,5; KH ₂ PO ₄ : 1,5	Boniolo et al., 2012

A composição de meios de cultura deve levar em conta a composição elementar do micro-organismo a ser cultivado e a sua capacidade de converter as substâncias químicas do meio de cultura em massa celular ou outros produtos desejados. O uso de um determinado nutriente em quantidade menor que a desejada vai provocar limitação de ação microbiana. Por outro lado, o uso desse nutriente em quantidade maior que um determinado valor, vai provocar inibição dessa ação (PRADELLA et al., 2001).

III - MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos desta pesquisa foram desenvolvidos nos Laboratórios de Bioprocessos e Agroindústria, pertencentes a Embrapa Agroindústria Tropical (CNPAT).

3.1 - MICRO-ORGANISMO

A linhagem *Bacillus* sp (RAB9) pertencente ao grupo de bactérias epifíticas, foi isolada de folhas de rabanete. A cepa avaliada foi proveniente da Coleção de Culturas do Laboratório de Fitobacteriologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco - Recife-PE.

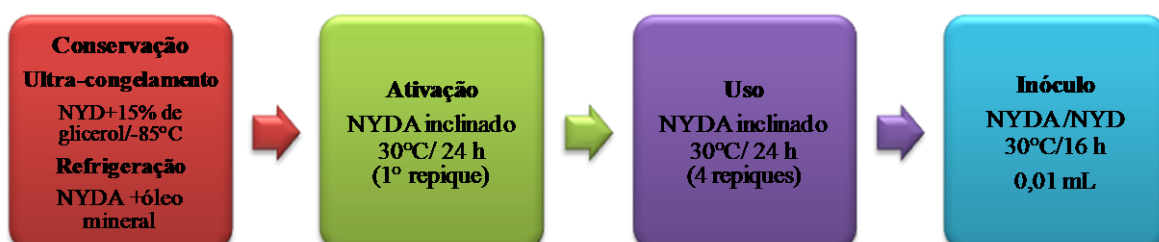
3.1.1 - Manutenção e Ativação

A linhagem *Bacillus* sp foi conservada em caldo NYD com glicerol 15%. em criotubos, acondicionados em ultra freezer (-85°C), para preservação e estocagem do material biológico (KIRSOP et al., 1991). A bactéria foi também preservada em ágar NYDA inclinado submerso com óleo mineral (1 cm acima da parte superior do ágar) a 30°C por 24 horas, posteriormente, conservado sob refrigeração (MENEZES et al., 2004). Desta cultura estoque foram feitos repiques para ativação da linhagem em ágar NYDA a 30°C por 24 horas para utilização nos testes subseqüentes (dois repiques sucessivos são necessários para remover o máximo de óleo residual das culturas).

3.1.2 - Preparo do inóculo

A partir do ágar NYDA inclinado, incubado em BOD a 30°C por 24 horas, o inóculo, foi transferido assepticamente, com auxílio de uma alça, para um erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL do meio NYD, em seguida incubado a 30°C, 150 rpm por 16 horas em agitador orbital. Inoculou-se nos meios de fermentação um volume 0,01 g.L⁻¹ de inóculo, calculados de acordo com sua curva padrão. A Figura 1 apresenta o fluxograma de sequência de etapas da manutenção ao preparo do inóculo.

Figura 1: Fluxograma das etapas de manutenção ao inóculo.



3.2 - MEIOS DE CULTURA

3.2.1 - Meio de Manutenção

Para a manutenção e ativação foi utilizado o meio NYDA, com a seguinte composição (em g.L⁻¹): dextrose 10,0; extrato de levedura 5,0; extrato de carne 3,0; peptona 5,0 e ágar 18,0 (MARIANO et al., 2005). O pH final ajustado para 6,5. Foram adicionados 10 mL do meio a tubos rosqueáveis (15 cm de comprimento por 1,5 cm de diâmetro) e autoclavados a 121°C por 15 min.

3.2.2 - Meio NYD

Para os experimentos de fermentação foi utilizado o meio NYD com a seguinte composição (em g.L⁻¹): dextrose 10,0; extrato de levedura 5,0; de extrato de carne 3,0; peptona de carne 5,0. Preparados em erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL do meio NYD autoclavados a 121°C por 15 min.

3.3 - CURVA-PADRÃO DE BIOMASSA

Foi transferido assepticamente com o auxílio de uma alça o inóculo do NYDA inclinado, incubado em BOD a 30°C por 24 horas para um erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL do meio NYD, incubado a 30°C, 150 rpm por 24 horas em agitador orbital.

Todo conteúdo do erlenmeyer foi centrifugado para separação do sobrenadante e pellet. Após a separação juntou-se as suspensões em tubo falcon e adicionado 20 mL de água destilada, agitados em agitador de tubos PROENIX AP56.

Foram adicionados 1 mL da suspensão a balões volumétricos de 10 a 2000 mL, aferidos com água destilada. Homogeneizados os balões, foram realizadas leituras da biomassa em espectrofotômetro a 600 nm. Foram transferidos 5 mL da suspensão para cadinho de porcelana seco em estufa por 24 h a 90°C, previamente tarado, e colocados em estufa por 24 h a 90 °C, seguidamente pesados. Em duplicata.

Na curva padrão foi relacionada com as absorbâncias e as concentrações da biomassa obtidas em cada balão. As curvas são atualizadas semestralmente.

3.4 - PRODUÇÃO DA BIOMASSA EM FRASCOS AGITADOS

3.4.1 - Determinação da curva de crescimento em meio NYD

O ponto de partida para a produção de biomassa em meio líquido foi a determinação da curva de crescimento da cepa de *Bacillus*.

Frascos contendo meio NYD foram inoculados conforme o item 3.1.2, com a linhagem *Bacillus* sp. (RAB9), e incubados em agitador orbital TECNAL modelo TE-420 (órbita de 25 mm) a 30°C, 150 rpm.

Em cada tempo de amostragem (4, 8, 24, 32, 48 e 72h), retirou-se 1 erlenmeyer, onde todo seu conteúdo foi centrifugado. Nesta etapa, quantificou-se a biomassa formada, utilizando as curvas-padrão previamente estabelecidas conforme o item 3.3.

3.4.2 - Efeito da adição de Peptona

Para avaliar o efeito da adição de peptona na produção de biomassa, foi realizado experimentos com as seguintes concentrações de peptona: 5,0; 10,0; 25,0 e 50,0 g.L⁻¹. Realizado em agitador orbital por 24h a 30°C agitados a 150 rpm. Determinou-se a quantidade de biomassa e açúcar residual.

3.4.3 - Efeito da adição de Sulfato de Magnésio e Fosfato de Potássio

Os testes foram realizados com 0, 0,5 e 1,0 g.L⁻¹ de sulfato de magnésio (MgSO₄) e fosfato de potássio (K₂HPO₄) adicionados ao meio NYD com 5,0 e 50,0 g.L⁻¹ de peptona observando a melhor quantidade para se obter maior crescimento de biomassa. Os experimentos foram realizados em agitador orbital, por 24h a 30°C e 150 rpm. Para a observação do efeito desses elementos secundários foi executado um planejamento experimental fatorial 2² com três repetições no ponto central (Tabela 1). Consistiu na realização de ensaios e registrar as respostas analíticas observadas em cada quantidade dos elementos secundários e peptona. As respostas analíticas obtidas, através dos resultados experimentais, foram inseridas no programa Statistica 7.0, o que permitiu avaliar as interações entre as variáveis estudadas e a sua influência sobre a resposta analítica de interesse. As variáveis dependentes foram biomassa, açúcar residual e nitrogênio residual.

Tabela 1: Delineamento do planejamento fatorial 2^2 com as variáveis codificadas e reais.

Elementos	-1	0	+1
MgSO_4 (g.L ⁻¹)	0	0,5	1,0
K_2HPO_4 (g.L ⁻¹)	0	0,5	1,0

Posteriormente ao planejamento experimental foram feitos experimentos variando a quantidade de sulfato de magnésio no meio NYD. Os testes foram realizados com 0, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 e 3,0 g.L⁻¹ em agitador orbital por 24h, 30°C a 150 rpm. Foram determinadas a produção de biomassa, açúcar residual, nitrogênio residual.

3.4.4- Efeito da substituição parcial da Peptona por Sulfato de Amônio

Os testes foram realizados com peptona e sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) adicionados ao meio NYD. Os experimentos foram realizados em agitador orbital, por 24h a 30°C, 150 rpm, em duplicata. Aplicou-se o planejamento experimental fatorial 3^2 (Tabela 2). Foram determinados no planejamento as seguintes variáveis dependentes: biomassa, açúcar residual, nitrogênio residual e amoniacal.

Tabela 2: Delineamento do planejamento fatorial 3^2 com as variáveis codificadas e reais.

Elementos	-1	0	+1
Peptona (g.L ⁻¹)	1,0	3,0	5,0
(NH ₄) ₂ SO ₄ (g.L ⁻¹)	1,0	3,0	5,0

3.4.5- Avaliação do antiespumante a ser empregado

O teste foi realizado com óleos vegetais (soja, milho, girassol, canola) e mineral, em agitador orbital 30°C a 150 rpm por 24h. Foi avaliada a turvação comparando-se com o controle (sem óleo), determinada a biomassa e a questão da interferência na separação da massa bacteriana e o sobrenadante (meio). O interesse do uso de óleos como antiespumante é o barateamento do processo.

3.5- PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM BIORREATOR

Os testes foram feitos em biorreator de bancada New Brunswick modelo BioFlo 115 de 2,5 L com volume máximo de trabalho de 2 L. Com a finalidade de melhorar a

agitação do meio reacional foram utilizados impelidores “Rushton” de 6 pás planas. O espaçamento entre as turbinas foi calculado de acordo com o volume de trabalho. O impelidor inferior foi posicionado a 17 cm da tampa ao eixo e o superior a 10,2 cm da tampa ao eixo da unidade de agitação. Foram utilizados quatro defletores equidistantes posicionados a 90° em relação à parede da dorna. A dorna é alimentada por ar seco comprimido, filtrado na sua entrada e saída do meio por filtros (0,20µm de PTFE) para redução de partículas. A água para manutenção das condições de fermentação estabelecidas foi alimentada por Chiller Thermo SCIENTIFIC modelo Thermo Flex 1400 a 15°C.

O sensor de pH foi calibrado com soluções padrões antes da esterilização da dorna. O meio de cultura para a fermentação em biorreator foi preparado diretamente na dorna e esterilizado em autoclave Phoenix modelo AV-150 a 121°C durante 30 min.

Antes da fermentação, com no mínimo de seis horas, o sensor de D.O foi polarizado para energização do eletrodo antes de sua calibração. Os parâmetros de temperatura, agitação e taxa de aeração foram ajustados 30 minutos antes da calibração do sensor de D.O para estabilização do sistema. Com o sistema estável, o fermentador foi inoculado assepticamente com 50 mL da cultura, que corresponde a aproximadamente 0,01 g/L de inóculo inicial, via septo com o auxílio de uma seringa de 60 mL com agulha hipodérmica 1,20 x 40 mm.

3.5.1-Influência da vazão de ar na produção de biomassa de *Bacillus* sp. (RAB 9)

➤ Teste preliminar

Inicialmente foram estabelecidas três condições de vazões de ar diferentes 2, 4 e 6 L/min a temperatura de 30°C, a 150 rpm. A fermentação foi conduzida por 24 horas em meio NYD sem adição de antiespumante, alíquotas (20 mL) foram retiradas a cada 2 horas para análise de biomassa.

➤ Produção de biomassa com meio NYD modificado

Por Batelada simples

Após os testes iniciais em biorreator e observação dos efeitos das diferentes concentrações dos elementos (peptona, MgSO₄, (NH₄)₂SO₄) e de acordo com os resultados obtidos, nos experimentos em frascos agitados, chegou-se a uma nova formulação do meio

NYD e com 0,3 % do antiespumante, para melhores condições de crescimento da cepa em estudo. O experimento foi realizado a 150 rpm a 30°C por 30 horas. Foram testadas vazões de ar 2, 4, 6 e 8 L/min. Coletadas alíquotas (20 mL) a cada 2 horas. Foram determinados a biomassa, açúcar residual, nitrogênio residual e amoniacal.

Por Batelada alimentada

O experimento foi realizado a 150 rpm, 30°C por 30h. Foram preparados 1,5 L do meio NYD modificado a vazão de ar 6 L/min, com 0,3 % do antiespumante. A alimentação foi iniciada decorridos 12 h de fermentação. Testados dois meios de alimentação com um volume de 500 mL. Meio 1: com 10x a quantidade de glicose e 5x a concentração dos demais (extrato de levedura, extrato de carne, peptona, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 ; meio 2: 20x a concentração de glicose e 10x a concentração dos demais (extrato de levedura, extrato de carne, peptona, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 . Coletadas alíquotas (20 mL) a cada 4 horas. Foram determinados a biomassa, açúcar residual, nitrogênio residual e amoniacal.

3.6- DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

3.6.1 - Determinação de biomassa

As amostras de meio foram centrifugadas a 3500 rpm (*Biofuge Stratus* com rotor 15000) por 15 min. O sobrenadante foi separado e aguardado em tubos sob congelamento para análises posteriores (açúcar residual, nitrogênio residual e amoniacal). O pellet foi lavado com 30 mL de água destilada para retirar qualquer interferência de cor do meio de fermentação e centrifugado novamente. O pellet foi ressuspendido novamente e transferido para um balão volumétrico para diluição da biomassa e quantificação através da leitura da absorbância no espectrofotômetro Varian Cary 50 a 600 nm. A quantificação da biomassa acontece pela utilização do fator de concentração determinado pelas curvas-padrão.

3.6.2 - Determinação açúcar residual

O teor de açúcar residual (AR) foi determinado segundo Miller (1959). Em tubo de ensaio adicionou-se 1 mL de solução de 3,5 dinitrossalicílico (DNS), sobre 1mL de amostra de meio (sobrenadante), devidamente diluída com água destilada. Após vigorosa homogeneização, os tubos foram aquecidos em banho-maria a 100°C por 5 minutos. Em seguida os tubos foram retirados e rapidamente resfriados com água corrente. Adicionou-se 8mL de água destilada à mistura reacional e procedeu-se nova homogeneização.

A intensidade da cor do reagente e amostra foi quantificada em espectrofotômetro Varian Cary 50 a 540 nm. Para o cálculo de concentração foi utilizado fator obtido a partir de curva-padrão de glicose.

3.6.3 - Determinação do pH

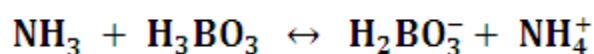
O pH foi determinado em pHmetro de bancada HANNA INSTRUMENTS HI 2221/HI 2223 para testes em agitador orbital. Para os testes em reator o pH foi medido através de sensor de pH Metter – Toledo 405-DPAS-SC-KBS 1225.

3.6.4 - Determinação nitrogênio residual

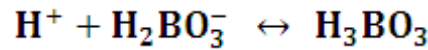
O nitrogênio residual foi determinado segundo metodologia de Silva (2009). Compreendendo duas etapas: 1) digestão da amostra para converter N orgânico a íon amônio (N-NH_4^+) e 2) determinação do N-NH_4^+ , obtido em meio ácido, após destilação da amônia com arraste de vapor.

Em tubos digestor de Kjeldahl foram adicionados 1 mL da amostra do sobrenadante e 7 mL da mistura digestora (água destilada, Na_2SeO_3 , Na_2SO_4 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), a mistura foi submetida a digestão em bloco digestor a temperatura de 350°C , aumentada gradualmente de meia em meia hora, até a digestão da amostra. Após a digestão o digerido à temperatura ambiente foi destilado, foram adicionados cuidadosamente 20 mL de água e 3 a 5 gotas de fenolftaleína 1%, o tubo foi conectado ao destilador Kjeldahl e adicionado, cuidadosamente, 10 mL de NaOH 60%. O destilado foi recolhido em um frasco erlenmeyer de 125 mL contendo 20 mL de H_3BO_3 .

O N orgânico é convertido em NH_4^+ por digestão com H_2SO_4 em mistura com substâncias que agem como catalisadores (Cu e Se) ou que promovem a conversão e ajudam a manter alta a temperatura durante a digestão (K_2SO_4). O NH_4^+ é finalmente determinado após destilação por arraste de vapor, adicionando-se solução concentrada de NaOH ao extrato de vapor. O extrato sulfúrico é alcalinizado com solução de NaOH. A amônia produzida é arrastada por vapor de água e recolhida em uma solução de ácido bórico contendo uma mistura indicadora (RAIJ et al., 2001):



O borato de amônio é retrotitulado com solução padronizada de H_2SO_4 (0,01 N). A quantidade de ácido usada na titulação é proporcional ao N-NH_4^+ presente na amostra:



O cálculo para determinar a quantidade de N total é dado por:

$$\text{N}(\text{mg. kg}^{-1}) = \frac{(\text{V}_{\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ amostra}} - \text{V}_{\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ branco}}) \times \text{F}_{\text{ácido}} \times 14 \times 1000}{\text{V}_{\text{destilado}}} \quad (1)$$

$\text{V}_{\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ amostra}}$ = volume do ácido sulfúrico em mL gasto na titulação da amostra

$\text{V}_{\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ branco}}$ = volume do ácido sulfúrico em mL gasto na titulação das provas em branco

$\text{F}_{\text{ácido}}$ = é o fator do ácido sulfúrico, em mg.N mL⁻¹

14 = equivalente do ácido que neutraliza o nitrogênio

1000 = é o fator para converter g para kg

$\text{V}_{\text{destilado}}$ = é o volume em mL da alíquota da amostra destilada

3.6.5 - Determinação nitrogênio amoniacal

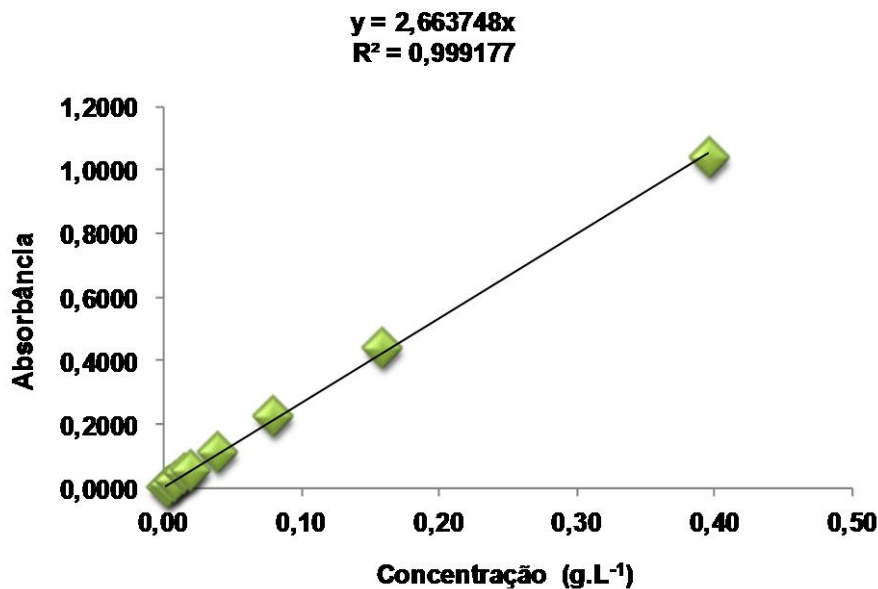
O método para determinação do nitrogênio amoniacal também foi utilizado a metodologia de Silva (2009). A determinação de nitrogênio amoniacal não envolve a etapa de digestão. Foi adicionado 1 mL do sobrenadante ao tubo de digestão, 50 mL de água destilada e uma medida de MgO. O destilado foi recolhido em um frasco erlenmeyer de 125 mL contendo 20 mL de H₃BO₃. Envolve a destilação por arraste de vapores da solução contendo forma de nitrogênio mineral, MgO. Em meio alcalino forte, criado pela adição de MgO, o NH₄⁺ é convertido em amônia (NH₃), que é arrastada por vapores, condensada e depositada em solução de ácido bórico. A quantificação do N na forma de amônio se dá indiretamente por titulação (H₂SO₄), via restitulação do ácido bórico utilizado na formação do borato de amônio (SILVA, 2009). O cálculo é dado de acordo com a equação (1).

IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - DETERMINAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO

O perfil de crescimento da cepa de *Bacillus* sp. (RAB9) em meio líquido (NYD) foi ponto de partida para o estudo da produção de biomassa. A curva padrão determinada para a linhagem correlaciona a absorbância e a concentração de massa seca, foi parâmetro utilizado para determinação da biomassa das amostragens em cada tempo analisado (Figura 2).

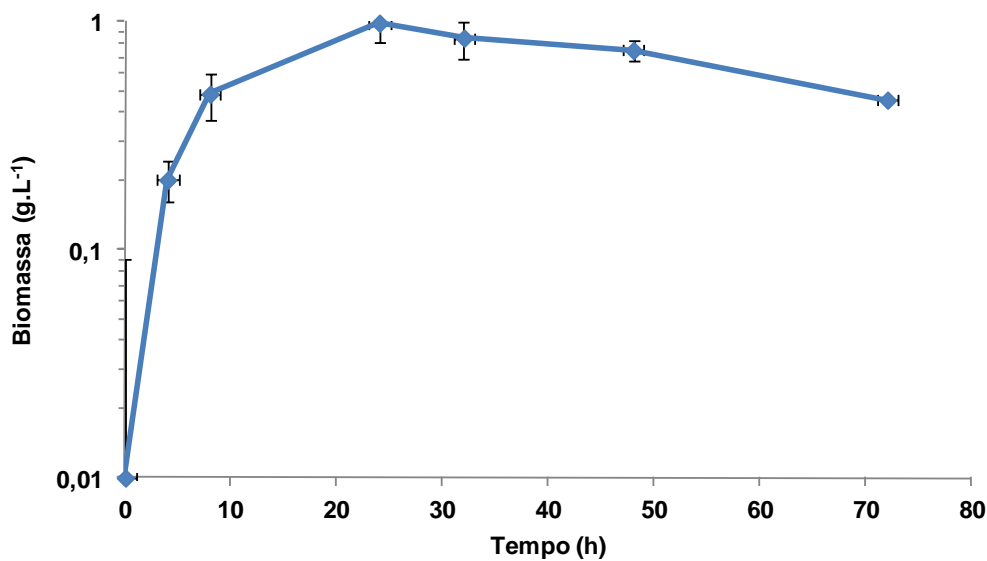
Figura 2: Exemplo de curva padrão da cepa *Bacillus* sp. (RAB9), obtida em julho de 2012.



Os períodos analisados da fermentação com a linhagem de *Bacillus*, em agitador orbital, mostram que a fase exponencial se prolonga em torno das 24 horas, apresentando nesse tempo um pico máximo de crescimento. A produção de biomassa nesse ponto foi de 0,99 g.L⁻¹. Os períodos subsequentes ao ponto máximo expressam a fase estacionária. Devido aos tempos de amostragem utilizados, não foi possível observar a fase de adaptação (Figura 3).

Pelo comportamento da espécie de *Bacillus* sp. (RAB9) em meio NYD observada pelo estudo da curvatura, estabeleceu-se a partir de então o período de fermentação com o tempo máximo de 24 horas.

Figura 3: Curva de crescimento da cepa de *Bacillus* sp. RAB9.



O tempo de duplicação de um micro-organismo aumenta com o aumento do tamanho e a complexidade da célula, para bactérias, com intervalos de valores em horas, é entre 0,25 e uma hora (MORAES, 2001). Na fase exponencial a velocidade específica de crescimento é constante e máxima (HISS, 2001).

O crescimento de micro-organismos pode ser avaliado pelo aumento da massa celular ou pelo aumento do número de células, é o resultado de uma série de eventos altamente coordenados e enzimaticamente catalizados. A expressão máxima do crescimento microbiano é dependente do transporte dos necessários nutrientes, fontes de carbono, nitrogênio, vitaminas e sais minerais que se transferem à célula (MORAES, 2001). Células em crescimento exponencial geralmente se encontram nas condições mais “saudáveis”. A taxa de crescimento exponencial é influenciada pelas condições ambientais (temperatura, composição do meio de cultura) e pelas características genéticas do próprio organismo (MADIGAN, 2008). A determinação da fase logarítmica de crescimento é fundamental para a obtenção de um inóculo de boa qualidade (SELLA, 2008).

É empregado para algumas espécies de micro-organismos o cultivo em NYDA (SANTOS et al., 2006; ALVARADO, 2006; SILVA et al., 2012). A aplicação de micro-organismos em plantas a partir da preparação da suspensão em NYDA é uma prática estudada. O inóculo é preparado a partir de cultura em placas de Petri com NYDA e ajustado para a concentração de acordo com curva de crescimento previamente estabelecida. As

plantas são inoculadas, colocando-se sobre o substrato, na base de cada planta, a quantidade certa da suspensão bacteriana (SILVEIRA et al., 1999).

Para um amplo cultivo de mudas em cultura de tecidos, em escala comercial, a prática de preparação da suspensão bacteriana a partir de placas com meio NYDA, requer uma grande demanda de mão de obra e espaço para incubar grandes quantidades de placas de Petri necessária para a preparação do inóculo. Essa demanda pode ser otimizada pelo cultivo bacteriano em meio líquido (NYD) em agitador orbital ampliado para uma escala em biorreator. O meio NYD tem sido empregado para crescimento de alguns micro-organismos (NASCIMENTO, 2005; NASCIMENTO et al., 2005; CAVALCANTE et al., 2005; GARCIA et al., 2009; FELIX, 2009).

Pelo ponto de partida nas condições estabelecidas e verificadas, foi determinado o estudo do crescimento da linhagem no meio NYD em escala de bancada com frascos agitados e posteriormente em biorreatores. Visando traçar o melhor perfil para maior produção de biomassa.

4.2 - EFEITO DA ADIÇÃO DE PEPTONA

Dentre as concentrações de peptona testadas a maior produção de biomassa foi obtida com a maior concentração de peptona $50,0 \text{ g.L}^{-1}$. Porém o aumento da concentração de peptona em 2, 5 e 10 vezes, não foi refletida proporcionalmente nas quantidades de biomassa. Quando no meio a concentração de peptona foi de $5,0 \text{ g.L}^{-1}$ a produção de biomassa foi $0,74 \text{ g.L}^{-1}$, aumentando a concentração de peptona para $10,0 \text{ g.L}^{-1}$, ou seja, o dobro, a produção de biomassa foi $0,79 \text{ g.L}^{-1}$, um acréscimo de $0,05 \text{ g.L}^{-1}$ estatisticamente sem diferença. Quando o aumento foi de cinco vezes, $25,0 \text{ g.L}^{-1}$ de peptona a produção de biomassa apresentada foi $1,19 \text{ g.L}^{-1}$. Com $50,0 \text{ g.L}^{-1}$ a maior produção foi obtida $1,32 \text{ g.L}^{-1}$, contudo não foi alcançado o dobro da menor concentração determinada, mesmo com a concentração dez vezes maior de peptona no meio (Tabela 3).

Nas menores concentrações de peptona $5,0$ e $10,0 \text{ g.L}^{-1}$ o açúcar residual foi $7,02$ e $6,29 \text{ g.L}^{-1}$ respectivamente, o consumo de açúcar foi pequeno $29,8$ e $37,1\%$. O açúcar residual apresentou menor quantidade nas concentrações de $25,0$ e $50,0 \text{ g.L}^{-1}$ o que representou um consumo de $61,2$ e $64,3\%$ da fonte de carbono. Estatisticamente todos os valores obtidos foram distintos. Foi aplicado o teste de Tukey de colunas sobre os valores determinados (Tabela 3).

Tabela 3: Efeito da adição de peptona na produção de biomassa e açúcar residual para a cepa RAB9.

Peptona (g.L ⁻¹)	Biomassa (g.L ⁻¹)	AR (g.L ⁻¹)
5,0	0,74 ± 0,04 ^a	7,02 ± 0,01 ^d
10,0	0,79 ± 0,04 ^a	6,29 ± 0,01 ^c
25,0	1,19 ± 0,00 ^b	3,88 ± 0,00 ^b
50,0	1,32 ± 0,05 ^c	3,57 ± 0,08 ^a

Uma célula bacteriana típica é composta por cerca de 12% de nitrogênio (de seu peso seco), um importante elemento constituinte de proteínas, ácidos nucleicos e vários outros compostos celulares. O nitrogênio é encontrado na natureza tanto sob formas orgânicas quanto inorgânicas (MADIGAN et al., 2008).

Organismos utilizam nitrogênio principalmente para sintetizar os grupos amino que estão presentes no aminoácido das proteínas. Muitas bactérias obtêm esse composto por meio da decomposição de matéria orgânica protéica e, posteriormente, reincorporando os aminoácidos em proteínas que acabaram de ser sintetizadas ou outros compostos que contenham nitrogênio (TORTORA et al., 2003).

A proteína é uma molécula grande relativamente insolúvel que a minoria dos micro-organismos pode utilizar diretamente. No entanto, por meio de uma digestão parcial dela, utilizando produtos ácidos ou enzimas, ocorre a produção de pequenas cadeias de aminoácidos denominadas *peptonas*. Esses fragmentos pequenos e solúveis podem ser metabolizados pelas bactérias (TORTORA et al., 2003).

A fonte de nitrogênio, peptona, é geralmente o componente mais caro dos substratos de crescimento de bactérias (PARRADO et al., 1993). Contudo, estudos com algumas fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio (ANNUAR et al., 2008; AIYER, 2004) constataam a peptona como ótima fonte de nitrogênio para algumas espécies de bactérias.

Há uma grande variação nas concentrações de peptona utilizada para cultivo de espécies de *Bacillus*. Uma faixa de concentração em torno de 25,0; 30,0; e 50,0 g.L⁻¹ (ZHU et al., 2010a; ZHU et al., 2010b; KWON et al., 2011). O meio NYD base desse estudo apresenta uma concentração de 5,0 g.L⁻¹. Pelos resultados verificou-se que a variação da quantidade de peptona no meio proporcionou um aumento na biomassa. Contudo o aumento da quantidade de peptona do meio impacta no aumento do valor desse reagente no processo. A tabela abaixo apresenta valores comerciais dos componentes do meio NYD:

Tabela 4: Valores comerciais dos componentes do meio NYD.

Componente	Custo de Aquisição		Quantidade (g.L ⁻¹)	Valor no meio (R\$.L ⁻¹)
	Apresentação (g)	Valor (R\$)		
Glicose P.A.	1000	524,00	10,0	5,24
Extrato de carne	500	584,00	3,0	3,50
Extrato de levedura	250	377,00	5,0	7,54
			5,0	4,71
Peptona	1000	942,00	10,0	9,42
			25,0	23,50
			50,0	47,10

Fonte: SIGMA ALDRICH, 2013.

A peptona contribui com um percentual de 22,44% sobre custo do meio NYD. O valor comercial da peptona com a quantidade de 5,0 g.L⁻¹ equivale a um valor relativamente pequeno quando comparado a pequenos experimentos em agitador orbital, porém em proporções maiores como em biorreatores em que se utilizam volumes maiores de meio esse valor reflete no orçamento do processo, encarecendo a operação (Tabela 4).

Tabela 5: Valores da produção de biomassa para as concentrações de peptona no meio de fermentação.

	Concentração de peptona (g.L ⁻¹)			
	5,0	10,0	25,0	50,0
Custo do meio (R\$.L⁻¹)	20,99	25,70	39,78	63,38
Biomassa produzida (g.L⁻¹)	0,74	0,79	1,19	1,32
Custo da biomassa (R\$.g⁻¹)	28,36	32,53	33,43	48,02

O aumento da concentração de peptona apesar de contribuir para um aumento relativamente significativo sobre a produção de biomassa proporcionou um aumento de até três vezes o custo do meio, e maior custo de biomassa (Tabela 5).

Contudo com o balanço dos custos das concentrações de peptona testadas sobre o meio e a produção de biomassa, o aumento da adição da fonte de nitrogênio orgânico, peptona, em meio NYD, apresentou um aumento considerável sobre a produção de biomassa embora não seja economicamente viável. O que justifica continuar com a mesma quantidade do reagente no meio 5,0 g.L⁻¹.

4.3 - EFEITO DA ADIÇÃO DE SULFATO DE MAGNÉSIO E FOSFATO DE POTÁSSIO

Para a observação do efeito desses elementos secundários na produção de biomassa foi executado um planejamento experimental. As respostas analíticas obtidas, através dos resultados experimentais, foram inseridas no programa Statistica 7.0, o que

permitiu avaliar as interações entre as variáveis estudadas e a sua influência sobre a resposta analítica de interesse.

A adição de fosfato de potássio no meio com $5,0 \text{ g.L}^{-1}$ de peptona diminuiu a quantidade de biomassa ($0,59 \text{ g.L}^{-1}$), quando comparada com o meio sem a presença dos elementos ($0,66 \text{ g.L}^{-1}$). Ao contrário, a adição de sulfato de magnésio no meio, proporcionou um aumento de 100% na quantidade de biomassa ($1,34 \text{ g.L}^{-1}$). A combinação dos elementos favoreceu o aumento de biomassa, embora em menor resposta, quando em presença apenas de sulfato de magnésio suplementado ao meio NYD. O valor do açúcar residual no meio sem a presença de suplementos foi $6,69 \text{ g.L}^{-1}$ equivalente a 33,1% de açúcar consumido. Em presença de fosfato de potássio $4,18 \text{ g.L}^{-1}$ representa um consumo de 58,2% da fonte de carbono. Com sulfato de magnésio $2,46 \text{ g.L}^{-1}$ um consumo de 75,4 % da fonte de carbono. O percentual de consumo de açúcar foi maior com a suplementação com os elementos secundários, principalmente em presença de sulfato de magnésio. A adição dos elementos secundários em geral não interferiu na quantidade de nitrogênio residual (Tabela 6).

Tabela 6: Efeito da adição de elementos secundários sobre as variáveis dependentes: produção de biomassa, açúcar residual (AR) e nitrogênio residual com $5,0 \text{ g.L}^{-1}$ de peptona.

Elementos secundários				Peptona $5,0 \text{ g.L}^{-1}$		
Valores codificados		Valores reais (g.L^{-1})		(g.L^{-1})		
K_2HPO_4	MgSO_4	K_2HPO_4	MgSO_4	Biomassa	AR	N residual
-1	-1	0	0	0,66	6,69	1,50
1	-1	1	0	0,59	4,18	1,41
-1	1	0	1	1,34	2,46	1,43
1	1	1	1	1,19	2,80	1,54
0	0	0,5	0,5	1,06	3,42	1,56
0	0	0,5	0,5	1,08	3,35	1,41
0	0	0,5	0,5	1,08	4,53	1,52

Foram verificadas pela aplicação da análise de variância (ANOVA) e pela estimativa do erro experimental (erro puro), as respostas analíticas obtidas, através dos resultados experimentais com intervalo de confiança de 90%. Os paretos com efeitos das variáveis independentes sobre as variáveis respostas foram obtidos com valores de T de Student.

Pelos resultados da Anova os efeitos para sulfato de magnésio, fosfato de potássio e interação são estatisticamente significativos para produção de biomassa. A falta de ajuste também apresentou significância, demonstrando inadequação do modelo, embora o

coeficiente de determinação ajustado alcançado seja 0,87384, que significa aproximadamente 87% das variações nos resultados obtidos podem ser explicados pelo modelo empírico. Possivelmente seu modelo segue tendência quadrática (Tabela 7).

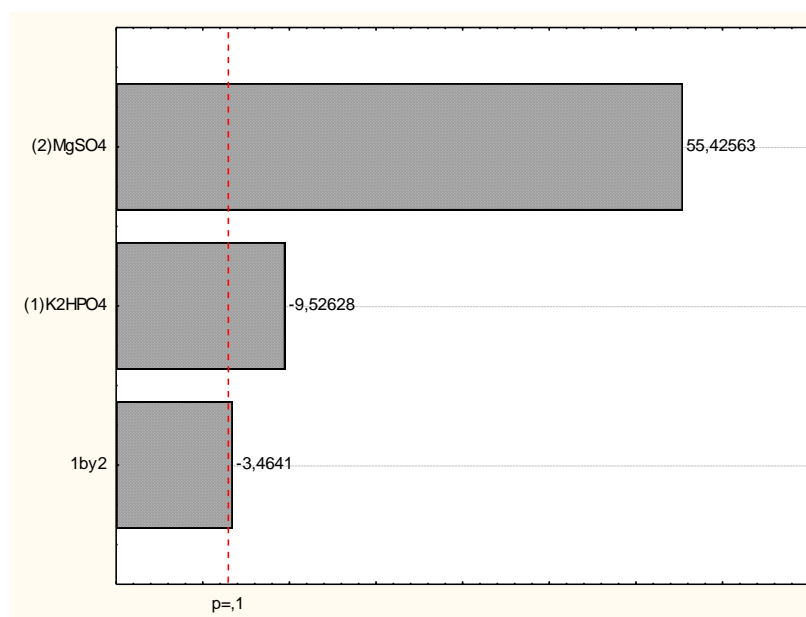
Tabela 7: Anova dos efeitos das variáveis independentes sobre a produção de biomassa.

Fator	Soma Quadrática	Grau de Liberdade	Média Quadrática	F calculado	p valor
(1)K ₂ HPO ₄	0,012100	1	0,012100	90,750	0,010840
(2)MgSO ₄	0,409600	1	0,409600	3072,000	0,000325
Interação	0,001600	1	0,001600	12,000	0,074180
Falta de ajuste	0,028233	1	0,028233	211,750	0,004689
Erro puro	0,000267	2	0,000133		
Total	0,451800	6			

R_{ajustado} = 0,87384

Um maior impacto sobre a variável resposta produção de biomassa foi verificada em suplementação do meio NYD em 5,0 g.L⁻¹ de peptona com sulfato de magnésio. O que sugere que quanto maior sua presença no meio, maior produção de biomassa. Embora fosfato de potássio corresponda significativamente sobre a variável, sua presença implicou em menor resposta relacionada à produção de biomassa. A interação das variáveis independentes apresentou efeito significativo sobre a variável resposta, contudo à medida que essa interação aumenta, diminui a produção de biomassa. (Figura 4).

Figura 4: Pareto com efeitos das variáveis sobre a produção de biomassa em 5,0 g.L⁻¹ de peptona.



Pelos resultados na análise de variância dos fatores, observa-se que apenas sulfato de magnésio foi significativo sobre a variável resposta açúcar residual (Tabela 8).

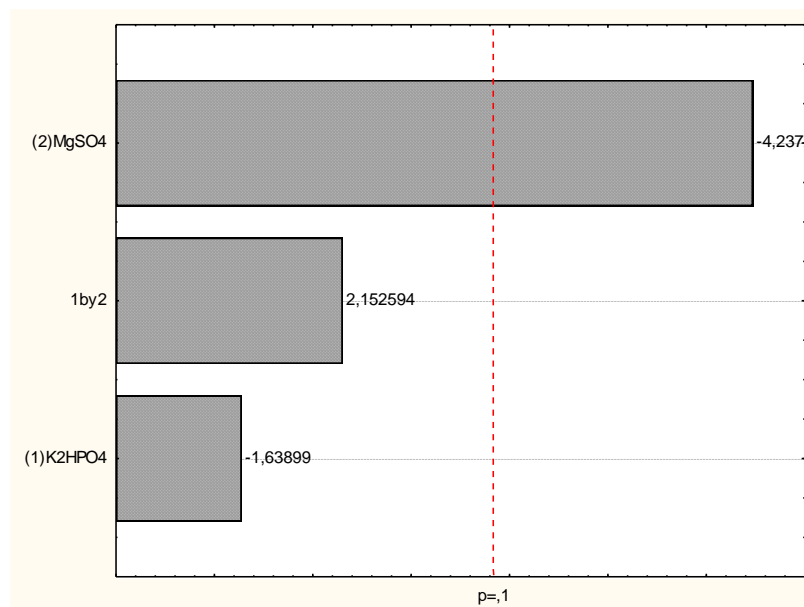
Tabela 8: Anova dos efeitos das variáveis independentes sobre o açúcar residual.

Fator	Soma Quadrática	Grau de Liberdade	Média Quadrática	F calculado	p valor
(1)K ₂ HPO ₄	1,17723	1	1,177225	2,68630	0,242885
(2)MgSO ₄	7,86803	1	7,868025	17,95396	0,051438
Interação	2,03062	1	2,030625	4,63366	0,164232
Falta de ajuste	0,12114	1	0,121144	0,27644	0,651526
Erro puro	0,87647	2	0,438233		
Total	12,07349	6			

R_{ajustado} = 0,83474

A suplementação com fosfato de potássio em meio NYD não foi significativo para açúcar residual, assim com a interação entre os dois elementos secundários. Apenas a adição de sulfato de magnésio apresentou significância ao parâmetro açúcar residual. Quanto maior a concentração de sulfato de magnésio em meio NYD com 5,0 g.L⁻¹ de peptona menor será o açúcar residual. O que expressa uma resposta positiva visto que a linhagem consome nestas condições maior parte da fonte de carbono disponível (Figura 5).

Figura 5: Pareto com efeitos das variáveis sobre açúcar residual em 5,0 g.L⁻¹ de peptona.



Para o nitrogênio residual nas condições testadas nenhuma variável dependente foi significativa, apresentando um R ajustado igual a zero, que confirma que os parâmetros analisados não correlacionam com a variável resposta (Tabela 9).

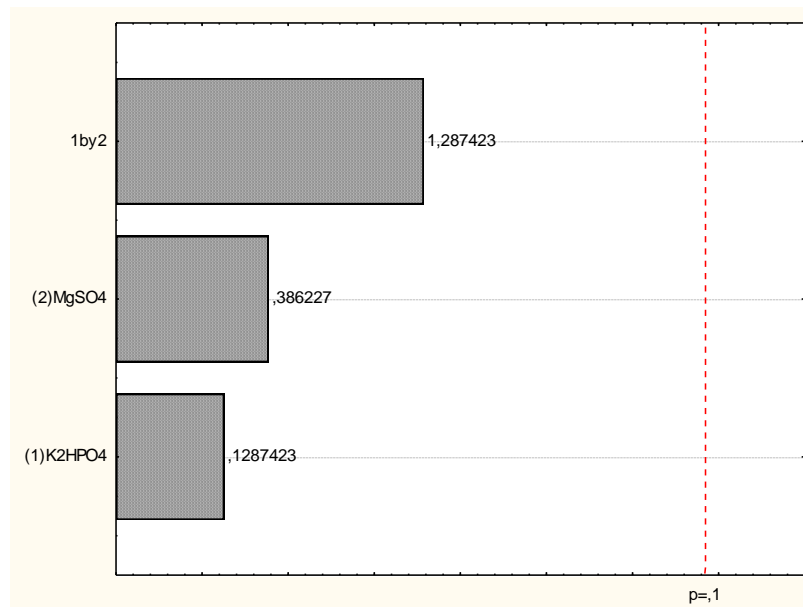
Tabela 9: Anova dos efeitos das variáveis independentes sobre nitrogênio residual.

Fator	Soma Quadrática	Grau de Liberdade	Média Quadrática	F calculado	p valor
(1)K ₂ HPO ₄	0,000100	1	0,000100	0,016575	0,909340
(2)MgSO ₄	0,000900	1	0,000900	0,149171	0,736545
Interação	0,010000	1	0,010000	1,657459	0,326819
Falta de ajuste	0,001219	1	0,001219	0,202052	0,697087
Erro puro	0,012067	2	0,006033		
Total	0,024286	6			

R ajustado = 0

A adição dos elementos no meio NYD com 5,0 g.L⁻¹ de peptona não interferiu no consumo de nitrogênio, nem mesmo quando correlacionados. Sulfato de magnésio e fosfato de potássio nessas condições, não foi constatado nenhum efeito significativo sobre a variável resposta nitrogênio residual (Figura 6).

Figura 6: Pareto com efeitos das variáveis sobre nitrogênio residual em 5,0 g.L⁻¹ de peptona.



A adição de fosfato de potássio no meio com 50,0 g.L⁻¹ de peptona proporcionou um aumento sobre a quantidade de biomassa da linhagem (0,96 g.L⁻¹), em relação ao controle (0,92 g.L⁻¹). A adição de sulfato de magnésio no meio proporcionou um maior aumento sobre

a variável resposta ($1,48 \text{ g.L}^{-1}$). A combinação dos elementos fosfato de potássio e sulfato de magnésio favoreceu ainda mais a produção de biomassa ($1,66 \text{ g.L}^{-1}$), embora em menor expressividade, quando combinadas em menor concentração, ponto central. A quantidade de açúcar residual em geral foi menor em presença de sulfato de magnésio, principalmente quando combinado com fosfato de potássio, apresentando um consumo de açúcar de 69,8 %. A adição dos elementos secundários não foi significativa sobre a quantidade de nitrogênio residual (Tabela 10).

Tabela 10: Efeito da adição de elementos secundários sobre as variáveis dependentes: produção de biomassa, açúcar residual (AR) e nitrogênio residual com $50,0 \text{ g.L}^{-1}$ de peptona.

Elementos secundários				Peptona $50,0 \text{ g.L}^{-1}$		
Valores codificados		Valores reais (g.L^{-1})		(g.L^{-1})		
K_2HPO_4	MgSO_4	K_2HPO_4	MgSO_4	Biomassa	AR	N residual
-1	-1	0	0	0,92	4,88	6,73
1	-1	1	0	0,96	4,10	6,44
-1	1	0	1	1,48	3,11	6,49
1	1	1	1	1,66	3,02	6,55
0	0	0,5	0,5	1,22	3,23	5,72
0	0	0,5	0,5	1,22	3,30	6,93
0	0	0,5	0,5	1,27	3,29	6,67

A adição tanto de fosfato de potássio como de sulfato de magnésio foram significativos na variável resposta produção de biomassa em meio NYD com $50,0 \text{ g.L}^{-1}$. No entanto, o termo interação fosfato de potássio com sulfato de magnésio não apresentou significância sobre o parâmetro, assim como a falta de ajuste. O R ajustado foi em torno de 99%, o que reforça que o modelo para essas condições foi adequado (Tabela 11).

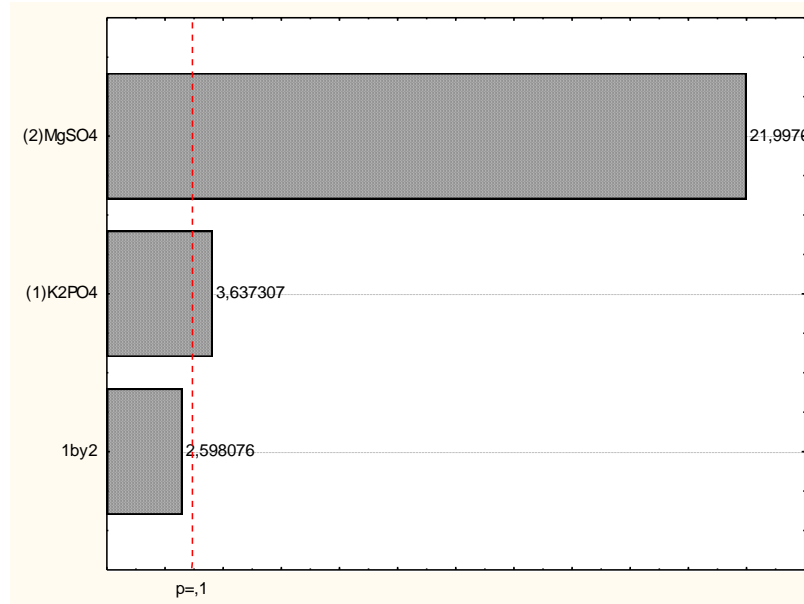
Tabela 11: Anova dos efeitos das variáveis independentes sobre produção de biomassa.

Fator	Soma	Grau de	Média	F	p
	Quadrática	Liberdade	Quadrática	calculado	valor
(1) K_2HPO_4	0,011025	1	0,011025	13,2300	0,067970
(2) MgSO_4	0,403225	1	0,403225	483,8700	0,002060
Interação	0,005625	1	0,005625	6,7500	0,121690
Falta de ajuste	0,000430	1	0,000430	0,5157	0,547234
Erro puro	0,001667	2	0,000833		
Total	0,421971	6			

R ajustado = 0,99503

Para a produção de biomassa a presença de fosfato de potássio e sulfato de magnésio no meio NYD com $50,0 \text{ g.L}^{-1}$ foram significativas. Contudo a interação entre os dois elementos não foi favorável a variável resposta. A suplementação com fosfato de potássio apresentou com menor impacto sobre a produção de biomassa, ao contrário em presença de sulfato de magnésio que contribuiu para maior resposta de crescimento da linhagem (Figura 7).

Figura 7: Pareto com efeitos das variáveis sobre produção de biomassa em $50,0 \text{ g.L}^{-1}$ de peptona



A suplementação do meio NYD com sulfato de magnésio foi significativa tanto nos experimentos que empregavam $5,0 \text{ g.L}^{-1}$ de peptona como nos experimentos com $50,0 \text{ g.L}^{-1}$ de peptona. No entanto observou-se que a variável independente sulfato de magnésio foi cerca de 2,5 vezes mais expressiva na resposta produção de biomassa quando empregaram-se $5,0 \text{ g.L}^{-1}$ de peptona no meio. A adição de fosfato de potássio em meio com $5,0 \text{ g.L}^{-1}$ de peptona, não teve efeito significativo na resposta produção de biomassa. No entanto quando adicionado em meio com $50,0 \text{ g.L}^{-1}$ de peptona apresentou efeito significativo. A combinação dos elementos secundários em ambas as concentrações de peptona não foi favorável para produção de biomassa.

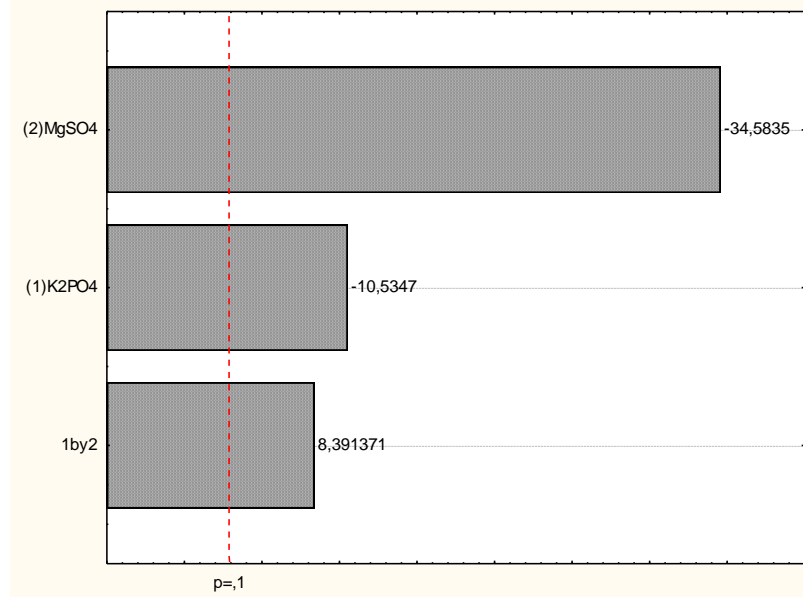
Os efeitos das variáveis dependentes sobre o açúcar residual em $50,0 \text{ g.L}^{-1}$ de peptona foram significativos, como também a falta de ajuste o que sugere que o modelo seja quadrático e não linear. O valor do R ajustado foi aproximadamente 68% (Tabela 12).

Tabela 12: Anova dos efeitos das variáveis independentes sobre açúcar residual.

Fator	Soma Quadrática	Grau de Liberdade	Média Quadrática	F calculado	p valor
(1)K ₂ HPO ₄	188530	1	188530	110,980	0,008891
(2)MgSO ₄	2031765	1	2031765	1196,021	0,000835
Interação	119619	1	119619	70,415	0,013906
Falta de ajuste	433666	1	433666	255,283	0,003894
Erro puro	3398	2	1699		
Total	2776978	6			

R_{ajustado} = 0,68522

Pela figura 8 pode-se observar um maior efeito sobre a variável resposta foi observado em suplementação do meio NYD com sulfato de magnésio. O que implica que quanto maior for sua concentração no meio de cultura, menor será o açúcar residual. A interação das variáveis independentes expressam o mesmo impacto sobre a variável resposta, com efeito opositor, a combinação dos elementos no meio aumenta o açúcar residual, ou seja, menor será seu consumo.

Figura 8: Pareto com efeitos das variáveis sobre açúcar residual em 50,0 g.L⁻¹ de peptona

A adição de sulfato de magnésio para o consumo de açúcar foi significativo para as concentrações de 5,0 e 50,0 g.L⁻¹ de peptona. O aumento na concentração de sulfato de magnésio no meio diminui o teor de açúcar residual. O efeito da adição de fosfato de potássio não foi significativo em meio com 5,0 g.L⁻¹ peptona, mas no meio com 50,0 g.L⁻¹ de peptona apresentou significância. Embora tenha contribuído para um menor teor de açúcar residual sua

presença proporcionou menor impacto sobre essa variável resposta em relação à presença de sulfato de magnésio. A associação dos elementos sobre o teor de açúcar residual foi somente significativo quando em concentração de $50,0 \text{ g.L}^{-1}$ de peptona.

Para o nitrogênio residual nas condições testadas a presença de ambos os elementos, bem como sua interação não foi significativa. O valor de R ajustado foi igual a zero, confirmando que os parâmetros analisados não expressam correlação com a variável resposta (Tabela 13).

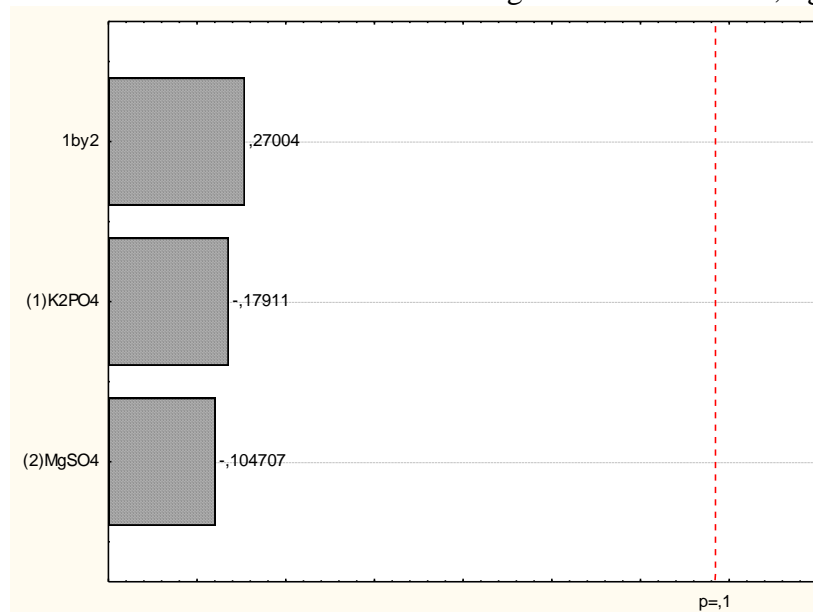
Tabela 13: Anova dos efeitos das variáveis independentes sobre nitrogênio residual.

Fator	Soma Quadrática	Grau de Liberdade	Média Quadrática	F calculado	p valor
(1) K_2HPO_4	13146,9	1	13146,9	0,032080	0,874354
(2) MgSO_4	4493,0	1	4493,0	0,010964	0,926163
Interação	29884,0	1	29884,0	0,072922	0,812442
Falta de ajuste	22884,8	1	22884,8	0,055843	0,835188
Erro puro	819620,7	2	409810,4		
Total	890029,5	6			

$R_{\text{ajustado}} = 0$

A adição dos elementos no meio NYD com $50,0 \text{ g.L}^{-1}$ de peptona não interferiu no consumo de nitrogênio, nem mesmo quando correlacionados. Sulfato de magnésio e fosfato de potássio nessas condições, não proporcionou nenhum efeito sobre a variável resposta nitrogênio residual (Figura 9).

Figura 9: Pareto com efeitos das variáveis sobre nitrogênio residual em $50,0 \text{ g.L}^{-1}$ de peptona.



A adição dos elementos secundários sobre o nitrogênio residual não foi significativo em nenhuma das concentrações de peptona analisadas.

O fósforo, magnésio, enxofre e potássio são macronutrientes importantes para os micro-organismos. O fósforo encontrado na forma fosfato orgânico ou inorgânico é necessário para a síntese de ácidos nucleicos. A maior parte do enxofre celular é proveniente de fontes inorgânicas, tais como o sulfato, tem importante papel estrutural e também em muitas vitaminas. Uma variedade de enzimas, incluindo algumas envolvidas na síntese de proteínas, requerem especificamente o potássio. O magnésio tem importante papel na estabilização de ribossomos, membranas celulares e ácidos nucleicos (MADIGAN et al., 2008).

Esses macronutrientes aparecem de forma combinada. Em alguns trabalhos observou-se a adição desses elementos na forma de sulfato de magnésio ($MgSO_4$) e fosfato de potássio (K_2HPO_4) em diferentes espécies de *Bacillus* e faixas de valores. Para sulfato de magnésio faixas que variam de 0,2 a 1,5 $g.L^{-1}$ e fosfato de potássio faixas de 1,0 a 2,0 $g.L^{-1}$ (HANCOCKS et al., 2010, KWON et al., 2011, BONIOLO et al., 2012, KUO et al., 2009). Não há um padrão de concentração desses elementos.

O planejamento experimental possibilitou definir quais parâmetros, dentre as concentrações de peptona selecionadas, afetariam, de forma mais significativa, a adição dos elementos sulfato de magnésio e fosfato de potássio no meio NYD com 5,0 e 50,0 $g.L^{-1}$ de peptona. Conforme observado experimentalmente, existe interação entre os parâmetros selecionados sobre a variável biomassa, com maior eficiência em presença de sulfato de magnésio. Desta forma, a suplementação do meio NYD com sulfato de potássio foi descartada, apenas selecionada a adição de sulfato de magnésio.

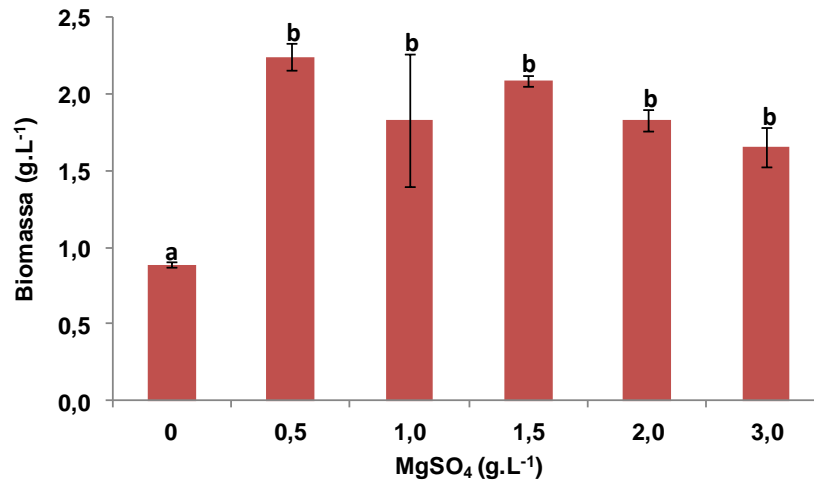
4.3.1-Avaliação da concentração de Sulfato de Magnésio

Constatado no planejamento experimental na faixa estudada o efeito significativo da adição de sulfato de magnésio no meio NYD. O uso isolado de sulfato de magnésio permitiu maior formação de biomassa. Para checar a melhor concentração desse elemento no meio em teste, experimentos foram realizados com diferentes concentrações (0, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, e 3,0) de sulfato de magnésio. Foi aplicado o teste de Tukey sobre os resultados obtidos.

Na figura 10 observou-se que o aumento da concentração de sulfato de magnésio no meio desencadeou incremento na produção de biomassa em relação ao controle. No entanto, à medida que se aumenta a concentração a produção de biomassa decresce. A maior

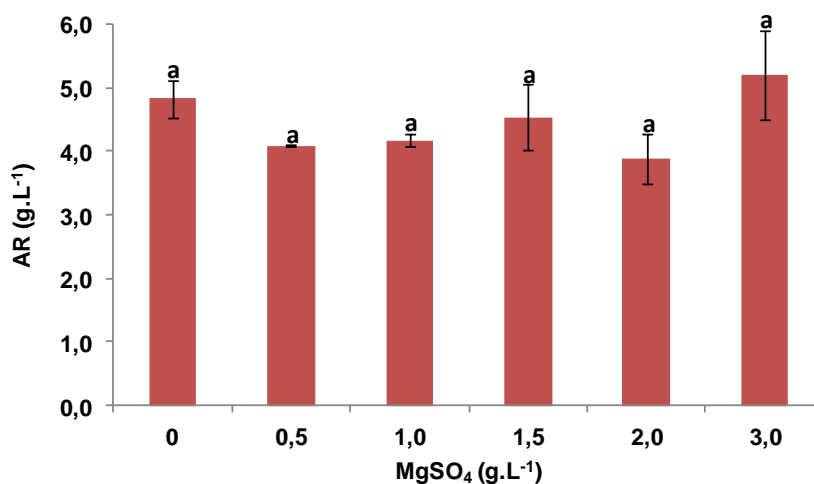
produção de biomassa foi constatada em $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de sulfato de magnésio, embora estatisticamente não haja diferença entre as concentrações de sulfato de magnésio testadas. Em comparação com o controle, observou-se um aumento na produção de biomassa em mais de 100 % em relação à concentração $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de sulfato de magnésio.

Figura 10: Produção de biomassa nas diferentes concentrações de sulfato de magnésio.



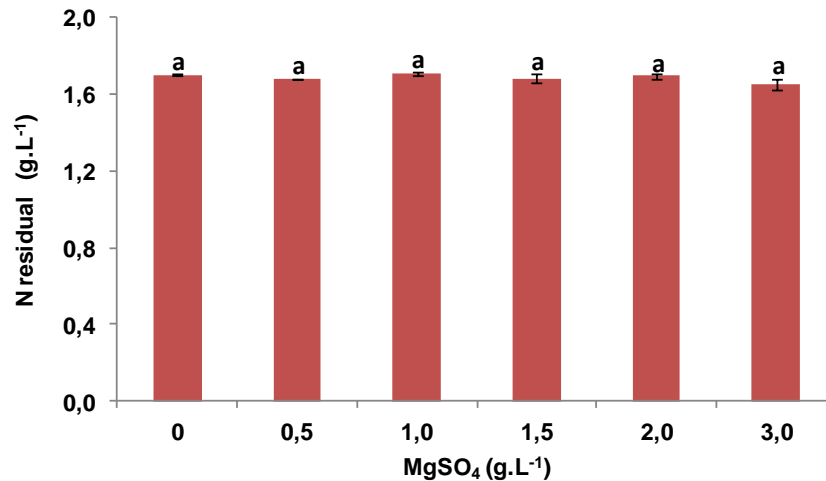
A quantidade de açúcar residual diminuiu com o aumento da concentração de sulfato de magnésio, exceto para o experimento com $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ em que a presença de açúcar residual é levemente maior que o controle. Em geral a variação das concentrações de sulfato de magnésio no meio não interferiu consideravelmente no consumo do açúcar, visto que a quantidade de açúcar residual foi estatisticamente semelhante entre as concentrações avaliadas (Figura 11).

Figura 11: Açúcar residual nas diferentes concentrações de sulfato de magnésio.



As quantidades de nitrogênio residual encontradas para todas as concentrações de sulfato de magnésio avaliadas foram semelhantes ao controle. A presença de sulfato de magnésio em qualquer concentração, nessas condições, não interferiu no consumo de nitrogênio (Figura 12).

Figura 12: Nitrogênio residual nas diferentes concentrações de sulfato de magnésio.



Pelos resultados obtidos com as diferentes concentrações testadas, a concentração selecionada de sulfato de magnésio para composição do meio NYD modificado foi 0,5 g.L⁻¹.

4.4- EFEITO DA SUBSTITUIÇÃO PARCIAL DA PEPTONA POR SULFATO DE AMÔNIO

A substituição parcial da peptona por sulfato de amônio nas diferentes combinações avaliadas em geral não demonstraram grande impacto sobre a produção de biomassa. Tendo a melhor resposta sobre esta variável a combinação de 1,0 g.L⁻¹ de peptona e 3,0 g.L⁻¹ de sulfato de amônio, uma produção de 1,24 g.L⁻¹. O aumento dos elementos peptona e sulfato de amônio nas variações testadas promoveram o aumento do teor residual de açúcar. O maior valor deste parâmetro foi 8,39 g.L⁻¹ quando combinados 5,0 g.L⁻¹ de peptona e 5,0 g.L⁻¹ de sulfato de amônio e o menor valor residual 3,91 g.L⁻¹ em 5,0 g.L⁻¹ de peptona e 1,0 g.L⁻¹ de sulfato de amônio. Os valores de nitrogênio residual e amoniacal apresentaram faixas de valores crescentes com as diferentes combinações dos elementos (Tabela 14).

Tabela 14: Efeito da adição de peptona e sulfato de amônio em meio NYD para biomassa, açúcar residual, nitrogênio residual e amoniacal.

Variáveis independentes				Variáveis dependentes			
Matriz		(g.L ⁻¹)		(g.L ⁻¹)			
Peptona	(NH ₄) ₂ SO ₄	Peptona	(NH ₄) ₂ SO ₄	Biomassa	AR	N residual	N amoniacal
-1	-1	1	1	1,07	4,28	3,77	1,47
-1	-1	1	1	1,07	4,44	3,95	1,29
0	-1	3	1	1,05	4,21	5,07	1,72
0	-1	3	1	0,95	4,51	5,21	1,62
1	-1	5	1	1,01	3,91	7,97	1,78
1	-1	5	1	0,93	4,30	8,34	1,47
-1	0	1	3	1,24	5,05	6,34	4,11
-1	0	1	3	1,24	5,04	7,06	4,6
0	0	3	3	1,03	5,23	9,43	4,34
0	0	3	3	1,10	4,76	9,13	4,5
1	0	5	3	0,99	7,60	9,54	3,97
1	0	5	3	0,99	7,32	10,35	3,95
-1	1	1	5	0,93	6,98	9,20	7,7
-1	1	1	5	1,01	5,17	9,43	6,62
0	1	3	5	0,85	7,87	11,84	6,58
0	1	3	5	0,95	7,29	11,63	7,11
1	1	5	5	0,82	8,22	12,75	6,39
1	1	5	5	0,80	8,39	13,03	6,44

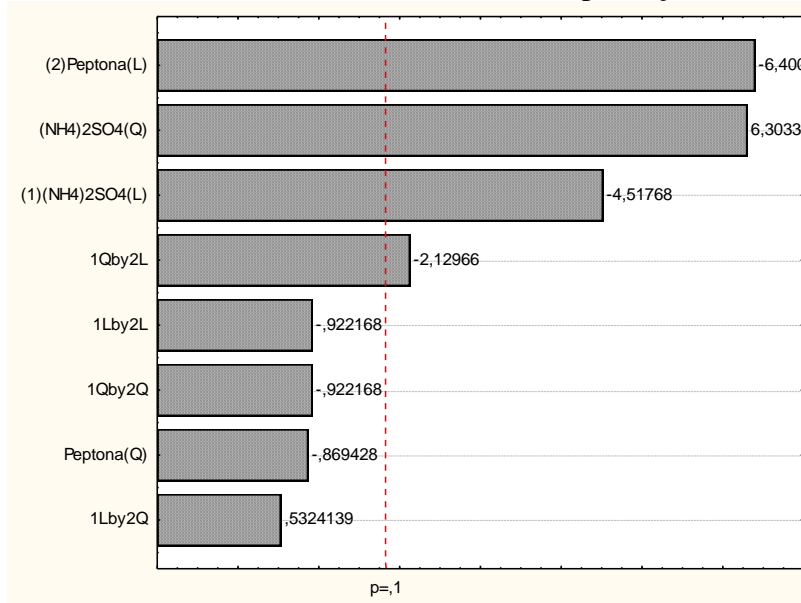
Pelo planejamento experimental aplicado, através da análise de variância, apresentado na tabela 15 os parâmetros linear e quadrático de sulfato de amônio foram significativos sobre a produção de biomassa. Assim como o termo linear da peptona e a interação dos termos quadrático de sulfato de amônio e linear da peptona. Observou-se também que o R ajustado teve um valor de 85%.

Tabela 15: Anova dos efeitos das variáveis independentes sobre a produção de biomassa.

Fator	Soma Quadrática	Grau de Liberdade	Média Quadrática	F calculado	p valor
(1)(NH ₄) ₂ SO ₄ (L)	0,043200	1	0,043200	20,40945	0,001452
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Q)	0,084100	1	0,084100	39,73228	0,000140
(2)Peptona (L)	0,086700	1	0,086700	40,96063	0,000125
Peptona (Q)	0,001600	1	0,001600	0,75591	0,407202
1L e 2L	0,001800	1	0,001800	0,85039	0,380498
1L e 2Q	0,000600	1	0,000600	0,28346	0,607331
1Q e2L	0,009600	1	0,009600	4,53543	0,062056
1Q e 2Q	0,001800	1	0,001800	0,85039	0,380498
Erro	0,019050	9	0,002117		
Total	0,248450	17			

R_{ajustado} = 0,85517

Sobre a produção de biomassa os elementos peptona e sulfato de amônio foram significativos. A peptona mesmo tendo significância sobre a variável possui efeito antagônico, quanto maior sua concentração menor o efeito sobre a biomassa, ao contrário do sulfato de amônio. Do mesmo modo a interação do termo quadrático de sulfato de amônio e linear da peptona, embora significativos, não contribuem positivamente sobre a produção de biomassa (Figura 13).

Figura 13: Pareto com efeitos das variáveis sobre a produção de biomassa.

Os termos lineares de sulfato de amônio e peptona tiveram efeito sobre a variável açúcar residual à nível de significância 90%. As interações dos parâmetros quadráticos e lineares dos elementos também foram significativas, bem como a combinação dos termos

quadrático de sulfato de magnésio e linear de peptona. O R ajustado foi de aproximadamente 90% (Tabela 16).

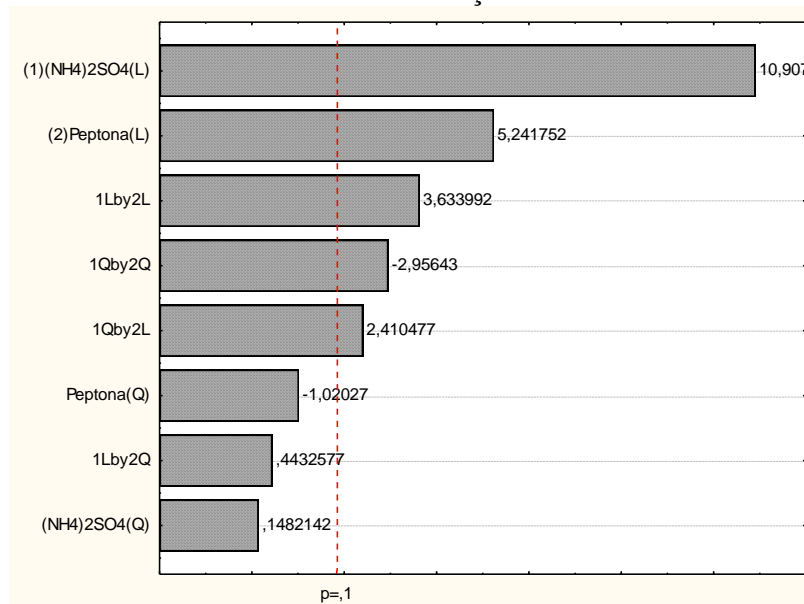
Tabela 16: Anova dos efeitos das variáveis independentes sobre o açúcar residual.

Fator	Soma Quadrática	Grau de Liberdade	Média Quadrática	F calculado	p valor
(1)(NH ₄) ₂ SO ₄ (L)	27,81607	1	27,81607	118,9710	0,000002
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Q)	0,00514	1	0,00514	0,0220	0,885441
(2)Peptona (L)	6,42403	1	6,42403	27,4760	0,000534
Peptona (Q)	0,24338	1	0,24338	1,0409	0,334244
1L e 2L	3,08761	1	3,08761	13,2059	0,005452
1L e 2Q	0,04594	1	0,04594	0,1965	0,668043
1Q e 2L	1,35850	1	1,35850	5,8104	0,039218
1Q e 2Q	2,04357	1	2,04357	8,7405	0,016052
Erro	2,10425	9	0,23381		
Total	43,12849	17			

R ajustado = 0, 90784

Sobre o teor de açúcar residual os elementos foram significativos. Um maior efeito foi apresentado por sulfato de amônio. Ambos elementos contribuíram para maior açúcar residual final, ou seja, nessas condições a cepa consumiu menor fonte de carbono. Um menor efeito sobre a variável resposta foi apresentado para as interações dos termos linear e quadrático das variáveis independentes, assim com a interação dos termos quadrático de sulfato de magnésio e linear de peptona (Figura 14).

Figura 14: Pareto com efeitos das variáveis sobre açúcar residual.



Sobre a variável nitrogênio residual foi significativo o parâmetro linear de sulfato de amônio e peptona. As interações dos parâmetros quadráticos e lineares das variáveis independentes também apresentaram efeito significativo sobre nitrogênio residual, exceto as interações lineares de sulfato de amônio e peptona (Tabela 17).

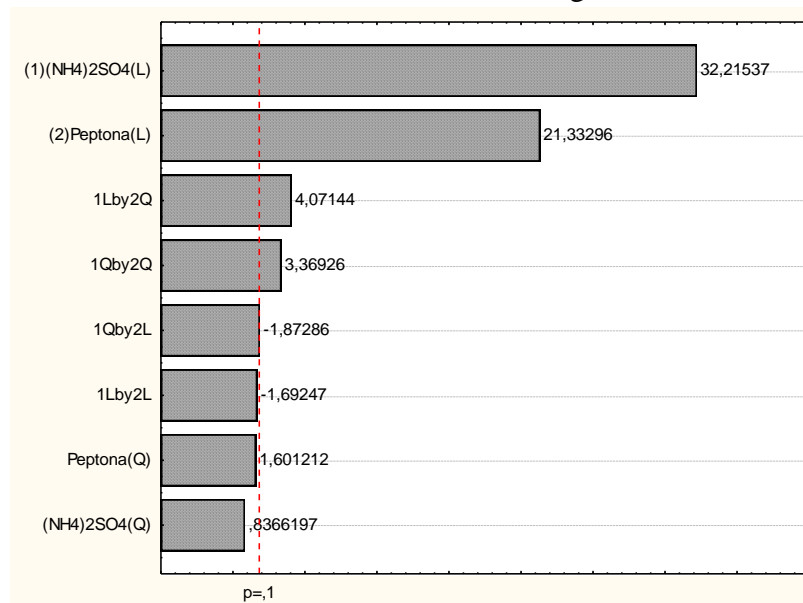
Tabela 17: Anova dos efeitos das variáveis independentes sobre nitrogênio residual.

Fator	Soma Quadrática	Grau de Liberdade	Média Quadrática	F calculado	p valor
(1)(NH ₄) ₂ SO ₄ (L)	93,9121	1	93,91207	1037,830	0,000000
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Q)	0,0633	1	0,06334	0,700	0,424462
(2)Peptona (L)	41,1811	1	41,18107	455,095	0,000000
Peptona (Q)	0,2320	1	0,23200	2,564	0,143794
1L e 2L	0,2592	1	0,25920	2,864	0,124808
1L e 2Q	1,5000	1	1,50000	16,577	0,002794
1Q e 2L	0,3174	1	0,31740	3,508	0,093869
1Q e 2Q	1,0272	1	1,02722	11,352	0,008267
Erro	0,8144	9	0,09049		
Total	139,3067	17			

R_{ajustado} = 0,98896

Sulfato de amônio e peptona apresentou efeito impactante sobre o nitrogênio residual. A presença dos elementos contribuiu para maior quantidade de nitrogênio residual no meio, já que são importantes fontes de nitrogênio. O que sugere interferência no consumo de ambas as fontes de nitrogênio, já que as interações dos dois componentes no meio não demonstram grande impacto, apenas um pequeno efeito sobre a variável resposta (Figura 15).

Figura 15: Pareto com efeitos das variáveis sobre nitrogênio residual.



Em relação ao nitrogênio amoniacal na tabela 18, dos elementos correlacionados apenas sulfato de amônio apresentou efeito significativo e a interação do termo quadrático de sulfato de amônio e linear da peptona.

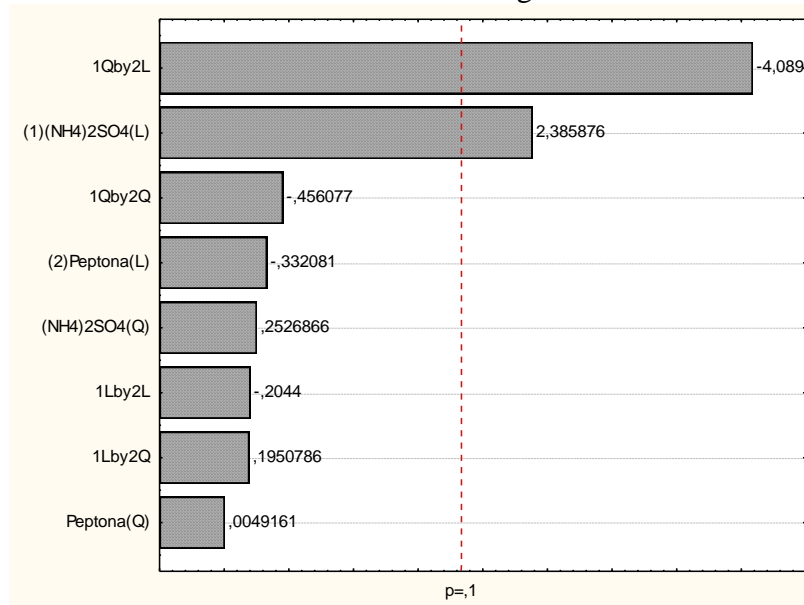
Tabela 18: Anova dos efeitos das variáveis independentes sobre nitrogênio amoniacal.

Fator	Soma Quadrática	Grau de Liberdade	Média Quadrática	F calculado	p valor
(1)(NH ₄) ₂ SO ₄ (L)	16,35668	1	16,35668	5,69240	0,040833
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Q)	0,18347	1	0,18347	0,06385	0,806187
(2)Peptona (L)	0,31687	1	0,31687	0,11028	0,747431
Peptona (Q)	0,00007	1	0,00007	0,00002	0,996185
1L e 2L	0,12005	1	0,12005	0,04178	0,842588
1L e 2Q	0,10935	1	0,10935	0,03806	0,849664
1Q e2L	48,05340	1	48,05340	16,72340	0,002719
1Q e 2Q	0,59769	1	0,59769	0,20801	0,659140
Erro	25,86080	9	2,87342		
Total	91,59838	17			

R ajustado = **0,46671**

Para nitrogênio amoniacal a interação do termo quadrático de sulfato de amônio e linear da peptona apresentou maior impacto que o termo linear de sulfato de amônio. Contudo efeito do sulfato de amônio foi positivo. Quanto maior for a presença de sulfato de amônio, maior a variável resposta, visto que o sulfato de amônio é a fonte inorgânica de nitrogênio presente (Figura 16).

Figura 16: Pareto com efeitos das variáveis sobre nitrogênio amoniacal.



A maior fonte de nitrogênio na natureza encontra-se na forma de compostos inorgânicos, como amônia e nitrato. A maioria das bactérias é capaz de utilizar a amônia como fonte de nitrogênio (MADIGAN et al., 2008).

A necessidade de nitrogênio pode ser parcialmente preenchida com a capacidade de algumas espécies de *Bacillus* de fixar o nitrogênio: *B. polymyxa*, *B. macerans*, bem como outras (SNEATH et al., 1986).

A substituição parcial de peptona por sulfato de amônio pode ser uma alternativa viável e economicamente favorável, visto a diminuição sobre o custo do meio de cultivo e principalmente no custo da biomassa (Tabela 19).

Tabela 19: Valores calculados para o meio NYD e NYD modificado

	Meio	
	NYD	NYD modificado*
Custo do meio (R\$.L⁻¹)	20,99	18,33
Biomassa produzida (g.L⁻¹)	0,74	1,24
Custo da biomassa (R\$.g⁻¹)	28,36	14,78

* NYD modificado (1% de peptona, 3% de sulfato de amônio, 0,5% de sulfato de magnésio).

Fonte: SIGMA ALDRICH, 2013.

Assim pelos resultados obtidos, a combinação selecionada, a que maior contribuiu para a produção de biomassa da cepa RAB9 foram as concentrações de 1,0 g.L⁻¹ de peptona com 3,0 g.L⁻¹ de sulfato de amônio.

4.5- TESTES PRELIMINARES EM BIORREATOR

Dos testes preliminares realizados em biorreator foi observado o impacto da adição de diferentes vazões de ar (2, a 6 L/min) em batelada simples sobre a biomassa produzida pela linhagem em estudo. Nas amostras coletadas foi constatado formação de emulsão, o que prejudicou a centrifugação das mesmas, ocasionada pela presença do óleo de soja, usualmente utilizado como antiespumante no Laboratório de Bioprocessos.

Para a verificação da necessidade do emprego do antiespumante no processo foram feitos testes sem adição de antiespumante, nas mesmas condições. Após nove horas de experimentos foi observada intensa formação de espuma pelo micro-organismo.

Devido a elevada formação de espuma, quantidades expressivas de meio e biomassa foram perdidas nos reatores com vazões de ar 4 e 6 L/min, principalmente na maior vazão. Ocorreu entrada de espuma nos filtros e entupimento da entrada de ar no biorreator,

prejudicando a injeção de ar e a manutenção constante das vazões na fermentação. Contudo, com os experimentos preliminares foi descartada a utilização do óleo de soja para a cepa RAB9 e constatada a importância de se buscar um novo antiespumante para as fermentações em reator de bancada para diminuir a tensão superficial e impedir a formação de espuma.

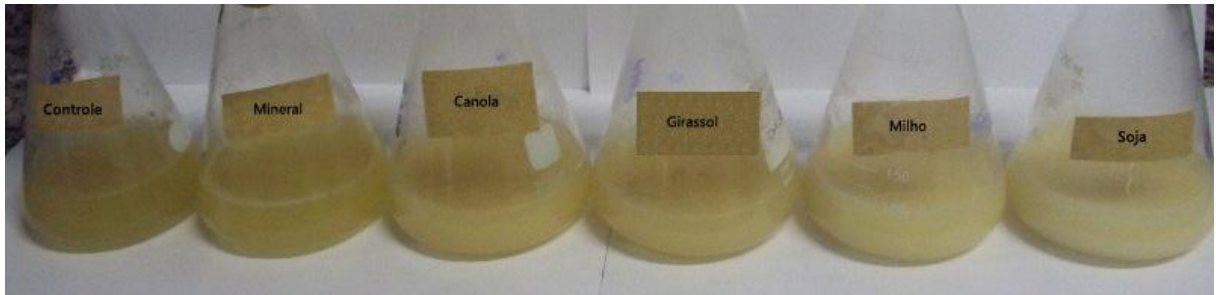
Uma possível razão para a grande formação de espuma é a produção de biossurfactante pela espécie RAB9. Algumas espécies de *Bacillus* são conhecidas como produtoras de biossurfactantes. Schaller *et al.* (2004) relataram produção de surfactina, biossurfactante produzido por *B. subtilis*, Bugay (2009) produziu biossurfactante com *Bacillus* sp, Dexter *et al.* (2008) relataram produção de lipopetídeos por *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis* e *B. polymyxa*.

4.6 – SELEÇÃO DO ANTIESPUMANTE A SER UTILIZADO NO PROCESSO EM BIORREATOR

O teste para a escolha do antiespumante foi realizado com óleos vegetais (soja, milho, girassol, canola) e mineral. A utilização de óleos vegetais é comum na indústria por ser de preço bastante acessível, uma grande vantagem para baratear o processo, em comparação com antiespumante comercial com valores muito maiores. Os experimentos foram realizados em agitador orbital a 30°C, 150 rpm por 24h. Observou-se a turvação comparando-os com o controle (sem óleo). Determinou-se a quantidade de biomassa e interferência na separação de massa bacteriana e o sobrenadante (meio).

Observados os testes com os óleos e o controle visual, notou-se uma maior turvação causada pelos óleos vegetais no meio, ao contrário do óleo mineral que apresentou turvação semelhante ao controle. A turvação dos óleos vegetais foi apresentada de forma crescente para os óleos: canola, girassol, milho e soja. Constatado maior turvação para teste com o óleo de soja. O que comprova uma interferência dos óleos vegetais sobre a fermentação com a linhagem RAB9, principalmente em presença de óleo de soja (Figura 17).

Figura 17: Efeito dos óleos vegetais e mineral como agentes antiespumante para a cepa RAB9.



Nas condições dos testes em agitador orbital a presença dos óleos no meio não interferiu na separação da biomassa e sobrenadante. Também não foi constatada formação de emulsão superficial, nem mesmo em presença do óleo de soja (Figura 18).

Figura 18: Tubos com óleos vegetais e mineral após centrifugação com a cepa RAB9.



Pelos resultados obtidos com observação da turbidez, separação da biomassa e formação de emulsão, os óleos vegetais mesmo não apresentando emulsão superficial e não interferindo na separação da biomassa e sobrenadante, interferiram na turbidez do meio, sendo então o melhor antiespumante para a cepa RAB9 o óleo mineral.

4.7 - FERMENTAÇÃO COM O MEIO NYD MODIFICADO

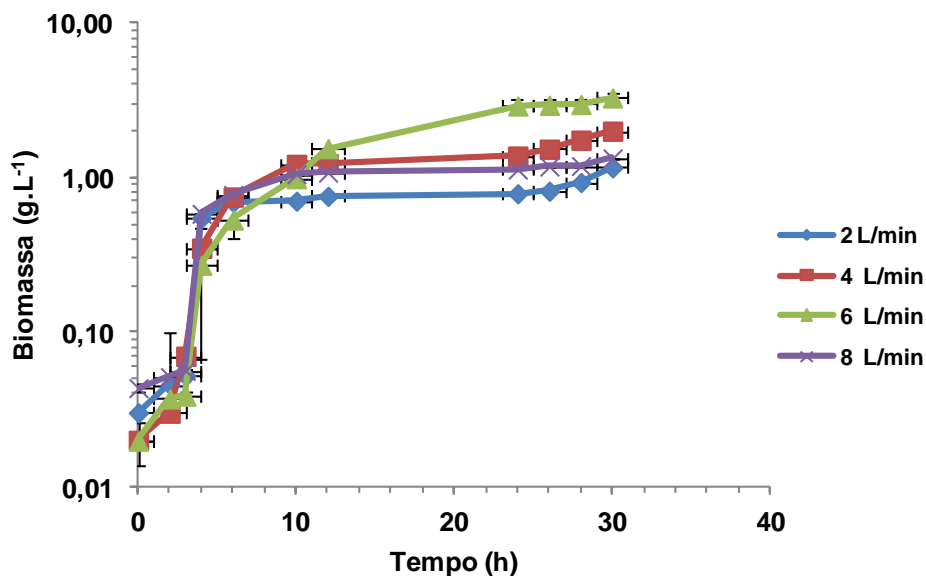
Nos experimentos anteriores foram estudadas efeitos da adição de alguns elementos no meio NYD, verificados estes efeitos e estabelecidas suas concentrações, chegou-se a uma nova formulação do meio NYD (composição em g.L^{-1}): 10,0 de dextrose,

5,0 de extrato de levedura, 3,0 de extrato de carne, 1,0 de peptona, 3,0 de sulfato de amônio, 0,5 de sulfato de magnésio.

Os testes de fermentação foram realizados em batelada simples com diferentes variações da vazão de ar (2 a 8 L/min) com adição de óleo mineral como antiespumante. Visando aumentar o período de observação da curva de crescimento da cepa RAB9 em biorreator foi estendido o período do experimento de 24 horas para 30 horas.

As condições estabelecidas em biorreator em batelada simples proporcionaram efeito satisfatório para o crescimento da cepa RAB9. O aumento da vazão de ar 2 para 4 L/min refletiu em um grande aumento sobre a produção de biomassa. De 4 para 6 L/min o salto de crescimento obtido, mostram os valores mais altos determinados para a produção de biomassa com a linhagem estudada. Com o aumento da vazão de 6 para 8 L/min os valores obtiveram uma queda, porém os valores apresentados foram maiores que os obtidos com a menor vazão testada. Em geral os maiores valores para a produção de biomassa foram apresentados com o tempo de 30 horas (Figura 19).

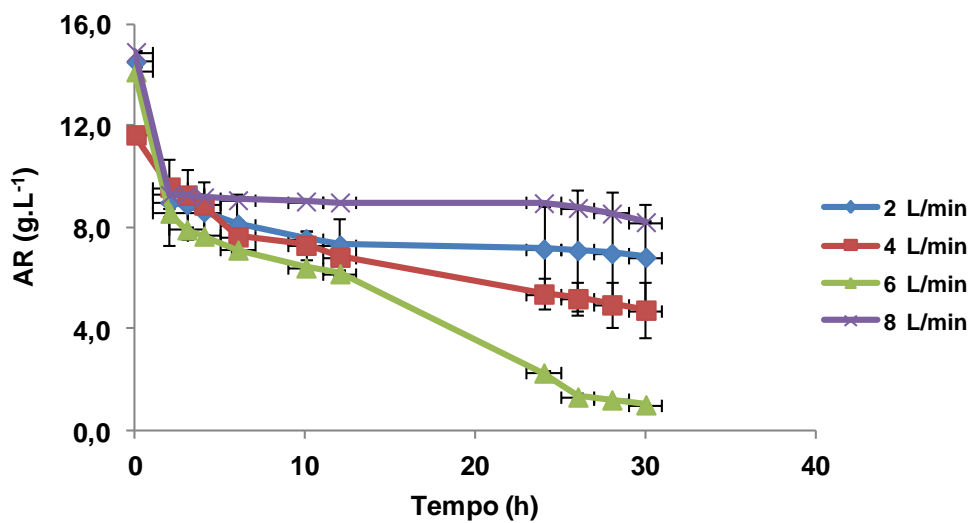
Figura 19: Produção de Biomassa com vazões de ar 2, 4, 6 e 8 L/min.



A melhor produção de biomassa observada com vazão de ar de 6 L/min no período de 30 horas proporcionou uma concentração máxima de $3,28 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa. Se comparada a maior produção de biomassa obtida em meio NYD tradicional, com fermentação conduzida em agitador orbital, temos um acréscimo de $2,3 \text{ g.L}^{-1}$ se tomarmos uma produção de $0,99 \text{ g.L}^{-1}$, um aumento de 334 %.

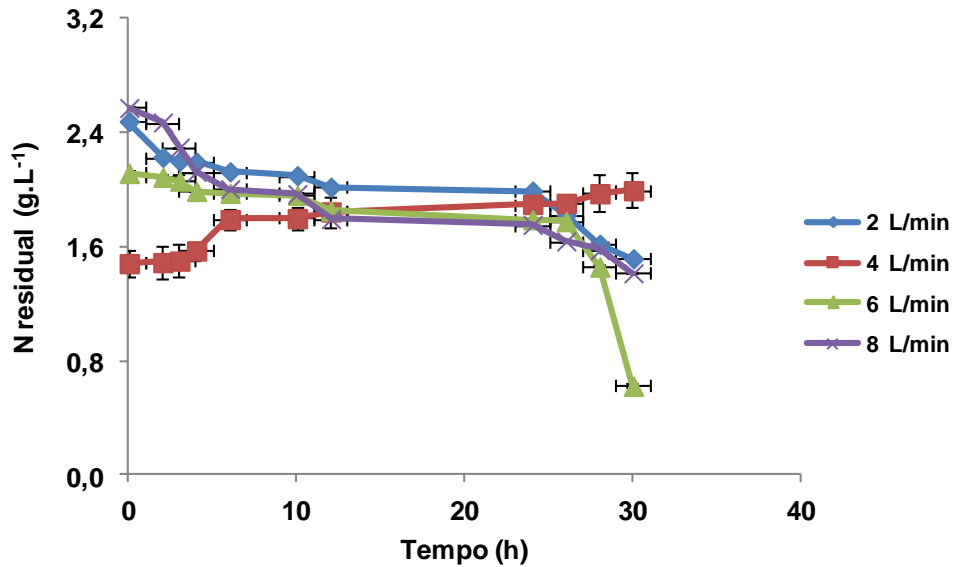
O maior consumo de açúcar foi observado para as vazões 4 e 6 L/min, já que nas condições testadas apresentaram os menores valores para o teor de açúcar residual. O que representa um consumo 59,3% e 92,8 % respectivamente. Com vazão de ar de 6 L/min o valor final de açúcar residual foi de $1,0 \text{ g.L}^{-1}$, ou seja, um consumo de quase todo açúcar disponível no meio. O consumo de açúcar com as vazões de ar 2 e 8 L/min foram 53,1% e 44, 9% respectivamente. O grande consumo da fonte de carbono em 6 L/min em 30 horas de fermentação é reflexo do alto crescimento da cepa RAB9 (Figura 20).

Figura 20: Açúcar residual com vazões de ar 2, 4, 6 e 8 L/min.



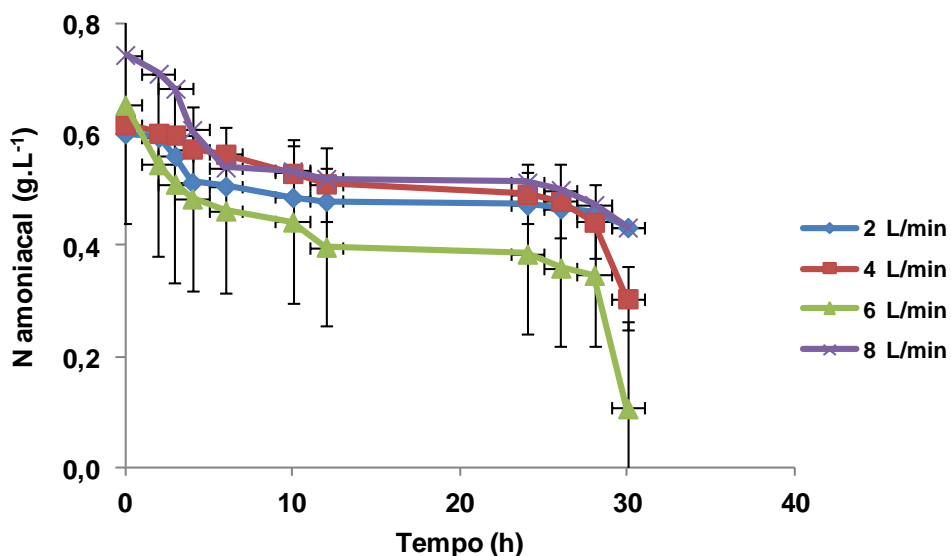
O teor de nitrogênio residual foi menor para a vazão de 4 L/min, que representa consumo de 34,4% do nitrogênio disponível. Para as vazões de 2 e 8 L/min o consumo de nitrogênio foi menor que 50%, apresentaram um percentual de 40% e 46,1% respectivamente. Um comportamento semelhante foi observado para as vazões testadas sobre o teor de nitrogênio em torno do período de 24 horas. Deste ponto pode ser observado que o experimento com vazão de ar 6 L/min tem um maior decaimento no teor de nitrogênio residual representando um consumo final de 70,6 % de nitrogênio (Figura 21).

Figura 21: Nitrogênio residual com vazões de ar 2, 4, 6 e 8 L/min.



O teor de nitrogênio amoniacal no meio representa um consumo de nitrogênio inorgânico de 28,3 % para vazão de 2 L/min, 51,6% para 4 L/min, 41,8 % para 8 L/min. O maior consumo foi obtido para vazão de ar 6 L/min um percentual de 83,1 %, o que demonstra um grande consumo da fonte de nitrogênio inorgânica presente no meio. Em geral o teor de nitrogênio amoniacal para as vazões de ar 2, 4 e 8 L/min foi semelhante. No período de 28 a 30 horas verifica-se uma maior queda nos valores de nitrogênio amoniacal para a vazão de 6 L/min, o que representa um consumo mais intenso da fonte inorgânica de nitrogênio disponível (Figura 22).

Figura 22: Nitrogênio amoniacal com vazões de ar 2, 4, 6 e 8 L/min.



Os micro-organismos têm diferentes capacidades de converter as substâncias químicas dos meios de cultura em biomassa ou outros produtos de interesse. Essa capacidade pode ser expressa numericamente como um rendimento de conversão. Esses valores mostram que o aproveitamento dos nutrientes não é integral, ou seja, apenas uma parcela dos nutrientes é efetivamente transformada em biomassa ou produtos de interesse (PRADELLA et al., 2001).

A conversão do substrato em biomassa ($Y_{X/S}$) foi calculada para análise da quantidade de biomassa produzida em relação ao açúcar e nitrogênio consumidos no meio de fermentação. O rendimento em biomassa ($Y_{R/S}$) também foi um parâmetro verificado, em virtude da análise de eficiência da linhagem estudada em converter os substratos disponíveis em biomassa.

Os maiores valores de conversão de açúcar em biomassa, bem como, os maiores valores de rendimento em biomassa foram registrados para as vazões de 4 e 6 L/min, tendo maior rendimento dentre as vazões testadas a vazão de 6 L/min. A conversão e rendimento de nitrogênio total e amoniacal em biomassa foram maior para a vazão de 6 L/min. Os cálculos dos parâmetros confirmam a eficiência do cultivo da linhagem, com máxima conversão de biomassa (Tabela 20).

Tabela 20: Fatores de conversão de substrato em biomassa ($Y_{X/S}$) e rendimentos em biomassa ($Y_{R/S}$) para os testes de fermentação

Vazões (L/min)	Açúcar		Nitrogênio total		Nitrogênio inorgânico	
	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{R/S}$ (g/g)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{R/S}$ (g/g)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{R/S}$ (g/g)
2	0,15	0,11	1,30	0,45	5,25	1,88
4	0,28	0,17	-3,26	1,32	6,60	3,30
6	0,25	0,23	2,17	1,55	5,43	4,66
8	0,19	0,08	1,26	0,49	0,96	1,84

A quantidade de biomassa alcançada por um processo descontínuo depende da concentração inicial de substrato limitante do crescimento e da eficácia do micro-organismo para converter o substrato em material celular. A função principal de um fermentador é a de proporcionar um meio ambiente controlado que permita o crescimento eficiente das células (NEVES, 2003).

O emprego das diferentes vazões de ar foi importante para as condições de fermentação com a linhagem em biorreator. Um melhor desempenho em crescimento microbiano obtido, em comparação com as condições em agitador orbital. Segundo

Mantzouridou et al. (2002), a aeração pode ser benéfica ao crescimento e desempenho de células microbianas, melhorando as características de transferência de massa em relação ao substrato, produto e oxigênio.

As vazões de ar empregadas, também contribuíram para diminuição do custo de biomassa, visto um maior aproveitamento do substrato. Com vazão de 6 L/min onde a produção foi maior, o custo da biomassa apresentou um menor valor (Tabela 21). Viabilizando assim, o emprego dessas condições para um processo mais econômico e rentável.

Tabela 21: Valores de custos para o processo empregando com diferentes vazões de ar.

	Vazão de ar (L/min)			
	2	4	6	8
Custo do meio (R\$.L⁻¹)	22,10	22,10	22,10	22,10
Biomassa produzida (g.L⁻¹)	1,16	2,00	3,28	1,33
Custo da biomassa (R\$.g⁻¹)	19,05	11,05	6,73	16,61

Fonte: SIGMA ALDRICH, 2013.

Assim sendo, o ajuste do meio NYD proporcionou nas condições de fermentação em batelada simples com vazão de ar de 6 L/min uma maior produção de biomassa, menor teores de açúcar residual e fontes de nitrogênio. O que permite concluir que as condições em biorreator refletem em melhores condições para o cultivo da cepa. Sendo assim estas condições estabelecidas, definidas como as melhores condições para a produção da linhagem RAB9.

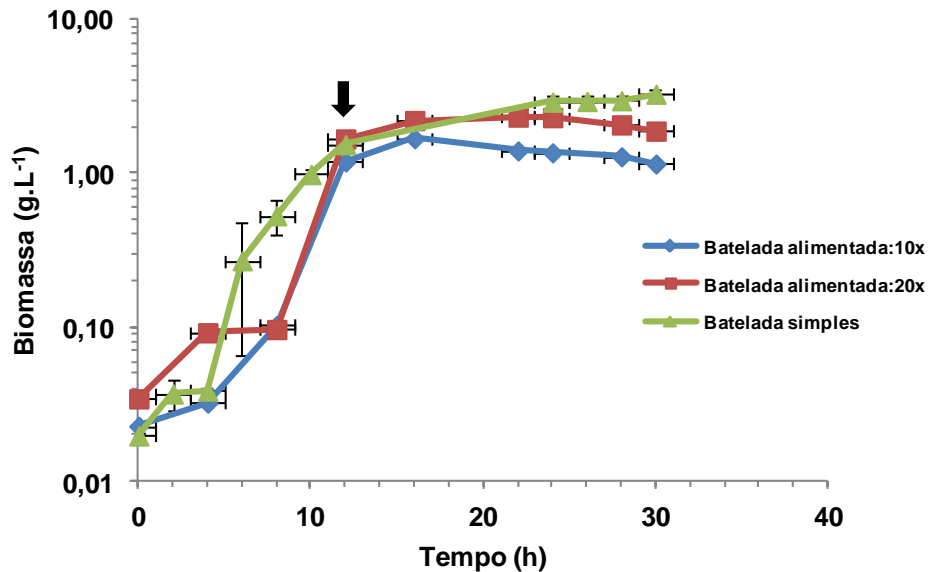
4.8 - TESTE EM BIORREATOR EM BATELADA ALIMENTADA

A condição selecionada com a fermentação em batelada simples foi parâmetro base para a definição da fermentação com batelada alimentada. A alimentação foi iniciada com 12 horas decorridas de fermentação (indicada pelas setas). As dornas foram alimentadas com dois meios concentrados, 10 e 20 vezes a concentração de glicose.

A maior produção de biomassa foi determinada no ponto de 22 horas de fermentação em ambos os testes. Com concentração de 1,41 g.L⁻¹ em alimentação com o meio 1, meio menos concentrado, e 2,33 g.L⁻¹ em alimentação com o meio 2, meio mais concentrado. O perfil de produção de biomassa foi semelhante para ambos os meios, porém as melhores respostas para batelada alimentada com relação à biomassa foram determinadas com o meio 2. Até o período de início da alimentação as fermentações seguem em batelada

simples, com semelhante concentração de biomassa no ponto de 12 horas. A fermentação alimentada apresenta um comportamento crescente até o período de 16 horas, daí então estaciona a produção, apresentando um pequeno decréscimo em torno de 30 horas. Ao contrário da batelada simples com produção crescente até o período final (Figura 23).

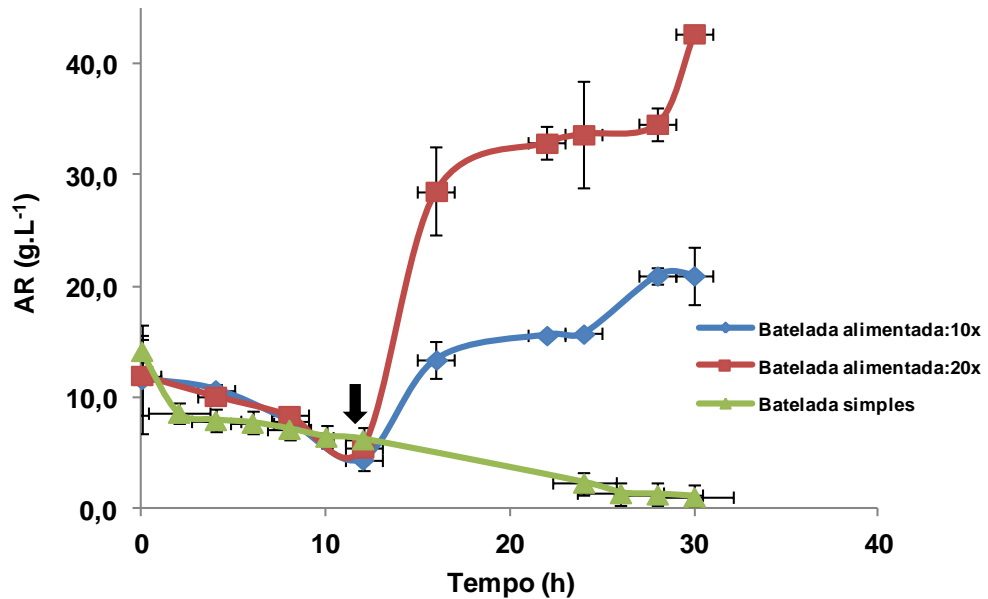
Figura 23: Produção de biomassa em batelada alimentada com meios 1 e 2.



A batelada alimentada nestas condições para a cepa RAB9 não se mostrou muito vantajosa. O potencial de crescimento diminuiu bastante em relação à batelada simples. A presença de maior concentração de nutrientes ao longo da fermentação pode ter saturado rapidamente as células bacterianas, diminuindo então sua produção.

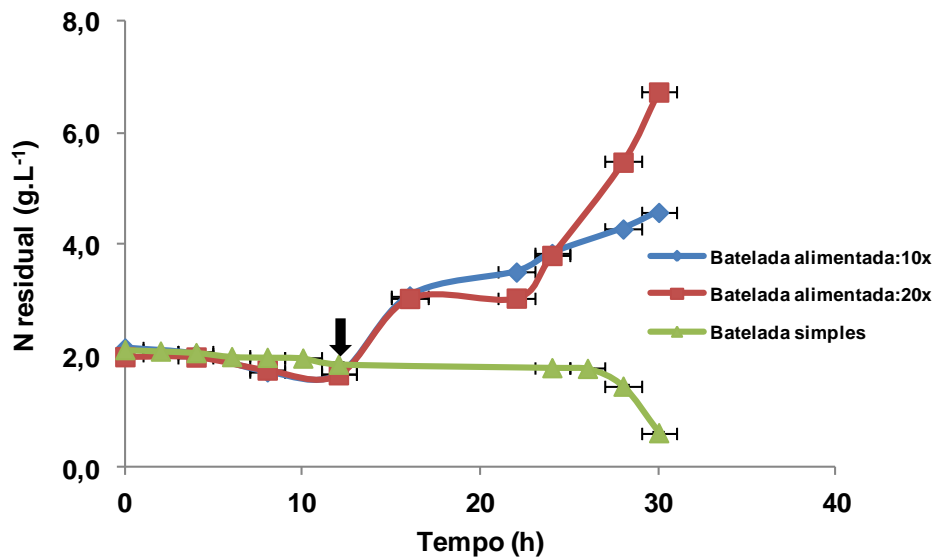
O consumo de açúcar é observado até o período de 12 horas, conforme apresentado pelo decréscimo do teor do açúcar residual. Nestes pontos iniciais o teor de açúcar residual representa um consumo semelhante. Depois do ponto de 12 horas o teor de açúcar do meio aumenta, devido alimentação constante. O teor de açúcar residual segue crescente até o final da fermentação. O percentual de açúcar adicionado na alimentação sendo maior em meio 2, refletiu em maior teor residual no final da fermentação em relação a alimentação com o meio 1 (Figura 24).

Figura 24: Açúcar residual obtido em batelada alimentada com meios 1 e 2.



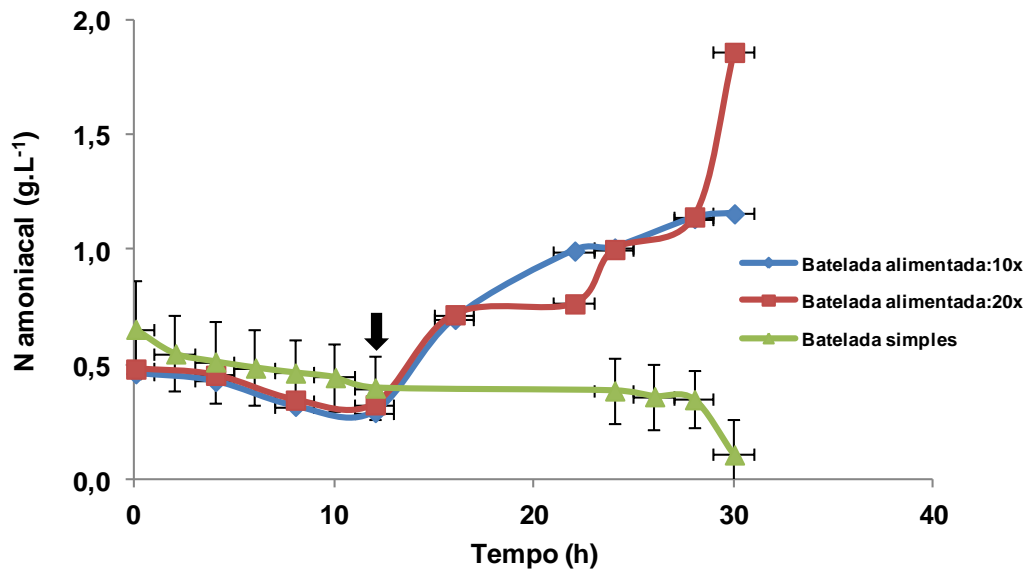
Os teores de nitrogênio residual são menores antes da alimentação. Não foi observado consumo de nitrogênio no período de alimentação. Visto que o teor de nitrogênio residual apresentou contínuo aumento até o final da batelada (Figura 25).

Figura 25: Nitrogênio residual obtido em batelada alimentada com meios 1 e 2.



Os valores de nitrogênio amoniacal em geral foram semelhantes para a alimentação com os dois meios. O teor de nitrogênio amoniacal aumenta com o período de alimentação e segue até o final da fermentação (Figura 26).

Figura 26: Nitrogênio amoniacal obtido em batelada alimentada com meios 1 e 2.



A estratégia de alimentação foi empregada com objetivo de aumentar a concentração de massa celular exponencialmente na acumulação de biomassa em biorreator.

A fermentação descontínuo-alimentada (batelada alimentada) oferece melhor controle das condições de adição de substratos durante a fermentação (particularmente importante no caso das concentrações de substratos específicos como, por exemplo, a fonte de carbono), o modo de operação permite dominar e controlar os desvios no crescimento do micro-organismo encontrados na fermentação descontínua (batelada simples) (NEVES, 2003).

A fermentação com batelada alimentada através do controle da alimentação de nutrientes é um dos métodos mais populares para atingir células de alta densidade, muitas vezes necessário para alto rendimento e produtividade. Estratégias de alimentação de nutrientes incluem simples métodos indiretos pH-stat ou DO-stats, estratégias de alimentação pré-determinadas (exponencial alimentação) de acordo com a captação de glicose ou demanda, e outros métodos (KWON et al., 2011). Culturas com alta densidade, como células de *Bacillus subtilis* podem ser obtidas por batelada alimentada com alimentação com solução nutritiva. Onde se obteve uma concentração elevada de células, 77 g.L⁻¹ por alimentação com uma mistura de glicose e peptona com uma relação de 0,2-5 g glicose/g de peptona (KWON et al., 2011).

Porém, nas condições aplicadas, a estratégia de alimentação com os meios concentrados para incrementar a produção de biomassa em biorreator não proporcionou impacto favorável para crescimento da linhagem.

V – CONCLUSÕES

A fase exponencial da linhagem *Bacillus* sp. RAB9 apresenta uma curta faixa com período em torno de 8 a 24 horas de fermentação.

O efeito da adição de peptona com aumento da concentração no meio NYD foi positivo para a produção de biomassa, mas não vantajoso, o aumento da concentração de peptona não refletiu na mesma proporção sobre o crescimento da cepa e somou maior impacto sobre os custos do processo.

A modificação do meio tradicional com peptona associada com elementos secundários foram importantes para o aumento da biomassa, principalmente em presença de sulfato de magnésio.

A substituição parcial da fonte orgânica de nitrogênio por sulfato de amônio, fonte inorgânica, é compensador por contribuir para um menor custo de produção de biomassa, tornando o processo com o meio NYD modificado economicamente viável.

A fermentação em biorreator com batelada simples preparada com o meio NYD modificado a vazão de 6 L/min foi a melhor condição para se obter a maior produção de biomassa.

A produção de biomassa em biorreator com meio NYD modificado comparada com a produção em agitador orbital com o meio NYD tradicional apresentou um aumento de 334 %.

A estratégia de alimentação para incremento da produção de biomassa em biorreator nas condições aplicadas não proporcionou impacto favorável para crescimento da linhagem.

Podemos concluir que com os fatores estudados foi possível a ampliação de escala com aumento na produção de biomassa da linhagem *Bacillus* sp. RAB9.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIYER, P. V. D. Effect of C:N ratio on alpha amylase production by *Bacillus licheniformis* SPT 27. **African Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 10, p. 519-522, 2004.
- ALONSO, F. O. M. **Efeito da agitação e aeração na produção de lípases por *Yarrowia lipolytica* (IMUFRJ 50682)**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.
- ALVARADO, I. D. C. M. **Variabilidade e Ecologia de *Pectobacterium Carotovorum subsp. Carotovorum*, agente da podridão-mole em couve-chinesa**. Tese de Doutorado. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2006.
- ANDRADE, S. R. M. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. Planaltina, Embrapa Cerrados, 2002.
- ANGELO, E. A.; VILAS-BÔAS, G. T.; GÓMEZ, R. J. H. C. *Bacillus thuringiensis*: características gerais e fermentação. **Ciências Agrárias**, v. 31, n. 4, p. 945-958, 2010.
- ANNUAR, M. S. M.; TAN, I. K. P.; RAMACHANDRAN, K. B. Evaluation of nitrogen sources for growth and production of medium-chain-length poly-(3-hydroxyalkanoates) from palm kernel oil by *Pseudomonas putida* PGA1. **Journal of Molecular Biology and Biotechnology**, v. 16. n. 1, p. 11-15, 2008.
- ASSIS, S. M. P. ***Heliconia psitacorum* L.f. – Doenças, pragas e utilização de rizobactérias na promoção de crescimento**. Tese de Doutorado. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2002.
- BONIOLO, F. S.; RODRIGUES, R. C.; PRATA, A. M. R.; LÓPEZ, M. L.; JACINTO, T.; SILVEIRA, M. M.; MOLINA, M. A. B. Oxygen supply in *Bacillus thuringiensis* fermentations: bringing new insights on their impact on sporulation and δ -endotoxin production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 94, p. 625–636, 2012.
- BUGAY, C. **Biossurfactantes produzidos por *Bacillus* sp.: Estudos de produção e caracterização**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Fermentação descontínua alimentada. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica**, São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, v. 2, p. 205-218, 2001b.

CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Fermentação descontínua. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica**. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, v. 2, p. 193-204. 2001a.

CARVALHO, R. V.; CORRÊA, T. L. R.; SILVA, J. C. M.; VIANA, A. P.; MARTINS, M. L. L. Otimização das condições de cultivo para a produção de amilases pelo termofílico *Bacillus* sp. e hidrólise de amidos pela ação da enzima. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n.2, p. 380-386, 2008.

CATTELAN, A. J. **Métodos qualitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras de crescimento vegetal**. Londrina: EMBRAPA-CNPS, p. 36, 1999.

CAVALCANTI, M. T.; SILVEIRA, E. B.; MARIANO, R. L. R.; VIANA, I. O. Crescimento de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* sob diferentes temperaturas, pH, concentrações de cloreto de sódio e fontes de carbono. **Ciência Rural**, v.35, n.6, 2005.

CONN, K. L.; NOWAK, J.; LAZAROVITS, G. A gnotobiotic bioassay for studying interactions between potatoes and plant growth-promoting rhizobacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43 p. 801-808, 1997.

CORDEIRO, Z. J. M. Banana Produção: Aspectos Técnicos. **Frutas do Brasil**. Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia. Brasília, v.1, p. 143, 2000.

CORRÊA, A. P. F. **Purificação parcial e caracterização de uma protease alcalina queratinolítica de *Bacillus* sp. P7**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

COSTA, J. A. V. **Produção de amiloglicosidase por fermentação em estado sólido em biorreator de coluna**. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.

COUCH, T. L. Industrial fermentation and formulation of entomopathogenic bacteria. In: CHARLES, J. F. (Org.). **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field applications**. New York, Kluwer Academic Publishers, p. 297-316, 2000.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry – a review. **Journal of Food Engineering**, v. 76, p. 291-302, 2006.

DEXTER, A. F.; MIDDELBERG, A. P. J. Peptides as functional surfactants. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 47, p. 6391-6398, 2008.

EMBRAPA. **Cultura de tecidos: A importância desta técnica para a biotecnologia e o agronegócio**. Embrapa Recursos Genéticos, 2006. <http://www.cenargen.embrapa.br>. Acesso em 23 de Jan. 2013.

FAO. **Produção mundial de banana**. <http://www.fao.org>. Acesso em 23 de Jan. 2013.

FELIX, K. C. S. **Sobrevivência de *Ralstonia Solanacearum* em tecidos infectados de pimentão e diferentes tipos de solo de Pernambuco, Brasil**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2009.

GARCIA, A. L.; FÉLIX, K. C. S.; LIMA, S. C.; SILVEIRA, E. B.; MARIANO, R. L. R. Atividade antibacteriana do extrato aquoso de *Camellia sinensis*. **Anais XLII Congresso Brasileiro de Fitopatologia**, 2009.

GOMES, A. M. A.; MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; MESQUITA, J. C. P. Isolamento, seleção de bactérias e efeito de *Bacillus* spp. na produção de mudas orgânicas de alface. **Horticultura Brasileira**, v. 21, p. 699-703, 2003.

HAMMAMI, I.; RHOUMA, A.; JAOUADI, B.; REBAI, A.; NESME, X. Optimization and biochemical characterization of a bacteriocin from a newly isolated *Bacillus subtilis* strain 14B for biocontrol of *Agrobacterium* spp. strains. **Letters in Applied Microbiology**, v.48, p.253–260, 2009.

HANCOCKS, N. H.; THOMAS, A. R.; STOCKS, S. M.; HEWITT, C. J. An investigation into the preservation of microbial cell banks for α -amylase production during 5 l fed-batch *Bacillus licheniformis* fermentations. **Biotechnology Letters**, v. 32, p. 1405–1412, 2010.

HECK, J. X.; HERTZ, P. F.; AYUB, M. A. Z. Cellulase and xylanase production by isolated amazon *Bacillus* strains using soybean industrial residue based solid-state cultivation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.33, p.213-218, 2002.

HISS, H. Cinética de Processos Fermentativos. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica**, São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, v. 2, p. 93-122, 2001.

IBGE. **Levantamento sistemático da produção agrícola**, 2012. <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em 23 de Jan. 2013.

KIRSOP, B. E.; DOYLE, A. **Maintenance of Microorganisms and Cultured**. 2 ed. Academic Press, London. cap. 4.2, p. 45-50, 1991.

KLOEPPER, J. W. Current status and future trends in biocontrol research and development in the U.S. **Anais, International Symposium on Clean Agriculture**. Sapporo, Japan, p.49-52. 1997.

KUO, C. C.; LIN, C. A.; CHEN, J. Y.; LIN, M. T.; DUAN, K. J. Production of cyclodextrin glucanotransferase from an alkalophilic *Bacillus* sp. by pH-stat fed-batch fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 31, p. 1723–1727, 2009.

KWON, E. Y.; KIM, K. M.; KIM, M. K.; LEE, I. Y.; KIM, B. S. Production of nattokinase by high cell density fed-batch culture of *Bacillus subtilis*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 34, p. 789–793, 2011.

LAZAROVITZ, G.; NOWAK, J. Rhizobacterium for improvement of plant growth and establishment. **Hortscience**, v. 32, p. 188-192, 1997.

LAZZARETTI, E.; MELO, I. S. Influência de *Bacillus subtilis* na promoção de crescimento de plantas e nodulação de raízes de feijoeiro. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, Embrapa Meio Ambiente, n. 28, p. 21, 2005.

LEELASUPHAKUL, W.; HEMMANEE, P.; CHUENCHITT, S. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. **Postharvest. Biology and Technology**, v.48, p.113-121, 2008.

LICHTEMBERG, L. A.; LICHTEMBERG, P. S. F. Avanços na bananicultura brasileira. **Revista Brasileira Fruticultura**, v. e, p. 029-036, 2011.

LYUBENOVA, V.; IGNATOVA, M.; SALONEN, K.; KIVIHARJU, K.; INEN, T. E. Control of α -amylase production by *Bacillus subtilis*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 34, p.367–374, 2011.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. São Paulo, Prentice Hall. 10 ed. cap. 5, p. 97, 2008.

MANTZOURIDOU, F.; ROUKAS, T.; KOTZEKIDOU, P. Effect of the aeration rate and agitation speed on b-carotene production and morphology of *Blakeslea trispora* in a stirred tank reactor: mathematical modeling. **Biochemical Engineering Journal**, v. 10, p. 123–135, 2002.

MARIANO, R. L. R.; KLOEPPER, J. W. Método alternativo de biocontrole: resistência sistêmica induzida por rizobactérias. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 8, p. 121-137, 2000.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B. **Manual de Práticas em Fitobacteriologia**. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2 ed, cap. 4, p. 87, 2005.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; ASSIS, S. M. P.; GOMES, A. M. A.; NASCIMENTO, A. R. P.; DONATO, V. M. T. S. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. **Anais, Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, Recife, v. 1, p.89-111, 2004.

MELLO, M. R. F.; MARIANO, R. L. R.; MENEZES, M.; CÂMARA, T. R.; ASSIS, S. M. P. Seleção de bactérias e métodos de bacterização para promoção de crescimento em mudas de abacaxizeiro micropropagadas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 28, n. 3, p. 222-228, 2002.

MELO, I. S. **Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos**. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Eds.). **Controle biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, v.1, p. 17-67, 1998.

MENEZES, M.; ASSIS, S. M. P. **Guia prático para fungos fitopatogênicos**. 2 ed. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, cap.7, p.78, 2004.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; STUART, D. M.; PANDEY, A. New developments in solid-state fermentation II. Rational approaches to the design, operation and scale-up bioreactors. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1211-1225, 2000.

MORAES, I. O. Produção de microrganismos. In: LIMA, U.A.; AQUARINE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial. Processos Fermentativos e Enzimáticos**. Editora Edgard Blücher LTDA, São Paulo, 1 ed., v. 3, cap. 9, p 199-217, 2001.

NASCIMENTO, A. R. P. **Cancro bacteriano (*Xanthomonas campestris* pv. *viticola*) da videira (*Vitis* spp.): métodos de preservação e crescimento de isolados; escala diagramática e reação de variedades de videira à doença**. Tese de Doutorado. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2005.

NASCIMENTO, A. R. P.; MARIANO, R. L. R.; GAMA, M. A. S. Métodos de preservação e crescimento de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em meio de cultura variando temperatura, pH e concentração de NaCl. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, p. 650-654, 2005.

NASCIMENTO, W. C. A.; SILVA, A. R.; CARVALHO, R. V.; MARTINS, M. L. L. Otimização de um meio de cultura para a produção de proteases por um *Bacillus* sp. termofílico. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p.417-421, 2007.

NEVES, L. C. M. **Obtenção da enzima glicose 6- fosfato desidrogenase utilizando ‘*Saccharomyces cerevisiae*’ W303-181**. Dissertação de Mestrado. Universidades de São Paulo, São Paulo, 2003.

NGUGIA, H. K.; DEDEJB, S.; DELAPLANEB, K. S.; SAVELLEA, A. T.; SCHERMA, H. Effect of flower-applied Serenade biofungicide (*Bacillus subtilis*) on pollination-related variables in rabbiteye blueberry. **Biological Control**, v.33, p.32-38, 2005.

NÓBREGA, J. P. R. **Produção de mudas de bananeira (*Musa* sp. AAB) em função da poda e doses de nitrogênio e boro.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2006.

ONGENA, M.; JOURDAN, E.; ADAM, A.; PAQUOT, M.; BRANS, A.; JORIS, B.; ARPIGNY, J.- L.; THONART, P. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. **Environmental Microbiology**, v.9, p.1084-1090, 2007.

PARRADO, J.; MILLAN, F.; PINZON I.H.; BAUTISTA, J.; MACHADO, A. Sunflower peptones: use as nitrogen source for the formulation of fermentation media. **Process Biochemistry**, v.28, p.109–13, 1993.

PERONDI, N. L., DA LUZ W. C.; THOMAS, R. Controle microbiológico da giberela do trigo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 21, p. 243-249, 1996.

PRADELLA, J. G. C.; OLIVEIRA, M. S.; URENHA, L. C. Produção de inoculantes agrícolas. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica**, São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, v. 3, p. 279-305, 2001.

RAIJ, B. V.; ANDRADE, J. C.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A. (Ed.) **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Instituto Agronômico, cap.18, p.262-263, 2001.

REGULY, J. C. **Biotecnologia dos Processos Fermentativos**. Vol. 3, Pelotas-RS, Editora e Gráfica Universitária – UFPEL, 2000.

RYU, C. M.; FARAG, M. A.; HU, C. H.; REDDY, M. S.; WEI, H. X.; PARE, P. W.; KLOEPPER, J. W. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American**, v. 100, p. 4927-4932, 2003.

RYU, C. M.; FARAG, M. A.; HU, C.-H.; REDDY, M. S.; KLOEPPER, J. W.; PARE, P. W. Bacterial Volatiles Induce Systemic Resistance in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v.134, p.1017–1026, 2004.

SANTOS, E. R.; GOUVEIA, E. R.; MARIANO, R. L. R.; SOUTO-MAIOR, A. M. Controle biológico da mancha-aquosa do melão por compostos bioativos produzidos por *Bacillus* spp. **Summa Phytopathology**, v. 32, n. 4, p. 376-378, 2006.

SCHALLER, K. D.; FOX, S.L.; BRUHN, D. F.; NOAH, K. S.; BALA, G. A. Characterization of surfactin from *Bacillus subtilis* for application as an agent for enhanced oil recovery. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 113, p. 827-836, 2004.

SCHALLMEY, M.; SINGH, A.; WARD, P. O. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. **Journal of Microbiology**, v. 50, p. 1-17, 2004.

SCHMIDELL, W. Microrganismos e meios de cultura para utilização industrial. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biociencia Industrial: Engenharia Bioquímica**, São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, v. 2, p. 5-18, 2001.

SCHMIDT, F. R. Optimization and scale up of industrial fermentation processes. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 68, p. 425-435, 2005.

SELLA, S. R. B. R. **Desenvolvimento de bioprocesso para a produção de esporos termorresistentes de *Bacillus atrophaeus***. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

SIGMA ALDRICH. <http://www.sigmaaldrich.com>. Acesso em 6 de fevereiro de 2013.

SILVA, A. M. F.; MENEZES, E. F.; SOUZA, E. B.; MELO, N. F.; MARIANO, R. L. R. Sobrevivência de *Xanthomonas Campestris* pv. *Viticola* em tecido infectado de videira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, n. 3, p. 757-765, 2012.

SILVA, C. R. R.; SOUTO, R. F.; MENEGUCCI, J. L. P. Propagação da Bananeira. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 20, n. 196, p.16-20, 1999.

SILVA, F. C. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília- DF: Editora Técnica, cap. 2 e 17, p. 180, 198- 204, 2009.

SILVEIRA, E. B.; GOMES, A. M. A.; FERRAZ, E.; MARANHÃO, E. A. A.; MARIANO, R. L. R. Identificação de progênies de tomateiro resistentes à murcha-bacteriana. **Horticultura Brasileira, Brasília**, v. 17, n. 1, p. 06-10, 1999.

SILVEIRA, E. B.; SOUZA, J. R. B. S.; MARIANO, R. L. R. Efeito de bactérias na promoção de crescimento de plantas de pepino. **Fitopatologia Brasileira, Brasília**, v. 25, p. 302, 2001.

SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E.; HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, v. 2, cap. 13, p.1111, 1986.

SOUZA, A. S.; CORDEIRO, Z. J. M.; TRINDADE, A. V. **Produção de Mudanças**. In: CORDEIRO, Z. J. M. (Org.). Banana. **Produção: aspectos técnicos**. Brasília, DF: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, p. 39-46, 2000.

STANBURY, P.; WHITAKAR, A.; HALL, S. J. **Principles of Fermentation Technology**. Aditya Books, New Delhi, 1997.

STEIN, T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, synthesis and specific functions. **Molecular Microbiology**, v. 56, p. 845-847, 2005.

TING, A. S. Y.; MEON, S.; KADIR, J.; RADU, S.; SINGH, G. Endophytic microorganisms as potential growth promoters of banana. **BioControl**, v. 53, p. 541–553, 2008.

TORTORA, G.; FUNKE, B.; CASE, C. **Microbiologia**. 6 ed. Artmed, São Paulo. cap. 5, p. 159, cap. 6, p.164, 2003.

TRAN, T. T.; MAMO, G.; MATTIASSON, B.; HATTI-KAUL, R. A thermostable phytase from *Bacillus* sp. MD2: cloning, expression and high-level production in *Escherichia coli*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 37, p. 279–287, 2010.

YAO, A.; BOCHOW, H.; KARIMOV, S.; BOTUROV, U.; SANGINBOY, S.; SHARIPOV, A. Effect of FZB 24R *Bacillus subtilis* as a biofertilizer on cotton yields in field tests. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v.39, p.323-328, 2006.

ZHANG, S. A., XU, W. M., YAN, Z. N.; MEI, R. H. Research and commercialization of yield increasing bacteria (YIB) in China. In: TANG, W.; COOK, R. J.; ROVIRA, A. (Eds)

Advances in biological control of plant diseases. Beijing. **China Agricultural University Press**, p. 47-53, 1996.

ZHU, B. F.; XU, Y. A feeding strategy for tetramethylpyrazine production by *Bacillus subtilis* based on the stimulating effect of ammonium phosphate. **Bioprocess and Biosystems Engineering**. v. 33, p. 953–959, 2010a.

ZHU, B. F.; XU, Y. Production of tetramethylpyrazine by batch culture of *Bacillus subtilis* with optimal pH control strategy. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 37, p. 815–821, 2010b.