

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA**

ÍCARO TEÓFILO DE SOUZA

**Produção de *Rhizobium* sp. como inoculante agrícola:
análise da curva de crescimento utilizando o modelo de
Gompertz e determinação da fase exponencial e da
taxa específica de crescimento**

Lorena
2020



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Escola de Engenharia de Lorena – EEL



Trabalho de Conclusão de Curso

**Produção de *Rhizobium* sp. como inoculante agrícola:
análise da curva de crescimento utilizando o modelo de
Gompertz e determinação da fase exponencial e da
taxa específica de crescimento**

Ícaro Teófilo de Souza

Orientador: Prof. Fernando Segato

Trabalho de Conclusão de Curso como
requisito da Disciplina de Trabalho de
Conclusão de Curso II do curso de
Engenharia Bioquímica da Escola de
Engenharia de Lorena da Universidade
de São Paulo

Lorena

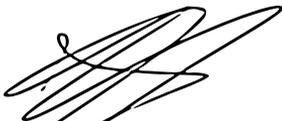
2020

Ícaro Teófilo de Souza

Título: Produção de *Rhizobium* sp. como inoculante agrícola: análise da curva de crescimento utilizando o modelo de Gompertz e determinação da fase exponencial e da taxa específica de crescimento

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Engenheiro Bioquímico.

Versão final do trabalho avaliado pelo professor orientador.



Professor orientador: Fernando Segato



Aluno: Ícaro Teófilo de Souza

RESUMO

A utilização de inoculantes agrícolas em cultivares de feijão tem se mostrado uma maneira eficiente para substituir e diminuir cada vez mais os insumos químicos no meio ambiente. Dentre estes inoculantes, encontra-se a bactéria *Rhizobium tropici*. Neste contexto, aumentar a produtividade do processo de cultivo pode ser uma alternativa de diminuir o tempo de produção e melhorar a qualidade final do produto obtendo-se uma concentração maior de células viáveis. Sendo assim, calcular a velocidade específica de crescimento é fundamental para análises cinéticas, sendo um parâmetro utilizado em otimizações e dimensionamentos de bioprocessos. Utilizar um modelo matemático que consiga representar com precisão os dados experimentais de crescimento se torna essencial para que os parâmetros cinéticos de interesse representem a realidade dos dados. Os dados para a construção das curvas de crescimento foram obtidos em diferentes escalas de cultivo (7, 100, 500 e 1500 L), e os dados de absorvâncias, assim como análises de purezas, pH e microscopia foram realizados a cada 60 min, até que o estado estacionário fosse atingido. O ajuste dos dados foi feito utilizando o modelo de Gompertz através de análises estatísticas e posteriormente determinou-se a fase exponencial de crescimento. Os resultados demonstraram que o modelo de Gompertz ajustou os dados de maneira satisfatória, e a escala que apresentou os melhores parâmetros cinéticos foi a de 100 L.

Palavras-chave: Inoculantes agrícolas; Modelagem; Velocidade específica de crescimento; cultivares de feijão.

Ficha Catalográfica

Souza, Ícaro Teófilo de

Produção de *Rhizobium* sp. Como inoculante agrícola: análise da curva de crescimento utilizando o modelo de Gompertz e determinação da fase exponencial e da taxa específica de crescimento / Ícaro Teófilo de Souza. – Lorena - SP, 2020.

III, 48 f. : il. ; 29 cm.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Bioquímica) Universidade de São Paulo, Campus Lorena-SP, 2020.

Orientador: Prof Fernando Segato

Inclui referências.

1. Bioprocesso. 2. Inoculante agrícola. 3. Curva de crescimento – Juazeiro (BA). I. Título. II. Segato, Fernando. III. Universidade de São Paulo.

SUMÁRIO

RESUMO.....	2
2.1 Agricultura e Biotecnologia	9
2.2 Cultivares de Feijão	9
2.3 Fixação de Nitrogênio	10
2.4 Produção de Inoculantes Agrícolas.....	11
2.5 Rhizobium sp. e Relação de Simbiose.....	13
2.6 Cinética de Crescimento Microbiano.....	14
2.7 Modelagem Matemática de Crescimento Microbiano	16
2.8 Modelo de Gompertz.....	16
4.1. Objetivo geral	18
4.2. Objetivos específicos	18
5.1. Matéria-prima, microrganismo e meio de cultivo.....	19
5.2 Aumento de Escala	21
5.3 Curva de Crescimento	22
5.4 Modelagem Matemática e Análise de Dados.....	23
5.5 Cálculo da taxa específica de crescimento	24
5.6 Determinação das fases de crescimento	24
6.1 Escala Frasco de 7 L	25
6.2 Escala Biorreator de 100 L.....	30
6.3 Escala Biorreator de 500 L.....	35
6.4 Escala Biorreator de 1500 L.....	40
6.5 Comparação entre as escalas.....	44

1. INTRODUÇÃO

A agricultura brasileira enfrenta uma série de problemas causados por fatores relacionados a práticas conservacionistas como o avanço desordenado de fronteiras agrícolas, o baixo aproveitamento de nutrientes e o manejo inadequado de culturas. Isso pode acarretar outros problemas no solo, como o esgotamento de nutrientes. Assim, algumas práticas vêm sendo utilizadas para aumentar a absorção de nutrientes e otimizar a aplicação de insumos. O uso de inoculantes agrícolas tem se mostrado uma alternativa eficiente para diminuir a quantidade de fertilizantes artificiais no solo, além de estimular o crescimento vegetal através da fixação biológica de nitrogênio.

O nitrogênio é um nutriente essencial para a síntese de ácidos nucleicos e proteínas, sendo encontrado abundantemente no ar atmosférico na forma de N_2 , apresentando alta estabilidade devido à sua tripla ligação, o que impossibilita sua fixação pela maioria dos seres vivos. No entanto, os microrganismos, dentre estes, as bactérias do gênero *Rhizobium* são capazes de captar o N_2 atmosférico e transforma-lo em amônia, composto que consegue ser absorvido pelas plantas. Essas bactérias vivem em interações de mutualismo em nódulos nas raízes, principalmente de leguminosas, deste modo, elas fixam o nitrogênio atmosférico e fornecem para a planta, em troca de abrigo e compostos orgânicos provindos da fotossíntese. Nesse contexto, os inoculantes agrícolas são insumos que visam otimizar a concentração das bactérias fixadoras de nitrogênio nas raízes de determinadas culturas e assim aumentar a sua produtividade.

Os cultivares de feijão são um dos mais beneficiados pelas bactérias fixadoras de nitrogênio. O uso de inoculantes nas sementes aumenta a produtividade dos feijoeiros pelo aumento da disponibilidade de nitrogênio. Isso é importante pois o Brasil ainda não é autossuficiente na produção de feijão, um dos alimentos base da dieta brasileira, sendo necessária sua importação.

A produção industrial de inoculantes foi iniciada no Brasil desde a segunda metade do século XX. Um dos problemas enfrentados por este setor está relacionado com a dificuldade de padronização e controle dos processos de produção, uma vez que existem diversos fatores que afetam o crescimento das bactérias em reatores. Assim, o presente trabalho pretende utilizar de um modelo

matemático já existente para a analisar a curva de crescimento e a partir dos dados ajustados, determinar fases de crescimento e a taxa específica de crescimento.

Este trabalho é apresentado como o Trabalho de Conclusão do Curso de Engenharia Bioquímica da Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo (EEL-USP) e apresenta aplicações de modelagem e otimização de parâmetros cinéticos de bioprocessos, além da construção de curvas de crescimento bacteriano, temas pertinentes ao curso. Os experimentos e a curva de crescimento de *Rhizobium sp* foram realizados na empresa Stoller do Brasil com as devidas autorizações.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Agricultura e Biotecnologia

A Biotecnologia é a prática de utilizar materiais biológicos, como seres vivos ou parte deles, para fins produtivos e econômicos. Partindo desse conceito e devido às vantagens apresentadas, várias áreas econômicas já aderem práticas biotecnológicas como alternativas de produção. Nesse contexto, a agricultura utiliza dessas técnicas em ampla escala desde o começo do século XX, como a fixação biológica de nitrogênio, o controle biológico de pragas, a cultura de tecidos vegetais e de uma maneira mais moderna, o uso de organismos geneticamente modificados (Silveira et al., 2005).

2.2 Cultivares de Feijão

Sendo um dos principais produtos agrícolas consumidos no Brasil, o feijão tem sido amplamente explorado devido a sua importância, uma vez que é um dos alimentos indispensáveis como fonte de proteína na alimentação básica do brasileiro, além de ter grande impacto na economia de pequenos produtores e na agricultura familiar. O Brasil é o terceiro maior produtor de feijão em parâmetros mundiais, ficando atrás apenas de Myanmar (antiga Birmânia) e da Índia. Sua produção se estende por todo território nacional, e as colheitas são realizadas em três safras distintas (CONAB, 2018). A cultura do feijão encontra forte resistência no mercado internacional devido às diferenças alimentares entre os diversos países, sendo um alimento bastante consumido em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, dificultando a exportação para países desenvolvidos. Mesmo assim, o Brasil não é autossuficiente na produção de feijão, tendo que importar para suprir a demanda nacional (Tabela 1) (CONAB, 2018). Os esforços de pesquisa e desenvolvimento tem focado principalmente no aumento da produtividade a fim de diminuir as importações e focar no mercado interno.

Tabela 1. Suprimento de feijão no Brasil entre 2009 e 2018.

Quadro de Suprimentos Brasil - Feijão Comum cores, Preto e Caupi (em mil toneladas)							
Ano/Safra	Estoque inicial	Produção Anual	Importação	Suprimento	Consumo Aparente	Exportação	Estoque de Passagem
2009/10	317,7	3322,5	181,2	3821,4	3450,00	4,50	366,9
2010/11	366,9	3732,8	207,1	4306,8	3600,00	20,4	686,4
2011/12	686,4	2918,4	312,3	3917,1	3500,00	43,3	373,8
2012/13	373,8	2806,3	304,4	3484,5	3320,00	35,3	129,2
1013/14	129,2	3453,7	135,9	3718,8	3350,00	65,0	303,8
2014/15	303,8	3210,2	156,7	3670,7	3350,00	122,6	198,1
2015/16	198,1	2512,9	325,0	3036,0	2800,00	50,0	186,0
2016/17	186,0	3399,5	137,6	3723,1	3300,00	120,5	302,6
2017/18	302,6	3308,0	120,0	3730,6	3300,00	120,0	310,6

Fonte: CONAB, 2018.

Os valores apresentados na Tabela 1 mostram que mesmo com um aumento na tendência de exportação nos últimos anos, o mercado externo tem pouca significância para os cultivos de feijão. Além disso, por ser um cultivo bastante sensível às condições climáticas, torna-se um produto com o preço volatilizado no varejo, representando um mercado dinâmico e por isso, os valores flutuam consideravelmente de um ano para o outro (CONAB, 2018).

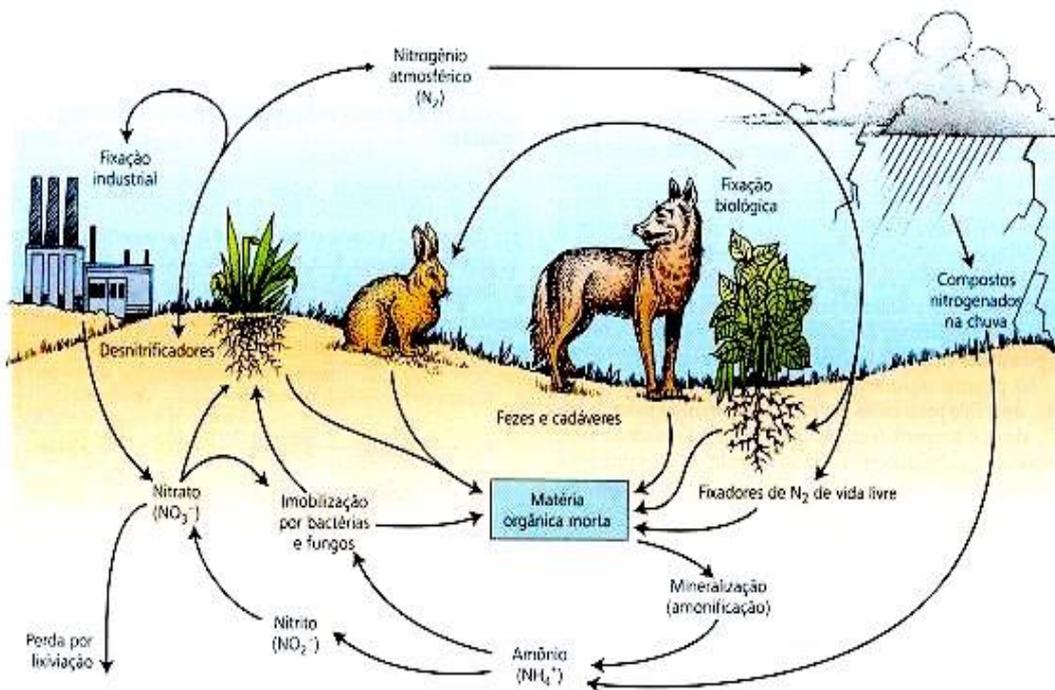
2.3 Fixação de Nitrogênio

O nitrogênio é um dos nutrientes mais importantes para o desenvolvimento vegetal, sendo constituinte essencial de aminoácidos, proteínas, hormônios, bases nitrogenadas, ácidos nucleicos, clorofila, entre outras moléculas. A maior parte do nitrogênio se encontra na atmosfera de maneira altamente estável na forma de N_2 , porém, alguns organismos eucariotos, como as plantas conseguem assimilar o nitrogênio apenas em formas iônicas como nitratos (NO_3^-) e amônio (NH_4^+). Assim, o processo de disponibilizar nitrogênio em formas iônicas para as plantas ao quebrar a ligação tripla do N_2 é chamado de fixação de nitrogênio, e pode ocorrer de maneira espontânea, industrial ou biológica (SILVA SANTOS et al, 2008).

A maneira industrial é através da reação química de Haber-Bosch, utilizando combustíveis fósseis como fonte de energia, além de condições elevadas de temperatura e pressão. O processo espontâneo ocorre de maneira

natural e utiliza a energia de relâmpagos na quebra da ligação tripla. Já, a fixação biológica acontece quando microrganismos quebram a ligação tripla através de um sistema enzimático complexo em condições ambientes de temperatura e pressão (SILVA SANTOS et al, 2008). O esquema de fixação biológica está representado abaixo na Figura 1.

Figura 1 – Ciclo do Nitrogênio.



Fonte: Associação Nacional dos Produtores e Importadores de Inoculantes (ANPII).

2.4 Produção de Inoculantes Agrícolas

Inoculantes são produtos que utilizam microrganismos vivos capazes de estimular, direta ou indiretamente, o desenvolvimento vegetal. Assim, os inoculantes contém microrganismos capazes de fixar o nitrogênio atmosférico e disponibiliza-lo na forma iônica para as plantas. Das várias características que um inoculante deve apresentar, algumas podem ser consideradas essenciais, como o elevado número de células no produto, o estado ótimo fisiológico das células, a quantidade de células por semente e a viabilidade celular, que está relacionada com a validade do produto. Quanto a aplicação, os inoculantes são

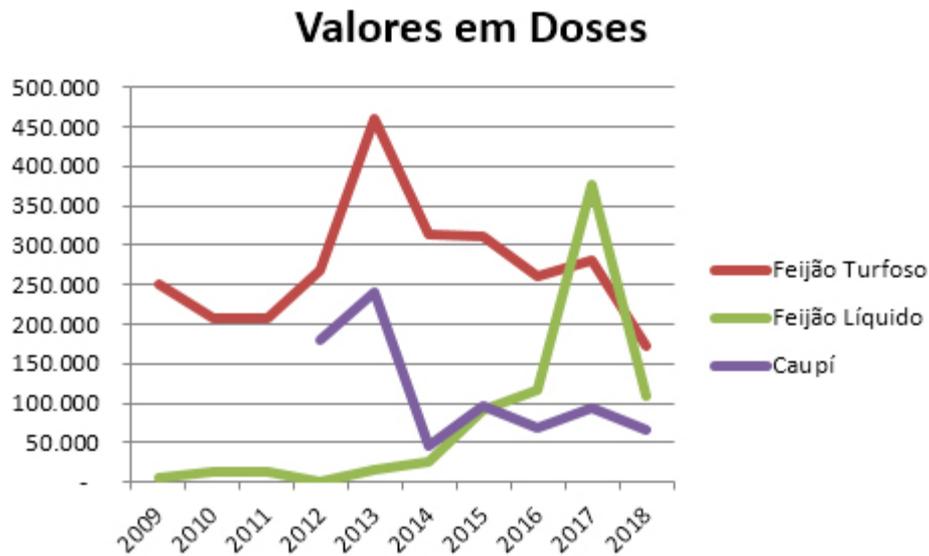
misturados diretamente na semente com o auxílio de um suporte e podem se apresentar em forma líquida ou sólida (REIS, 2007).

A qualidade dos inoculantes tem avançado consideravelmente nos últimos anos, sendo um insumo cada vez mais requerido para o aumento da produtividade nas lavouras. Os primeiros inoculantes fabricados no Brasil não seguiam nenhum padrão de qualidade no quesito de quantidade de células por produto, porém, no final dos anos 80, o Ministério da Agricultura passou a estabelecer uma legislação que padronizou a quantidade mínima de 1×10^9 células/g ou ml do produto, além de exigir equipamentos mínimos de produção e a esterilidade da turfa no caso de inoculantes sólidos (ANPIL). Atualmente, o Ministério da Agricultura atua na fiscalização da produção e comercialização de inoculantes e novas legislações foram aprovadas no decorrer dos anos, como a padronização em embalagens, rótulos, especificações, registros e garantias, bem como o controle dos microrganismos selecionados para a produção (MAPA).

Alguns fatores de sucesso do uso de inoculantes estão relacionados à aplicação de células viáveis e manutenção adequada dos experimentos. As células devem ser utilizadas durante a fase exponencial de crescimento e não na fase estacionária (BASHAN & HOLGUIN, 1997).

No contexto dos cultivos de feijão, a produção de inoculantes agrícolas tem o desafio de aumentar a produtividade para que esta atenda à demanda nacional e o Brasil torne-se autossuficiente com relação a este produto. Entretanto, como mostrado na Figura 2, já é perceptível o aumento da produção nos últimos anos, principalmente com relação aos inoculantes de base líquida. Isso se deve à preocupação crescente a questões ambientais e a gradativa tentativa de substituir os insumos químicos pelos biológicos (ANPIL). O mercado de inoculantes utilizados na produção de feijão também é bastante flexível devido à sensibilidade que o cultivo apresenta em relação as condições climáticas, causando flutuação nos preços do produto.

Figura 2 – Valores em doses de inoculantes para feijão comum e feijão caupí comercializados no período de 2009 a 2018. O gráfico também compara a comercialização de inoculantes para feijão comum em base sólida (turfa) e em base líquida.

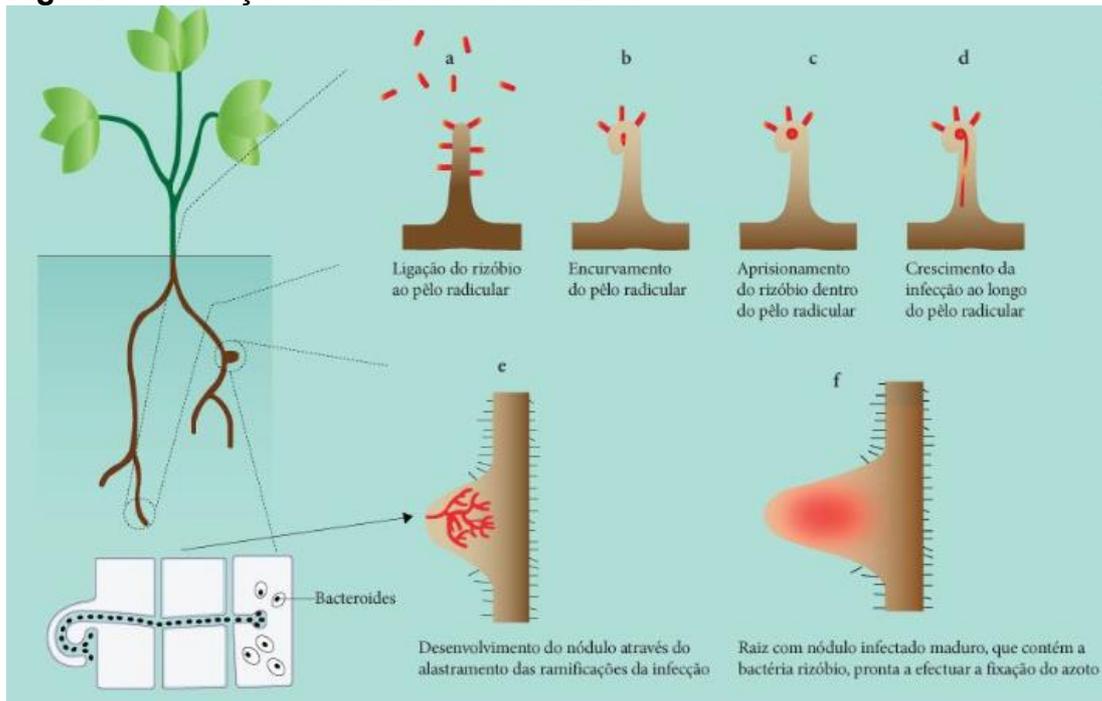


Fonte: ANPII

2.5 *Rhizobium sp.* e Relação de Simbiose

Bactérias do gênero *Rhizobium sp.* desenvolvem relações harmônicas de simbiose mutualística com feijoeiros. Estes microrganismos infectam as raízes e estimulam a formação de nódulos radiculares, onde é produzido o complexo enzimático responsável pela fixação do nitrogênio atmosférico, disponibilizando-o para a planta. Em contrapartida, a planta oferece nutrientes para que as bactérias possam sobreviver (HUNGRIA et al., 1997). Um esquema simplificado de como ocorre a infecção dos rizóbios nas áreas radiculares é mostrado na Figura 3.

Figura 3 – Infecção dos rizóbios nas raízes.

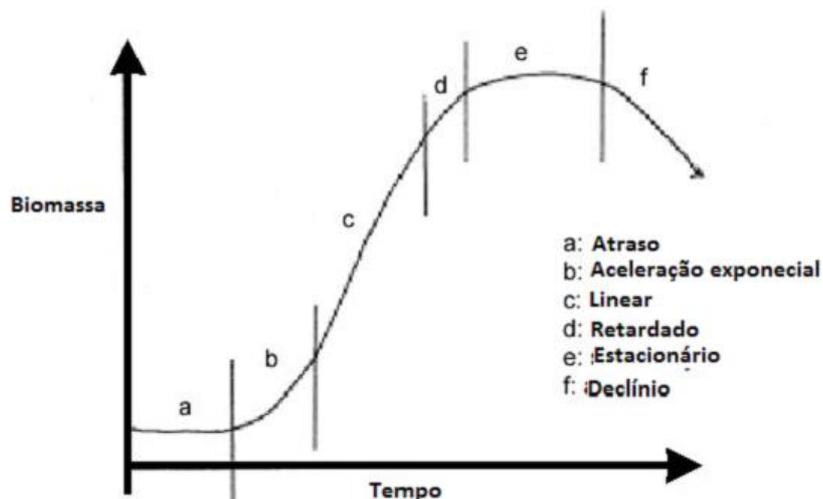


Fonte: <http://www.agronegocios.eu/noticias/importancia-da-inoculacao-com-bacterias-rhizobium-e-bradyrhizobium-na-producao-de-leguminosas-e-o-uso-do-azoto/>

2.6 Cinética de Crescimento Microbiano

Após a inoculação nos biorreatores, o crescimento microbiano segue um comportamento nos valores de concentração celular quando condições de temperatura, pH, agitação e aeração são mantidas sob controle (SCHMIDELL et al., 2001). A Figura 4 mostra esse comportamento e as diferentes fases de crescimento.

Figura 4 – Curva de crescimento microbiano.



A fase *a* é conhecida como *lag* ou de latência, que se segue logo após a inoculação. É uma fase onde o microrganismo se adapta ao meio de cultura, não havendo crescimento celular, logo, a velocidade de crescimento é zero (SCHMIDELL et al., 2001). GADEN (1955), definiu a velocidade específica de crescimento microbiano como a taxa de variação da concentração de células no decorrer do tempo, e é específica, pois depende de cada tipo de organismo, representada pela Equação 1, onde μ_x é a taxa específica de crescimento e X a concentração celular.

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

A fase *b* representa a transição entre a fase *lag* e a fase logarítmica, quando as células começam a se multiplicar, aumentando a taxa de crescimento. A fase *c* representa a fase logarítmica, com a velocidade específica de crescimento é máxima e constante, e assim é possível concluir que a nessa etapa a velocidade de crescimento é diretamente proporcional à concentração X , e pode ser definida pela Equação 1 integrada entre o início da fase log e um instante t arbitrário, como mostra a Equação 2, onde X representa a concentração celular, X_i é a concentração inicial, t_i é o tempo inicial da fase log e μ_m é a taxa de crescimento específica máxima (SCHMIDELL et al., 2001).

$$X = X_i e^{\mu_m(t-t_i)} \quad (2)$$

A fase *d* representa uma fase de declínio da taxa de crescimento por causa do esgotamento de nutrientes no meio de cultura e pelo acúmulo de metabólitos secundários que podem inibir o crescimento. A fase *e* representa a fase estacionária, onde X atinge o valor máximo e constante, e as velocidades de crescimento e de morte celular se balanceiam. Na fase *f*, a velocidade de morte excede a velocidade de crescimento, e há o declínio na curva de crescimento (SCHMIDELL et al., 2001).

2.7 Modelagem Matemática de Crescimento Microbiano

O processo de modelagem depende de técnicas de regressão e de uma metodologia de análise de regressão, como variância, desvio padrão, coeficiente de correlação ou erros. Os modelos são considerados cinéticos quando relacionam o comportamento da população microbiana com o tempo, avaliando critérios como duração da fase *lag*, velocidade de crescimento e fase estacionária (WHITING, 1995). Os modelos primários são puramente cinéticos e relacionam a concentração celular com o tempo. São úteis para a determinação de UFC/ml, a influência da concentração de substrato e de formação de metabólitos secundários e parâmetros cinéticos de crescimento. O modelo de Gompertz será utilizado para ajudar os dados da curva de crescimento. Ele foi escolhido por apresentar parâmetros como assíntota e velocidade de crescimento, e é um modelo que não evidencia a fase *lag*, sendo útil para dinâmicas de crescimento rápido (THORNLEY; FRANCE, 2007).

2.8 Modelo de Gompertz

O modelo de Gompertz é um dos mais utilizados em dinâmicas populacionais. Foi introduzido por GIBSON e colaboradores em 1987, quando comparou o modelo com a equação logística. É representado pela Equação 3 (ERKMEN & ALBEN, 2002).

$$y = a \cdot e^{-e^{(b-c.t)}} \quad (3)$$

Em que y é a variável dependente e representa $\log(N/N_0)$, ou seja, a densidade da população no decorrer do tempo. O parâmetro a é a assíntota do modelo, e indica o valor de estabilidade da variável dependente em relação ao tempo. O parâmetro b é um fator de integração que ajusta os valores iniciais ao ponto de inflexão. Já, o parâmetro c é uma função entre a taxa de crescimento e o valor máximo de concentração celular, quanto maior o valor de c , mais rápido é o crescimento do microrganismo para alcançar o valor assintótico (a) (MAZUCHELI et al., 2011).

Esse modelo foi desenvolvido pelo matemático inglês Benjamin Gompertz para o cálculo de taxas de mortalidade em seres humanos (GOMPERTZ, 1885). Winson (1932) foi um dos primeiros a propor o uso desse modelo em ciência animal, introduzindo alguns de seus usos e limitações. Ele comenta que se pode esperar um bom ajuste em curvas de crescimento que apresentam ponto de inflexão em sua parte inicial de aproximadamente 35 a 40% do crescimento total.

A função de Gompertz descreve o comportamento sigmoidal suave para o crescimento de populações, sendo que a eficiência do crescimento decai de acordo com o tempo. Ela indica um crescimento mais rápido no início, entretanto, uma aproximação mais lenta para a assíntota, diferente do modelo logístico. Por esse motivo, é utilizado sistemas de crescimento rápido (THORNLEY; FRANCE, 2007).

Em 1990, Zwietering e colaboradores modificaram o modelo de Gompertz para que os parâmetros de interesse fossem representados diretamente no modelo, além disso, essa nova adaptação representa com mais clareza a duração da fase *lag* e é representado pela Equação 4, $W(t)$ é o $\log(N/N_0)$, A é o parâmetro referente à concentração máxima de suporte do meio, K_z é a taxa absoluta de crescimento (μ) e T_{Lag} é a duração da fase *lag* (λ). Esse modelo foi proposto para melhor visualização da fase *lag*, sendo bastante utilizado na indústria de alimentos para verificar a validade (*shelflife*) dos produtos.

$$W(t) = A \exp\left(-\exp\left(\frac{e \cdot K_z}{A} (T_{Lag} - t) + 1\right)\right). \quad (4)$$

3. JUSTIFICATIVA

Dentre os diversos campos de aplicação do curso de engenharia bioquímica, a modelagem de bioprocessos na indústria se apresenta como sendo de grande interesse e algo pertinente de se analisar. Ao se utilizar um modelo matemático que melhor descreve uma curva de crescimento bacteriano, é possível determinar parâmetros cinéticos importantes para análises de processos como taxa específica de crescimento, duração da fase *lag*,

capacidade de população máxima que o meio de cultura suporta, entre outros, parâmetros esses que podem ser utilizados para análises de controle e otimização de processos. Caso o modelo ajuste bem os dados apresentando um erro pequeno, é possível simular e prever o processo em diferentes condições, além de contribuir para a apresentação de resultados mais confiáveis. Vários desses parâmetros podem ser utilizados como padrões para aumentar o tempo útil de prateleira de produtos, redução no tempo de produção, aumento da produtividade em relação à concentração celular/ml de produto e várias outras aplicações pertinentes.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Analisar o modelo matemático de Gompertz para ajustar a curva de crescimento da bactéria *Rhizobium sp.* em diferentes volumes de produção para o cálculo da taxa específica de crescimento e determinação das fases de crescimento.

4.2. Objetivos específicos

- Realizar experimentos de crescimento bacteriano utilizando uma medida indireta de concentração celular como absorvância em biorreatores de diferentes volumes;
- Ajustar os valores de concentração celular pelo tempo utilizando o modelo de crescimento de Gompertz;
- Calcular a taxa específica de crescimento tendo como base a definição teórica de μ_x utilizando os dados ajustados;
- Determinar as fases cinéticas de crescimento do microrganismo.

5. MATERIAL E MÉTODOS

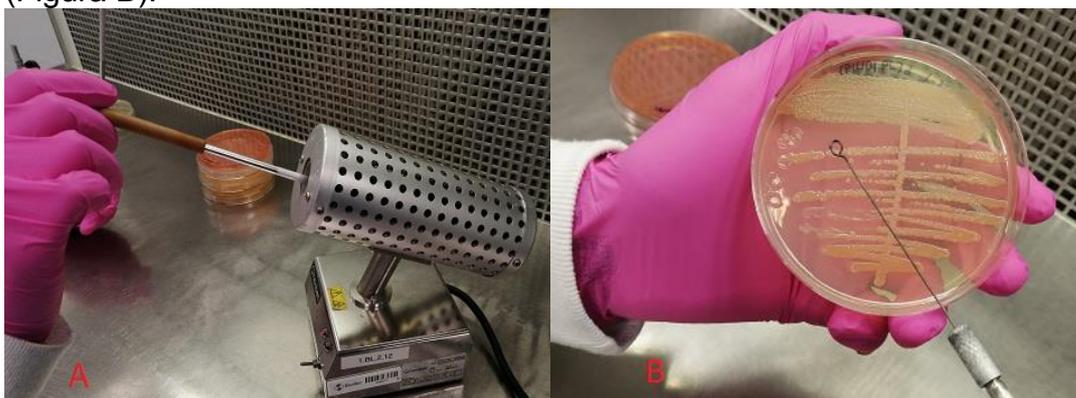
Os experimentos realizados para o desenvolvimento deste trabalho foram executados na empresa Stoller do Brasil com as devidas autorizações do Coordenador de Engenharia Filipe Galvão e a Coordenadora de Produção Daniela Scarabel. As curvas de crescimento foram realizadas em frascos de vidro de 7 L e biorreatores de 100, 500 e 1500 L.

5.1. Matéria-prima, microrganismo e meio de cultivo

A matéria-prima utilizada para o preparo dos meios de cultura e a linhagem SEMIA 4080 da bactéria *R. tropici* foram fornecidas pela empresa Stoller do Brasil. A formulação do meio de cultura não pode ser divulgada por se tratar de uma formulação da empresa e configura como segredo industrial. Porém, o meio utilizado é bastante fiel às condições de literatura, tendo em sua composição fontes de carbono, fontes de nitrogênio, sais minerais, vitaminas, entre outros componentes essenciais para o crescimento microbiano. A linhagem foi mantida em um tubo de ensaio contendo meio de cultura sólido, e foi repicada em placas de Petri contendo o mesmo meio de cultura pela técnica de estriamento. O tempo de crescimento da bactéria em meio sólido é de 72 horas em uma estufa com a temperatura controlada em 30 °C. Após esse período de incubação, uma colônia foi retirada da placa de Petri e inoculada em um Erlenmeyer contendo 200 ml de meio de cultura, onde permaneceu sob agitação de 150 rpm por 48 h. Os ensaios foram realizados em ambiente estéril para evitar contaminações. Os testes foram realizados junto com a produção normal da fábrica, sendo a disponibilidade da utilização dos biorreatores acordada com a gestão.

As manipulações do material biológico em escala laboratorial foram realizadas com o auxílio e uma alça de níquel-cromo esterilizada em um esterilizador de temperatura à 800 °C. Foram feitos estriamentos em três diferentes placas de Petri para garantir a obtenção de amostras viáveis. As placas foram incubadas em estufas por 72 h à 30 °C para garantir condições ótimas de crescimento. A Figura 5 mostra as etapas de esterilização da alça e a coleta do material biológico.

Figura 5 – Esterilização da alça (Figura A) e coleta do material biológico (Figura B).



Fonte: Autoria própria.

As bactérias foram inoculadas em frasco de vidro 7 L e também foram incubados na sala aquecida a 32 °C com uma fonte de ar estéril comprimido à vazão de 5 L/min por 48 h. Todos os meios e materiais na escala de laboratório foram esterilizados em autoclave por 20 minutos, a 121°C e 1 atm para eliminar contaminações, além disso, todas as manipulações do material biológico foram feitas em câmaras de fluxo laminar com cuidado e treinamento para evitar contaminações. A linha de ar comprimido também conta com filtros microbiológicos. A Figura 6 explicita as etapas em Erlenmeyer e balão volumétrico, sendo consideradas etapas laboratoriais.

Figura 6 – Inoculação do material biológico no meio líquido em Erlenmeyer (Figura A) e frasco de vidro inoculado aerando (Figura B), a mangueira na figura é a conexão com a linha de ar estéril comprimido.



Fonte: Aatoria própria.

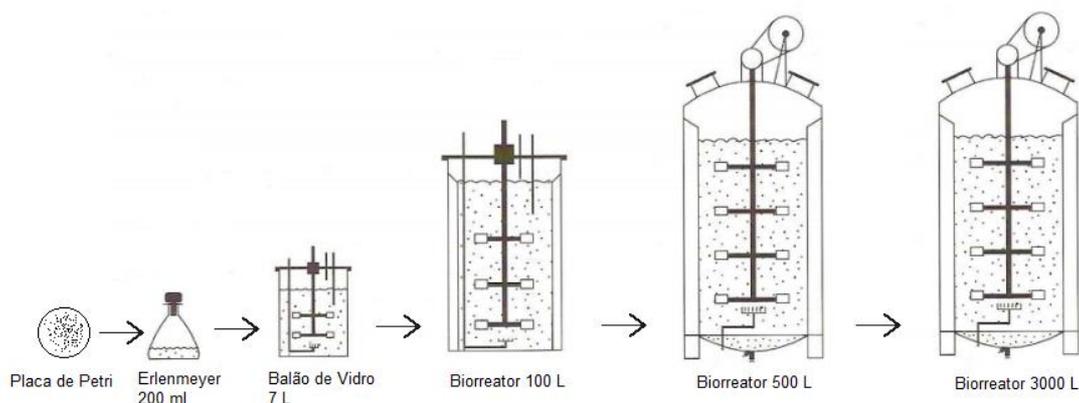
As etapas em tanques de 100, 500 e 1500 L foram manipuladas pelos operadores de produção. As matérias primas do meio de cultura foram pesadas e preparadas em cada tanque. A esterilização do meio de cultura em escala industrial foi realizada com vapor de caldeira à 121 °C por 30 min, respeitando a curva de aquecimento e resfriamento da esterilização. Os dados de temperatura foram monitorados por termopar. Após a esterilização do meio, o tanque de 100 L recebeu o pré-inóculo contido no frasco de 7 L e a transferência foi feita por bombas peristálticas em condições assépticas, iniciando o experimento na escala industrial. A transferência entre tanques foi feita com mangueiras previamente esterilizadas com vapor e a inoculação só é feita quando terminado o crescimento do microrganismo na escala anterior.

5.2 Aumento de Escala

O crescimento bacteriano foi realizado em quatro escalas diferentes: em frasco de vidro de 7 L e em biorreatores de 100, 500 e 1500 L. A curva no frasco de 7 L foi realizada após ser inoculado com o Erlenmeyer de 200 ml. A curva no biorreator de 100 L foi feita após as etapas em Erlenmeyer e frasco. E assim sucessivamente, sendo que a curva no biorreator de 1500 L foi feita após o preparo do pré-inóculo até o volume de 500 L. Além disso, os experimentos em todas as escalas repetiram os tempo de incubação do inóculo para garantir uma padronização. O esquema do aumento de escala é ilustrado na Figura 7, e as ilustrações não representam as dimensões e as condições dos biorreatores utilizados, que não podem ser divulgadas para fins de segredo industrial, porém, são úteis para a representação de como é feito o escalonamento.

Os cultivos em Erlenmeyers são agitados em mesas magnéticas e os em frascos de vidro são agitados por aeração. Já, os biorreatores são aerados e agitados por um impelidor. O reator utilizado na escala de 1500 L possui capacidade total de 3000 L, porém o volume útil utilizado foi de 1500 L. Já, nas escalas anteriores, o volume útil final do tanque é o mesmo que o volume do biorreator.

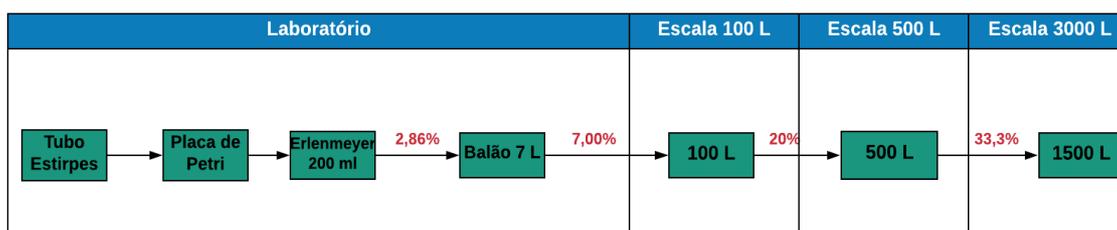
Figura 7 – Aumento de escala.



Fonte: Autoria própria.

É importante ressaltar que de uma escala para outra a proporção varia devido aos diferentes volumes de inoculo, porém, a proporção não varia de um experimento para o outro. Foram coletadas duas amostras de cada ponto da curva para análises estatísticas de média e desvio padrão. A Figura 8 mostra o esquema de aumento de escala evidenciando a porcentagem de inoculo entre as diferentes etapas.

Figura 8 – Aumento de escala explicitando as proporções de inoculo entre as etapas.



Fonte: Autoria própria.

5.3 Curva de Crescimento

As curvas de crescimento foram feitas coletando-se amostra do frasco de vidro e dos biorreatores a cada 60 min a partir da inoculação, para análises de pureza (verificar se não há a presença de nenhuma bactéria contaminante no cultivo), absorbância e pH. As amostras foram coletadas até que a variação de

absorbância entre as amostras não ocorresse mais, equivalendo-se à fase estacionária. As análises de pureza foram feitas através do estriamento de caldo em placas contendo meio sólido TSA em fluxo laminar e foram feitas para verificar se não havia qualquer tipo de contaminação no experimento. A absorbância foi analisada em um espectrofotômetro em um comprimento de onda de 526 nm e o pH foi analisado em pHmetro. Os gráficos das curvas de crescimento foram plotados em softwares como Excel e Minitab, levando em conta os valores de absorbância no decorrer do tempo. Além disso, purezas e análises de concentração celular foram feitas em cada etapa de inoculação para garantir a qualidade do experimento.

5.4 Modelagem Matemática e Análise de Dados

Os dados de absorbância, pH e tempo foram plotados no Excel. Primeiramente, foi calculado o $y = \log(N/N_0)$ já que o modelo de Gompertz (Equação 3) analisa diretamente o y . Com isso, os dados foram inseridos no programa estatístico Minitab para o ajuste não linear. Os valores de cada parâmetro foram feitos por suposições e observação de cada experimento, e o programa auxilia na determinação do valor inicial. No caso das curvas de crescimento, o valor inicial do parâmetro a foi definido como 2, valor observado que os experimentos apresentaram de absorbância na fase estacionária. Os valores dos parâmetros iniciais foram determinados com a observação da curva de crescimento feita com os valores experimentais e no Minitab são expressos em uma outra nomenclatura, Theta1 equivale ao parâmetro a , referente à capacidade máxima de suporte do meio, Theta2 é referente ao parâmetro b que está relacionado com o ponto de inflexão e por fim, Theta3 é associado ao parâmetro c referente à taxa de crescimento, lembrando que os parâmetros estimados são para o ajuste dos valores de y . O Minitab ajustou os parâmetros para cada curva através do método dos mínimos quadrados, expressando a equação do modelo para cada situação. O valor de absorbância foi utilizado para as análises indiretas de concentração celular, já que na indústria é necessária uma tomada rápida de decisão, a qual é feita levando em conta o valor da absorbância.

Com a expressão ajustada, foi possível simular dados a cada 60 min para os valores de y para prever o crescimento da bactéria. Além disso, foi feita a conversão de y em concentração celular indireta usando a expressão de definição de y [$y = \log (N/N_0)$], e assim, foi possível encontrar os valores de densidade óptica simulada em cada tempo.

A modelagem foi analisada utilizando o valor de S (soma dos erros quadrados) oferecido pelo ajuste de dados não lineares no Minitab. Quanto menor S , menor a soma dos erros de todos os pontos experimentais, quando comparados com os pontos do modelo. Assim, um valor baixo de S indica que o modelo se ajustou bem os dados.

5.5 Cálculo da taxa específica de crescimento

Após a modelagem e simulação dos dados, calculou-se a velocidade de crescimento utilizando a definição de GADEN mencionada na literatura através da Equação 1 (GADEN, 1955), sendo possível analisar o comportamento cinético de crescimento. A velocidade específica máxima de crescimento foi obtida pelo maior valor de μ_x . Um gráfico de taxa de crescimento foi plotado no Excel e o valor de dX/dt foi calculado utilizando o programa Scilab com o comando `splin (t,X)`.

5.6 Determinação das fases de crescimento

A determinação das fases de crescimento foi feita através da análise de cada um dos gráficos de crescimento bacteriano. A fase exponencial foi determinada linearizando a Equação 2 e verificando em qual intervalo de tempo é possível obter o maior valor de coeficiente de correlação linear (R^2), já que a fase exponencial consiste no período onde o crescimento é linear, máximo e constante.

6. RESULTADOS

Os resultados demonstram as análises de dados obtidos de cada escala de maneira independente. Estes dados estão apresentados em tabelas, seguindo das discussões sobre a modelagem matemática, os cálculos e gráficos da curva de crescimento e taxa específica de crescimento. Vale ressaltar, que os resultados das purezas de todas as amostras coletadas não apresentaram a interferência de nenhum contaminante em todos os testes.

6.1 Escala Frasco de 7 L

Os resultados do experimento na escala de 7 L estão apresentados na Tabela 2.

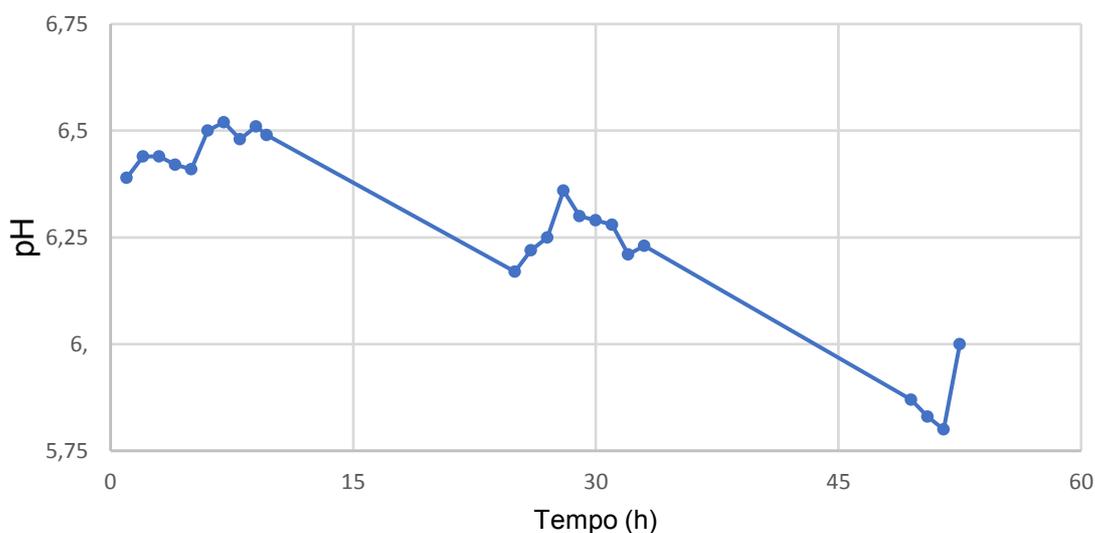
Tabela 2: Curva de crescimento escala de 7 L

Tempo (h)	Absorbância (540 nm)			pH	y
	1	2	Média		
1,0	0,256	0,248	0,252	6,39	0,0000
2,0	0,261	0,257	0,259	6,44	0,0119
3,0	0,294	0,292	0,293	6,44	0,0655
4,0	0,317	0,315	0,316	6,42	0,0983
5,0	0,336	0,333	0,335	6,41	0,1230
6,0	0,362	0,365	0,364	6,50	0,1591
7,0	0,390	0,398	0,394	6,52	0,1941
8,0	0,510	0,514	0,512	6,48	0,3079
9,0	0,548	0,543	0,546	6,51	0,3354
9,7	0,616	0,621	0,619	6,49	0,3899
25,0	1,423	1,425	1,424	6,17	0,7521
26,0	1,440	1,452	1,446	6,22	0,7588
27,0	1,455	1,462	1,459	6,25	0,7625
28,0	1,470	1,473	1,472	6,36	0,7664
29,0	1,485	1,490	1,488	6,30	0,7711
30,0	1,502	1,509	1,506	6,29	0,7763
31,0	1,517	1,519	1,518	6,28	0,7799
32,0	1,521	1,526	1,524	6,21	0,7814

33,0	1,546	1,547	1,547	6,23	0,7879
49,5	1,657	1,656	1,657	5,87	0,8178
50,5	1,652	1,652	1,652	5,83	0,8166
51,5	1,657	1,658	1,658	5,80	0,8181
52,5	1,665	1,663	1,664	6,00	0,8198

Na Tabela 2, estão os resultados da obtidos pela medida da absorbância de duas amostras no mesmo ponto. Nota-se que os pontos foram coletados a cada 60 min, aproximadamente. Além disso, foi possível perceber que o pH apresentou uma tendência de acidificação no decorrer do tempo como mostrado na Figura 9.

Figura 9 – Variação do pH em relação ao tempo obtido na escala de 7 L



Fonte: Autoria própria.

Até o tempo de incubação de 10 h, o valor de pH tendeu a um ligeiro aumento (6.4 a 6.5), porém depois a tendência geral foi que ocorresse a acidificação do meio. Não houve um controle automático de pH no frasco, logo foi difícil visualizar a real interferência dessa variação no crescimento celular.

Os valores de y ($y = \log(N/N_0)$) foram mostrados na Tabela 2, isso porque o modelo matemático de Gompertz faz o ajuste dos dados para os valores y , e posteriormente foi feita a conversão de y para absorvância utilizando a mesma expressão.

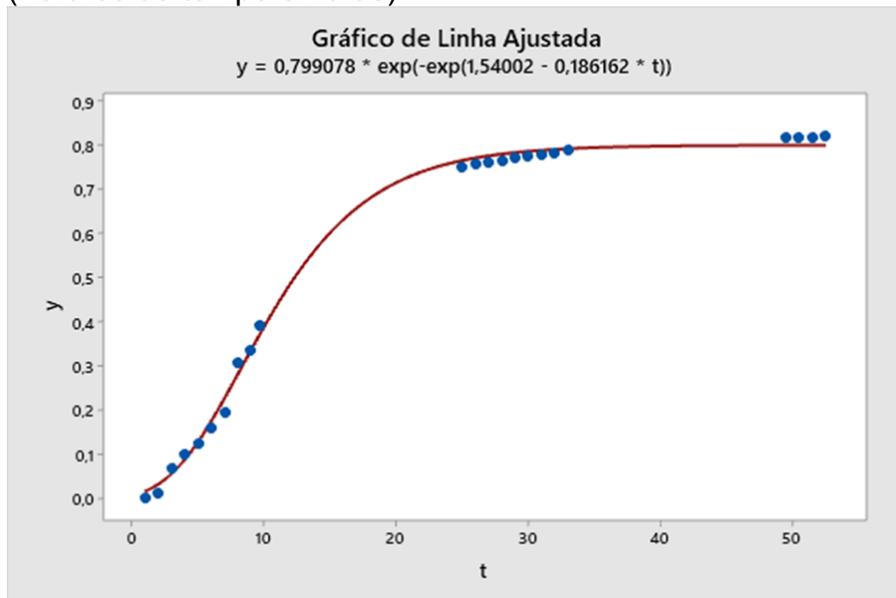
Após a modelagem matemática no Minitab foi possível ajustar os parâmetros e comparar com os valores iniciais, além da análise do erro da modelagem. Esses valores são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Parâmetros iniciais e ajustados escala 7 L.

	Parâmetros	
	Valores Iniciais	Estimativas
Theta1	0,8	0,79908
Theta2	1	1,54002
Theta3	0,1	0,18616
S (Erro)	0,0170066	

Os valores para o modelo de Gompertz foram utilizados para o ajuste dos dados de y , e foi possível perceber que os valores iniciais foram condizentes com os valores estimados, além disso o valor de S foi consideravelmente baixo, levando a conclusão que o modelo ajustou bem os dados como mostrado na Figura 11 fornecida pelo Minitab, onde foi possível comparar os valores reais e os ajustados, bem como a visualização da expressão já ajustada.

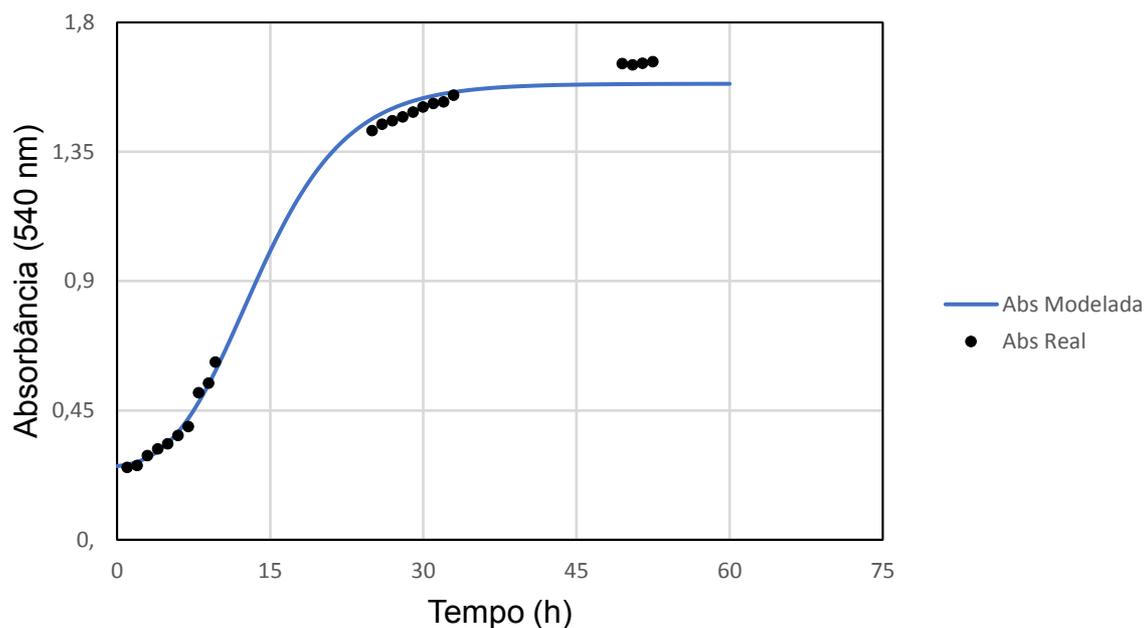
Figura 11 – Valores de y ajustados e expressão estimada (Valores de tempo e horas)



Fonte: Autoria própria.

O ajuste da expressão apresentado na Figura 11, permitiu simular valores as quais as leituras não foram possíveis de serem feitas. Isso aconteceu pois, durante o período noturno, não havia analista em horário de trabalho para a realização das análises, e com a modelagem é possível fazer a simulação desses dados de uma em uma hora até 60 horas para o cálculo de y a foi feita a conversão para absorvância e construída a curva de crescimento com os dados simulados, como apresenta a Figura 12.

Figura 12 – Curva de crescimento escala de 7 L.



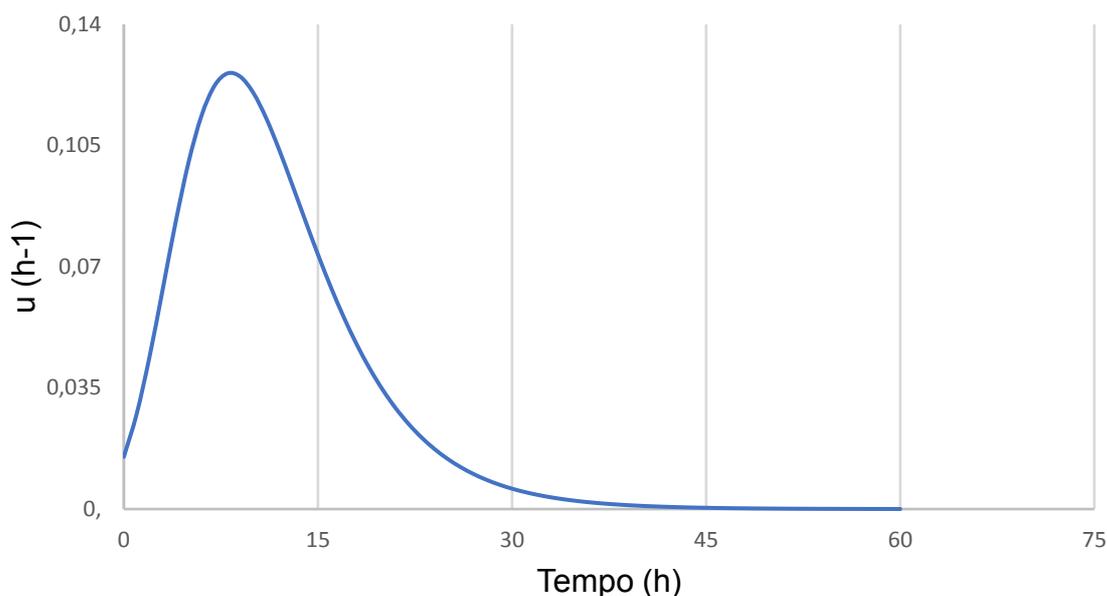
Fonte: Autoria própria.

Com o gráfico apresentado na Figura 12 demonstrou que o modelo de Gompertz foi útil para o ajuste dos dados de absorbância, porém é possível que o erro tenha sido influenciado pela pequena quantidade de amostras analisadas na fase exponencial de crescimento.

Analisando os dados, notou-se que a fase *lag* foi pouco significativa na curva de crescimento de *Rhizobium sp* na escala de 7 L, com duração menor que 5 h. Como a medida da concentração celular foi feita de maneira indireta por absorbância, não foi possível identificar a fase de morte celular, caracterizada pelo declínio na curva de crescimento.

Com a Equação 1 foi possível obter a taxa específica de crescimento (μ). Os valores de dN/dt foram calculados no programa Scilab 5.5.2 com o comando `splin(t,N)`. O gráfico que descreve o comportamento da taxa específica de crescimento está representado na Figura 13. A curva foi construída utilizando os valores de absorbância simulados no mesmo intervalo de tempo de 0 a 60 horas.

Figura 13 – Variação da taxa de crescimento escala 7 L.



Fonte: Autoria própria.

Fica claro que, após 8 h, o microrganismo atingiu a velocidade máxima de crescimento de aproximadamente $0,126$ h^{-1} . No entanto, enquanto não atingiu a velocidade máxima, notou-se um aumento significativo de μ , sugerindo que a fase *lag* de crescimento realmente não foi muito expressiva.

6.2 Escala Biorreator de 100 L

Os resultados do teste na escala de 100 L estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Curva de crescimento escala de 100 L.

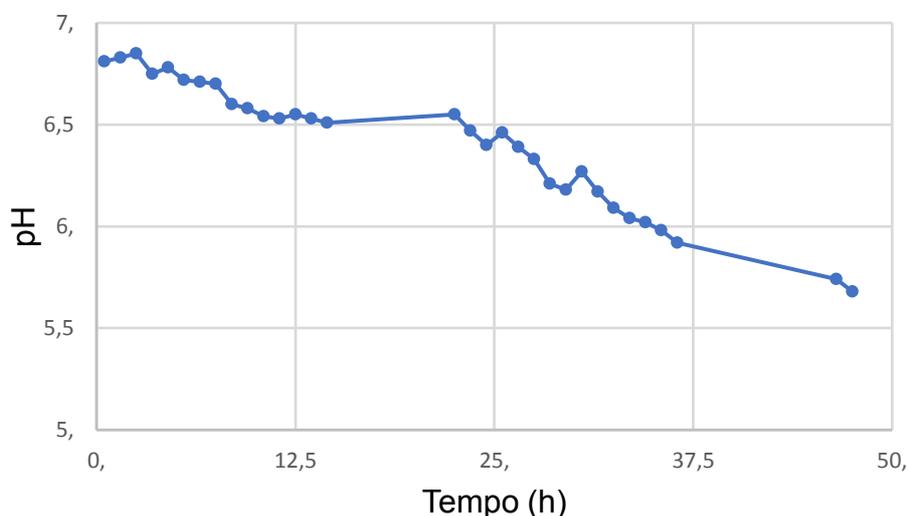
Tempo (h)	Absorbância (540 nm)			pH	y
	1	2	Média		
0,5	0,221	0,216	0,219	6,81	0
1,5	0,279	0,267	0,273	6,83	0,0967
2,5	0,382	0,379	0,381	6,85	0,2409
3,5	0,522	0,514	0,518	6,75	0,3749
4,5	0,695	0,688	0,692	6,78	0,5003
5,5	0,832	0,83	0,831	6,72	0,5801

6,5	0,977	0,972	0,975	6,71	0,6493
7,5	1,068	1,065	1,067	6,70	0,6885
8,5	1,129	1,128	1,129	6,60	0,7131
9,5	1,185	1,186	1,186	6,58	0,7345
10,5	1,249	1,246	1,248	6,54	0,7566
11,5	1,308	1,303	1,306	6,53	0,7763
12,5	1,375	1,374	1,375	6,55	0,7987
13,5	1,436	1,437	1,437	6,53	0,8179
14,5	1,502	1,506	1,504	6,51	0,8378
22,5	1,667	1,668	1,668	6,55	0,8826
23,5	1,665	1,669	1,667	6,47	0,8825
24,5	1,672	1,673	1,673	6,40	0,8839
25,5	1,676	1,675	1,676	6,46	0,8847
26,5	1,725	1,722	1,724	6,39	0,897
27,5	1,722	1,727	1,725	6,33	0,8972
28,5	1,733	1,731	1,732	6,21	0,8991
29,5	1,756	1,745	1,751	6,18	0,9037
30,5	1,759	1,754	1,757	6,27	0,9052
31,5	1,771	1,766	1,769	6,17	0,9082
32,5	1,784	1,781	1,783	6,09	0,9116
33,5	1,768	1,777	1,773	6,04	0,9091
34,5	1,774	1,775	1,775	6,02	0,9096
35,5	1,789	1,779	1,784	5,98	0,9119
36,5	1,795	1,786	1,791	5,92	0,9135
46,5	1,781	1,785	1,783	5,74	0,9117
47,5	1,796	1,788	1,792	5,68	0,9139

Os resultados da Tabela 3 explicitam a absorvância de duas amostras no mesmo ponto. Nota-se que os pontos foram coletados a cada 60 min, aproximadamente. As coletas nos biorreatores possuem mais pontos de amostragem pois durante a realização dos testes nas escalas de 100 e 500 L

foram feitas leituras de absorvância durante o período noturno. A análise de pH nessa escala seguiu uma tendência de ligeira acidificação como mostra a Figura 14.

Figura 14 – Variação do pH escala de 100 L.



Fonte: Autoria própria.

O pH decaiu até atingir um valor de aproximadamente 5,7. Também não há um controle automático de pH na escala de 100 L, logo também é difícil visualizar a real interferência dessa variação no crescimento celular.

Ao se fazer a modelagem matemática, obteve-se os parâmetros estimados a partir dos valores iniciais como mostra a Tabela 5.

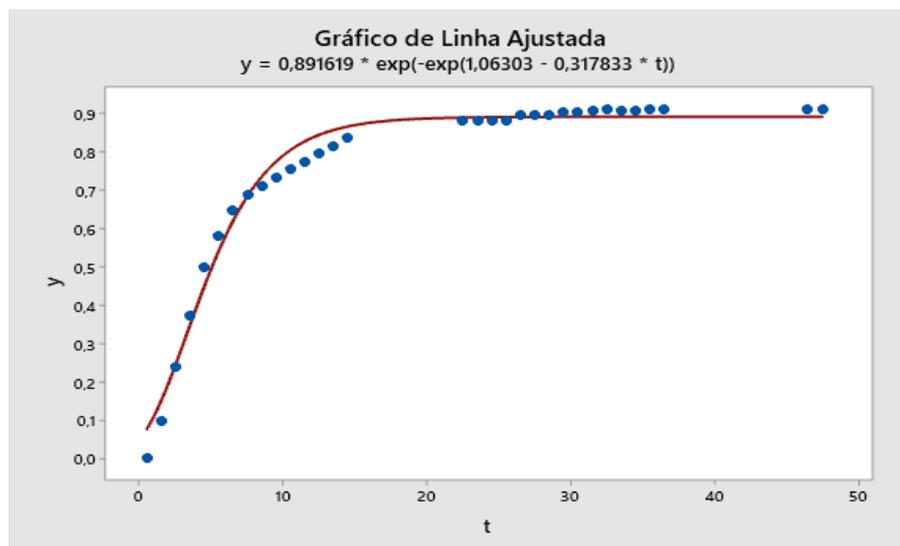
Tabela 5: Parâmetros iniciais e ajustados escala 100 L.

	Parâmetros	
	Valores Iniciais	Estimativas
Theta1	0,9	0,891619
Theta2	1	1,06303
Theta3	0,2	0,31783
S (Erro)	0,0321856	

Os valores iniciais e os ajustados também foram condizentes, além disso, o valor de S foi baixo, levando a conclusão que o modelo também ajustou bem

os dados. Isso fica claro quando gráfico dos valores de y estimados e experimentais são comparados no gráfico apresentado na Figura 15.

Figura 15 – Valores de y ajustados e expressão estimada.

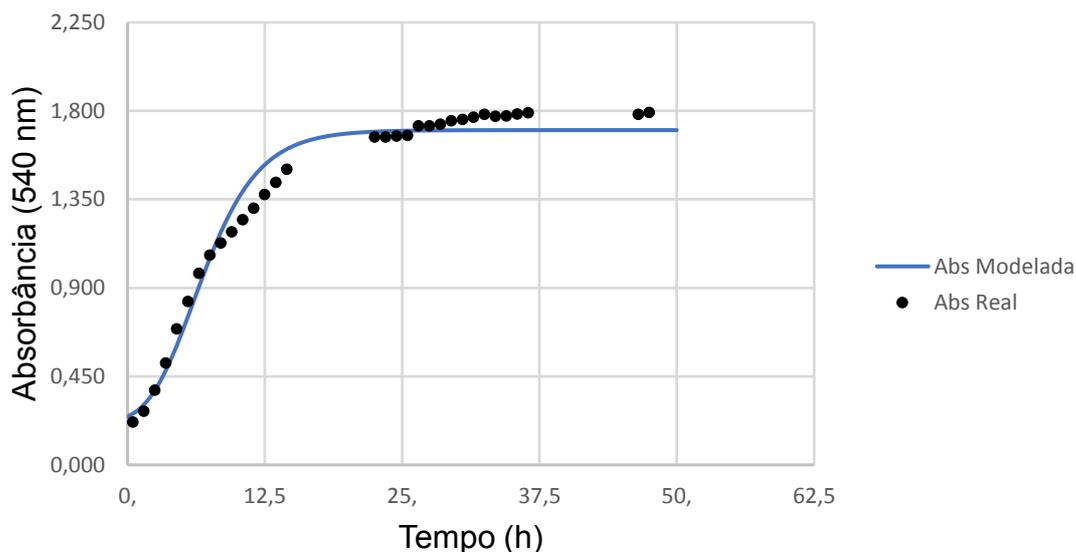


Fonte: Autoria própria.

É possível notar que os valores experimentais ficaram próximos dos valores ajustados, principalmente na fase exponencial e na fase estacionária. Porém, no momento de transição entre as duas fases, os valores ajustados se distanciaram um pouco dos valores reais. Isso provavelmente contribuiu para que o valor de S nessa escala tenha sido ligeiramente superior quando comparado com a escala anterior. Uma possível explicação para esse distanciamento seria a não coleta e amostras entre 14,5 e 22,5 horas, influenciando no ajuste de dados pelo modelo.

Com a expressão ajustada apresentada na Figura 15, também foi possível simular valores que não foram possíveis realizar a leitura. Então a modelagem auxilia na simulação desses dados a cada 60 min por tempo total de até 50 h para o cálculo de y que também foi convertido para absorbância. A curva de crescimento está ilustrada na Figura 16.

Figura 16 – Curva de crescimento escala de 100 L.



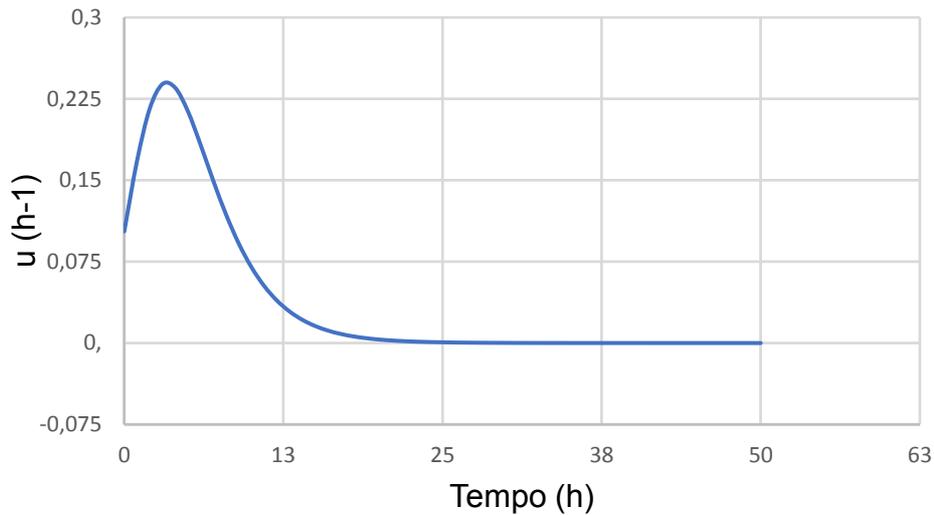
Fonte: Autoria própria.

O gráfico mostra que o modelo de Gompertz também modelou bem os dados de absorbância, porém, também houve o desvio do ajuste na transição da fase exponencial para a fase estacionária. Porém, devido ao acúmulo de erros, houve também um desvio um pouco maior na fase estacionária quando comparado com o gráfico dos valores de y ajustados.

Nessa escala também é perceptível que a fase *lag* é pouco significativa, com duração menor que 3 h. Como a medida da concentração celular é feita de maneira indireta por absorbância, também não é possível identificar a fase de morte celular, caracterizada pelo declínio na curva de crescimento. É possível notar também que o crescimento na escala de 100 L foi mais acelerado que na escala anterior.

A variação da taxa específica de crescimento está apresentada no gráfico da Figura 17.

Figura 17 – Variação da taxa de crescimento escala 100 L.



Fonte: Autoria própria

Nesse caso, a velocidade específica de crescimento máxima foi atingida por volta das 3 horas com o valor de $0,2386 \text{ h}^{-1}$, mostrando que praticamente não ocorreu fase *lag* significativa. Além disso, a valor de $\mu_{\text{máx}}$ ter sido alcançado antes de 5 h mostra que o crescimento aconteceu de maneira mais rápida que a escala anterior.

6.3 Escala Biorreator de 500 L

Os resultados do teste na escala de 500 L estão apresentados na Tabela 6.

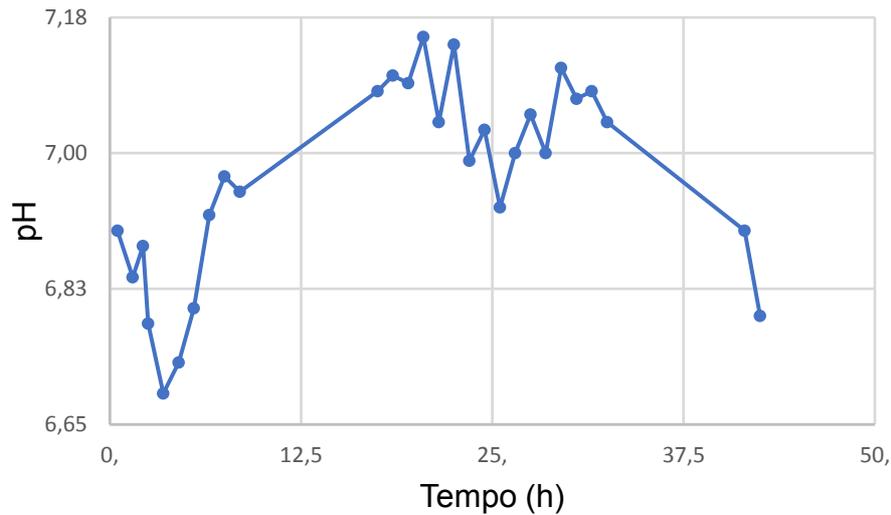
Tabela 6: Curva de crescimento escala de 500 L

Tempo (h)	Absorbância (540 nm)			pH	y
	1	2	Média		
0,5	1,341	1,337	1,339	6,90	0,0000
1,5	1,349	1,350	1,350	6,84	0,0034
2,17	1,379	1,380	1,380	6,88	0,0129
2,5	1,417	1,417	1,417	6,78	0,0246
3,5	1,520	1,518	1,519	6,69	0,0548
4,5	1,622	1,620	1,621	6,73	0,0830
5,5	1,673	1,670	1,672	6,80	0,0963

6,5	1,717	1,714	1,716	6,92	0,1076
7,5	1,796	1,801	1,799	6,97	0,1281
8,5	1,854	1,856	1,855	6,95	0,1416
17,5	2,171	2,175	2,173	7,08	0,2103
18,5	2,196	2,197	2,197	7,10	0,2150
19,5	2,219	2,215	2,217	7,09	0,2190
20,5	2,236	2,234	2,235	7,15	0,2225
21,5	2,257	2,255	2,256	7,04	0,2266
22,5	2,272	2,272	2,272	7,14	0,2296
23,5	2,290	2,289	2,290	6,99	0,2330
24,5	2,301	2,302	2,302	7,03	0,2352
25,5	2,306	2,305	2,306	6,93	0,2360
26,5	2,331	2,335	2,333	7,00	0,2411
27,5	2,348	2,341	2,345	7,05	0,2433
28,5	2,351	2,352	2,352	7,00	0,2446
29,5	2,357	2,360	2,359	7,11	0,2459
30,5	2,354	2,358	2,356	7,07	0,2454
31,5	2,357	2,362	2,360	7,08	0,2460
32,5	2,351	2,334	2,343	7,04	0,2429
41,5	2,364	2,380	2,372	6,90	0,2483
42,5	2,368	2,371	2,370	6,79	0,2479

Os resultados da Tabela 6 explicitam a absorvância de duas amostras no mesmo ponto. Assim como na escala de 100 L, houve mais pontos de coleta. A análise de pH nessa escala não seguiu uma tendência linear, levando em conta que diminuiu no começo e depois aumentou e se manteve próximo à neutralidade. A Figura 18 ilustra o comportamento do pH no decorrer da curva.

Figura 18 – Variação do pH escala de 500 L.



Fonte: Autoria própria.

Pelos mesmos motivos das escalas anteriores, não há como saber os efeitos da variação de pH no crescimento celular.

Os parâmetros cinéticos iniciais e estimados do modelo matemático são mostrados na Tabela 7.

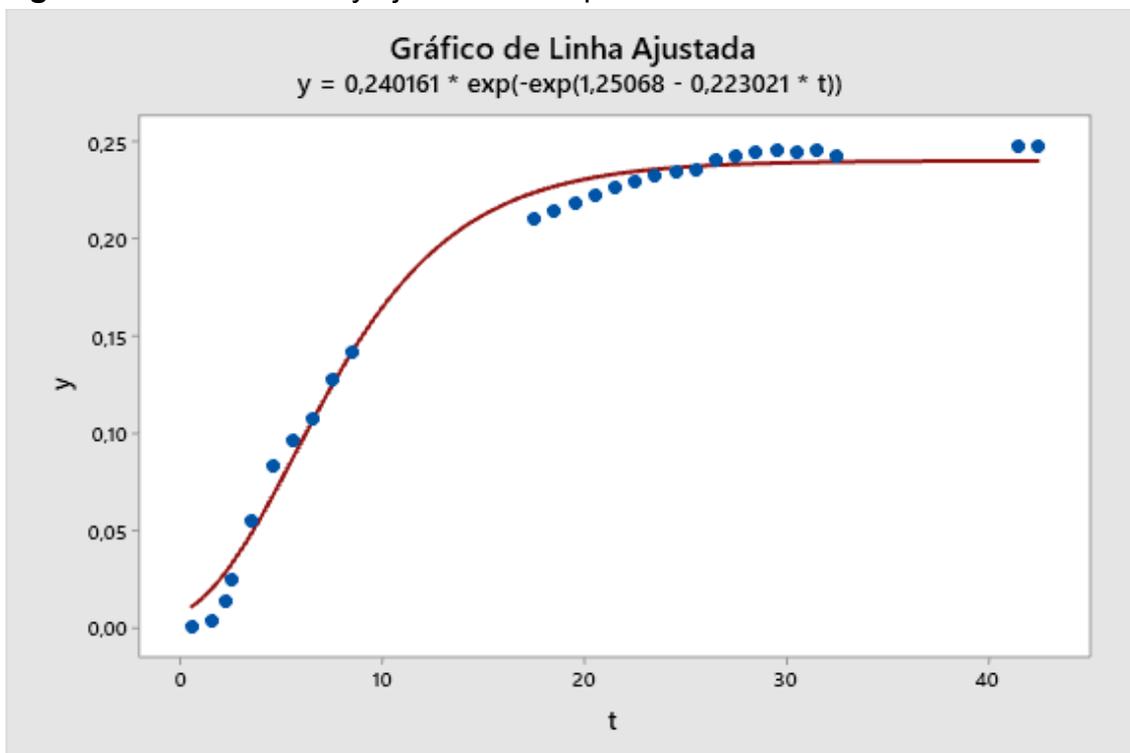
Tabela 7: Parâmetros iniciais e ajustados escala 500 L.

	Parâmetros	
	Valores Iniciais	Estimativas
Theta1	0,2	0,24016
Theta2	1	1,25068
Theta3	0,2	0,22302
S(Erro)	0,0090110	

Os parâmetros iniciais e os ajustados estão condizentes, além disso, o valor S também foi baixo, significando que o modelo foi útil para ajustar os dados

de crescimento. A comparação entre os dados reais e os experimentais de y está evidente no gráfico da Figura 19.

Figura 19 – Valores de y ajustados e expressão estimada.

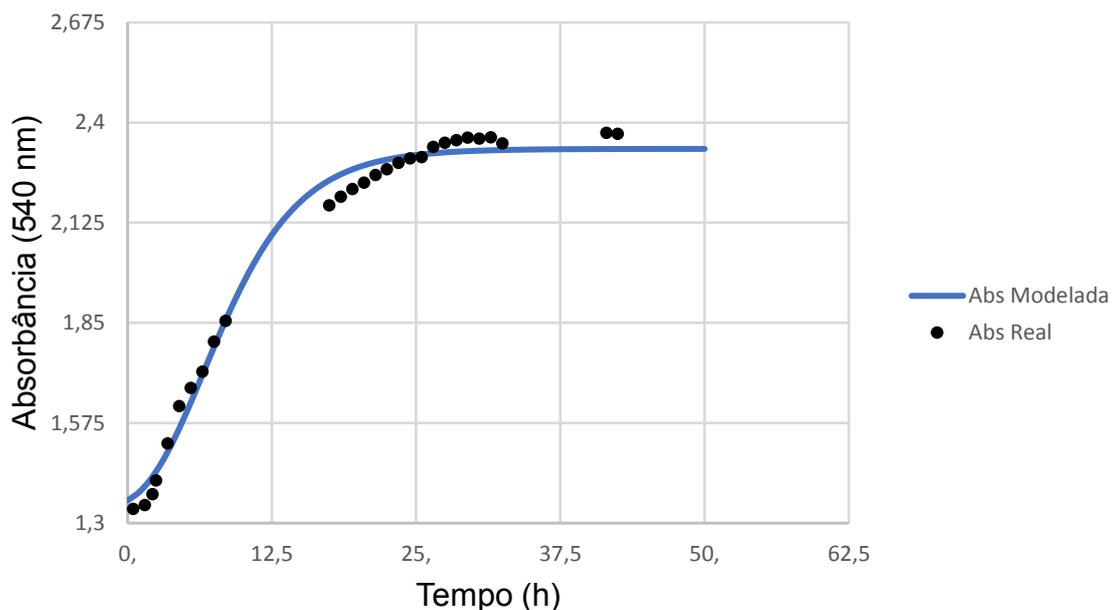


Fonte: Autoria própria.

Os valores experimentais ficaram próximos dos valores ajustados principalmente na fase exponencial. Entretanto, é perceptível um pequeno distanciamento dos pontos reais em relação ao modelo na transição entre as fases logarítmica e estacionária, que provavelmente aconteceu pela falta de pontos entre as duas fases.

A expressão ajustada da Figura 19 foi utilizada para simular valores que não foram possíveis realizar a leitura. Os pontos foram simulados de uma em uma hora até 50 horas para o cálculo de y que também foi convertido para absorvância. A curva de crescimento está ilustrada na Figura 20.

Figura 20 – Curva de crescimento escala de 500 L.

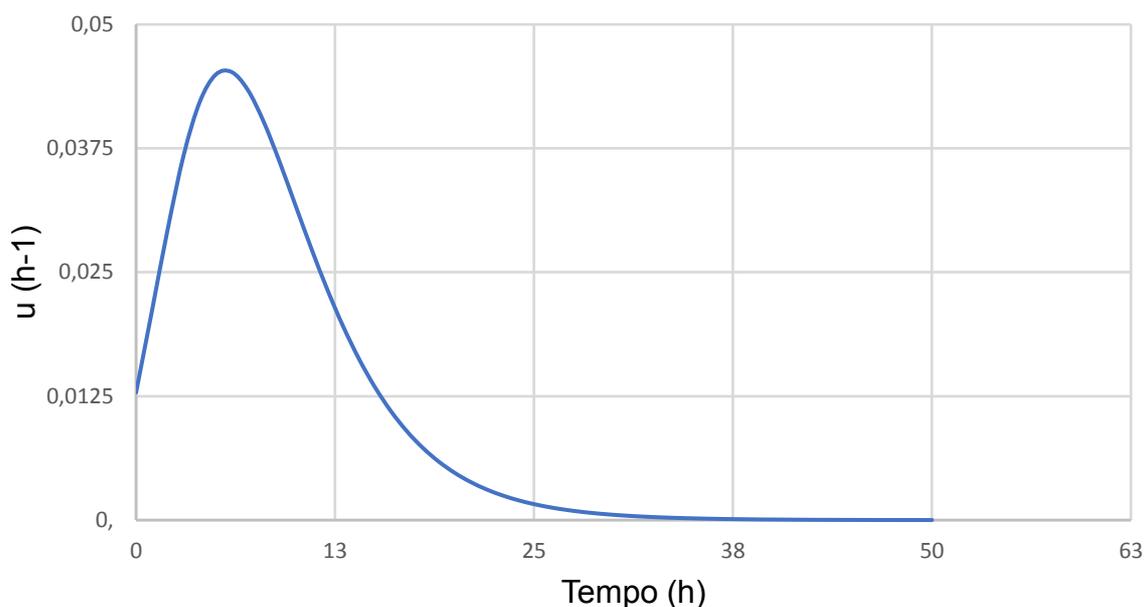


Fonte: Autoria própria.

Após a conversão para absorbância, o modelo se mostrou coerente com os dados experimentais, mas também há um distanciamento dos dados experimentais em relação aos dados ajustados durante a transição entre as fases exponencial e estacionária. A fase *lag* também não é muito expressiva, assim como nas escalas anteriores. É possível perceber também nessa escala que a bactéria *Rhizobium sp* é considerada de crescimento rápido, já que a fase estacionária acontece antes de 24 h. Isso é perceptível nas escalas anteriores também.

A variação da taxa específica de crescimento está apresentada no gráfico da Figura 21.

Figura 21 – Variação da taxa de crescimento escala 500 L.



Fonte: Autoria própria.

A velocidade específica de crescimento máxima foi atingida por volta das 6 horas com o valor de $0,0452 \text{ h}^{-1}$, mostrando que o gráfico de μ é relevante para entender onde começa e termina cada fase.

É interessante perceber que a velocidade específica máxima é consideravelmente menor quando comparado com as escalas anteriores, além disso, o valor de absorbância inicial é diferente entre as escalas, e isso interfere diretamente no crescimento celular, já que uma quantidade maior de células no início do experimento exige uma concentração maior de substrato. Isso acontece devido a um aumento na proporção do inoculo como mostrado na Figura 8.

6.4 Escala Biorreator de 1500 L

Os resultados do teste na escala de 1500 L estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8: Curva de crescimento escala de 1500 L.

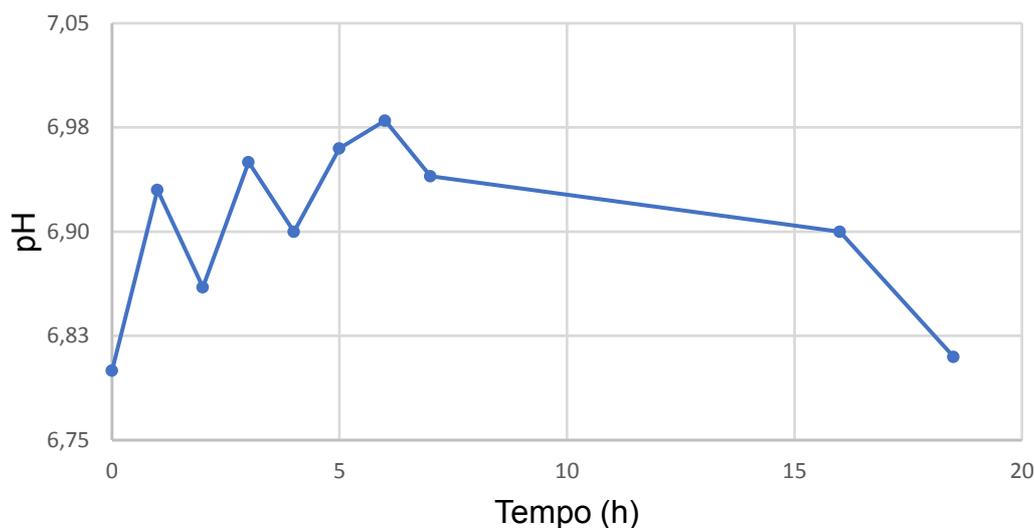
Tempo (h)	Absorbância (540 nm)			pH	y
	1	2	Média		
0	0,990	0,981	0,986	6,80	0,0000

1	1,061	1,054	1,058	6,93	0,0306
2	1,094	1,083	1,089	6,86	0,0432
3	1,160	1,155	1,158	6,95	0,0699
4	1,196	1,185	1,191	6,90	0,0821
5	1,260	1,252	1,256	6,96	0,1053
6	1,295	1,291	1,293	6,98	0,1179
7	1,340	1,336	1,338	6,94	0,1328
16	1,593	1,584	1,589	6,90	0,2073
18,5	1,617	1,613	1,615	6,81	0,2145

Os resultados da Tabela 8 explicitam a absorvância de duas amostras no mesmo ponto. Essa escala teve menos pontos coletados devido à necessidade de esvaziar o tanque para atender a demanda da produção, porém, os dados coletados até 18,5 h foram utilizados para a análise.

Os resultados de pH até o tempo de 18,5 h nessa escala não foram muito conclusivos, porém se os valores se mantiveram entre 6,8 e 7,0, próximos à neutralidade como mostra o gráfico da Figura 22. Porém, seriam necessários mais dados para analisar os reais efeitos do pH no crescimento da bactéria.

Figura 22 – Variação do pH escala de 1500 L.



Fonte: Autoria própria.

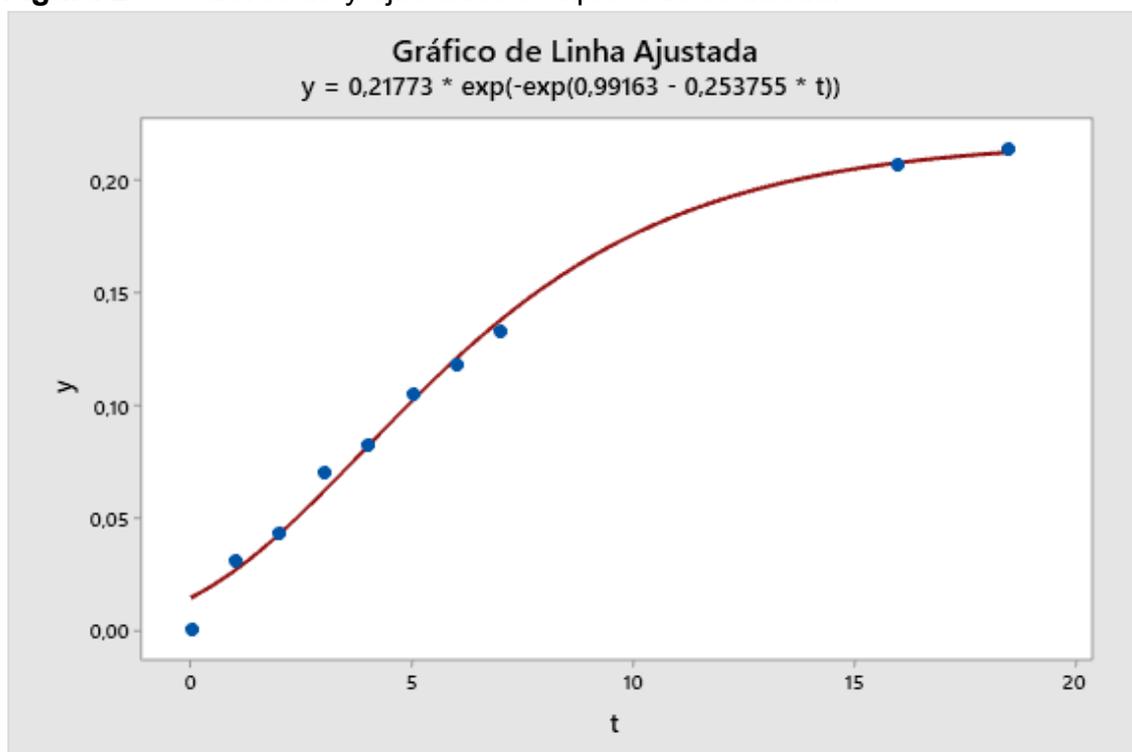
Os parâmetros cinéticos iniciais e estimados do modelo matemático são mostrados na Tabela 9.

Tabela 9: Parâmetros iniciais e ajustados escala 1500 L.

	Parâmetros	
	Valores Iniciais	Estimativas
Theta1	0,2	0,217730
Theta2	1	0,991630
Theta3	0,2	0,253755
S(Erro)	0,0070284	

Os parâmetros iniciais e os ajustados estão condizentes, além disso, o valor S também foi baixo, significando que o modelo foi útil para ajustar os dados de crescimento. A comparação entre os dados reais e os experimentais de y está evidente no gráfico da Figura 23.

Figura 23 – Valores de y ajustados e expressão estimada.

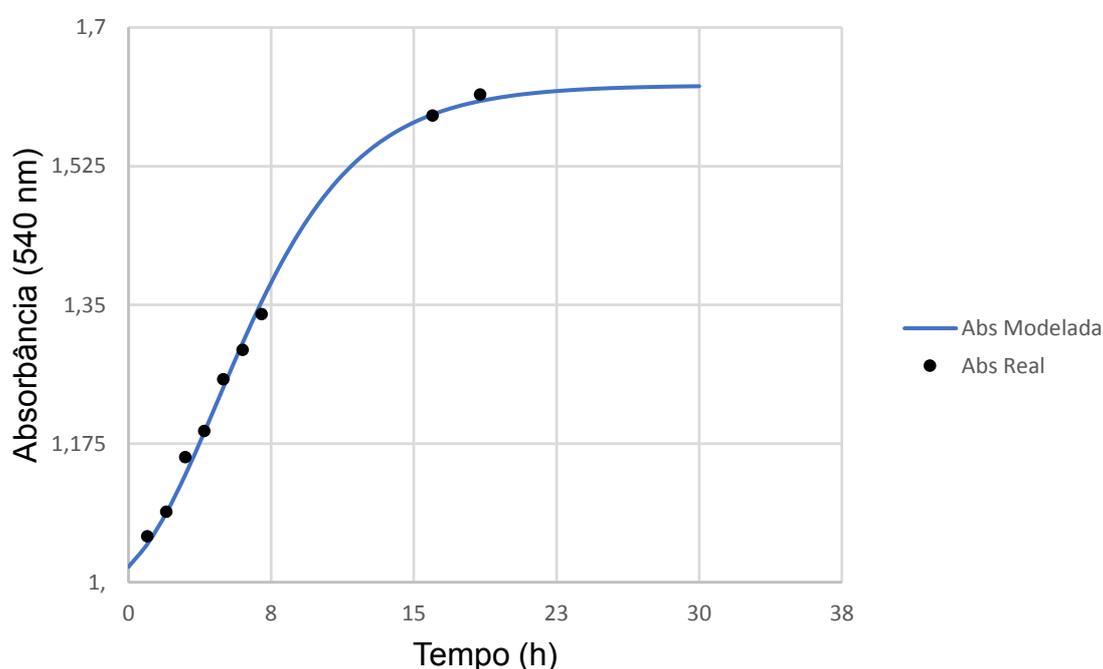


Fonte: Autoria própria.

Os valores experimentais ficaram próximos dos valores ajustados. Entretanto, é interessante ressaltar que essa escala teve poucos pontos coletados, então é possível que o modelo não tenha ajustado bem os dados que estão faltando, podendo não ter representado os dados experimentais.

A expressão ajustada simulou os valores que não foram possíveis realizar a leitura. Os pontos foram simulados de uma em uma hora até 30 h para o cálculo de y que também foi convertido para absorbância. A curva de crescimento está ilustrada na Figura 24.

Figura 24 – Curva de crescimento escala de 1500 L.



Fonte: Autoria própria.

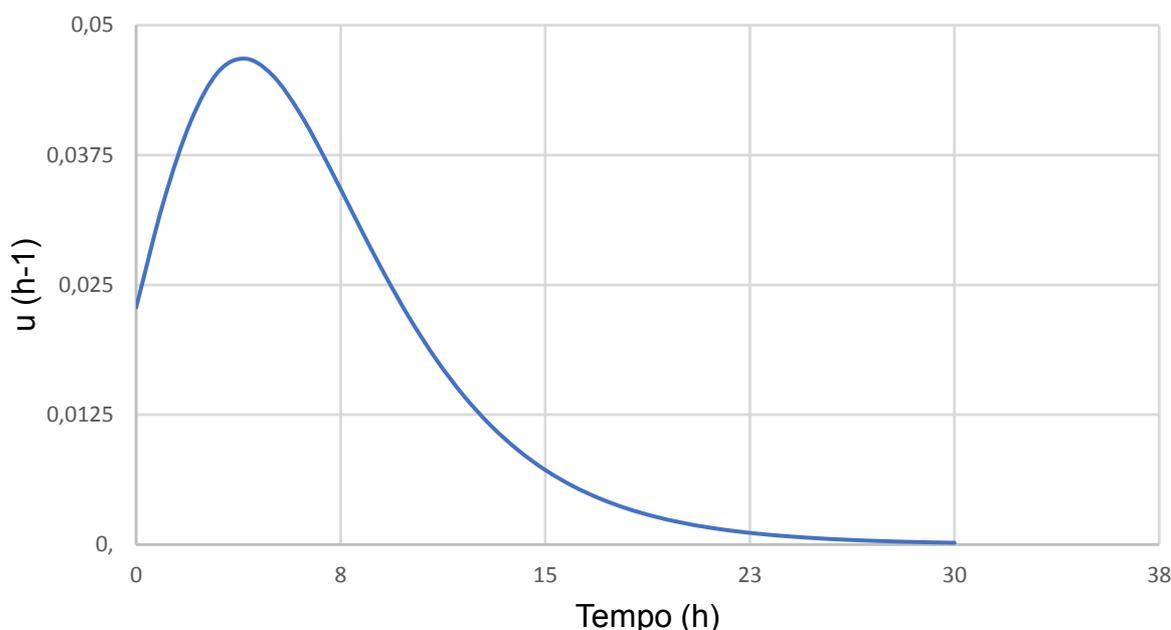
A curva de crescimento construída com a absorbância mostra que os dados ajustados e os dados experimentais estão bem próximos. Mais uma vez, a fase *lag* não é muito significativa, e a fase logarítmica começa por volta das 3 horas e se estende até as 10 h aproximadamente, quando começa a desaceleração da curva e começo da fase estacionária.

Também fica claro que nessa escala a absorbância inicial começou mais alta que nas escalas de 7 e 100 L, o que também é justificado pela alta proporção de inoculo representada na Figura 8. Quanto maior a quantidade de células,

maior o consumo de substrato e se não há nutrientes suficiente, os efeitos da inibição são maiores, como aconteceu com a escala de 500 L.

A variação da taxa específica de crescimento está apresentada no gráfico da Figura 25.

Figura 25 – Variação da taxa de crescimento escala 1500 L.



Fonte: Autoria própria.

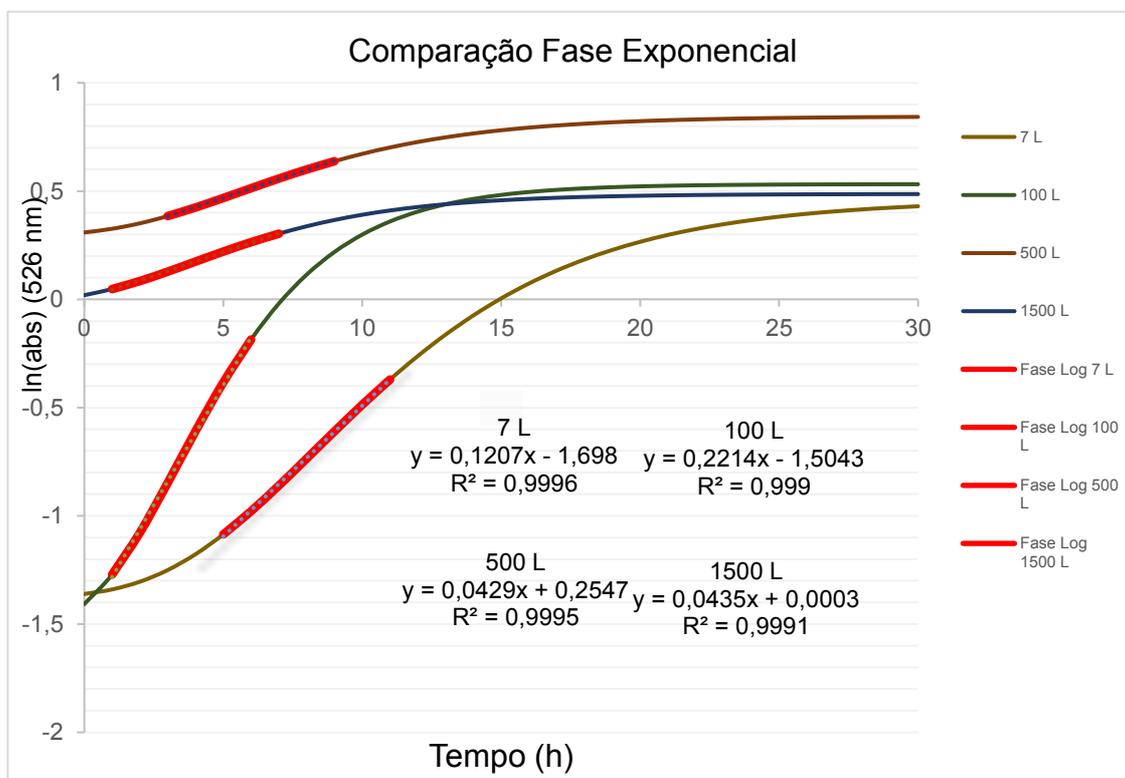
A velocidade específica de crescimento máxima foi atingida por volta das 4 h com o valor de $0,0468 h^{-1}$. A taxa de crescimento nesse caso também foi bem menor quando comparado com as escalas de 7 e 100 L, revelando uma dificuldade maior de crescimento. Isso também ocorre por causa da grande proporção de inoculo, que nesse caso atinge 33,3% do volume útil de crescimento.

6.5 Comparação entre as escalas

A fase exponencial de cada escala foi definida com a Equação 2 linearizada ao aplicar logaritmo neperiano em ambos os lados, e assim, verificando o valor de R^2 que melhor representa o período de tempo em que o crescimento permanece linear. A Figura 26 evidencia a fase logarítmica de cada

escala e também apresenta as equações da reta e o coeficiente de correlação linear.

Figure 26: Gráfico de definição da fase exponencial em todas as escalas. As linhas vermelhas representam as fases exponenciais, e as equações referentes à cada escala também estão representadas no gráfico



É possível perceber que em todas as escalas produtivas foi possível obter a fase exponencial pelo método de linearização, já que a todas as equações apresentaram coeficiente de correlação linear acima de 0,99. O Bi

Com os resultados gráficos cinéticos obtidos em cada uma das escalas, é possível fazer uma comparação entre as fases de crescimento entre elas e assim perceber diferenças pertinentes que interferem na curva cinética. A Tabela 10 demonstra os dados de parâmetros importantes para a análise cinética, como a valor de $\mu_{\text{máx}}$, tempo de duração das fases de crescimento, absorbância final (relacionada à fase estacionária e à concentração celular) e também o valor S, referente ao erro da modelagem.

Tabela 10: Valores cinéticos e da modelagem para comparação entre as escalas.

Escola	Inóculo (%)	S	Fase lag (h)	$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	Fase Exponencial (h)	R ²	Abs Final
7 L	2,86	0,017	< 5	0,12584	5 - 11	0,9996	1,586
100 L	7	0,0322	< 3	0,23859	1 - 6	0,9990	1,702
500 L	20	0,009	< 3	0,04520	3 - 9	0,9995	2,328
1500 L	33,3	0,007	< 3	0,04678	1 - 7	0,9991	1,626

É notório perceber que as escalas de 500 e 1500 L apresentaram valores consideravelmente mais baixos de $\mu_{\text{máx}}$, o que indica uma dificuldade no crescimento das células. Isso muito provavelmente está relacionado com as proporções de inóculo que cada tanque recebe, 20 e 33,3% respectivamente.

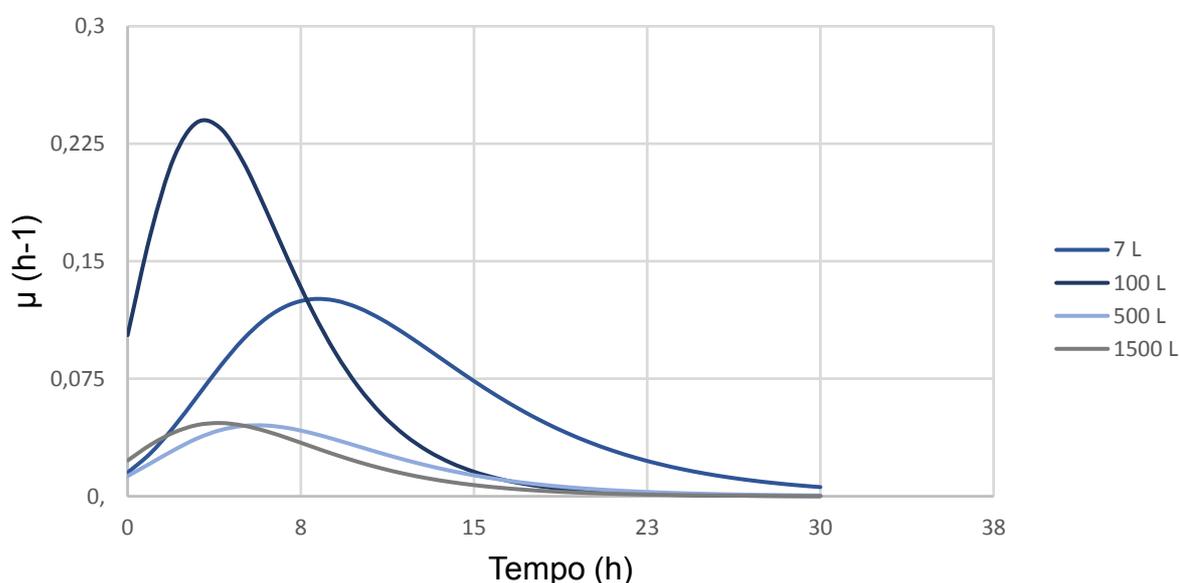
A escala de 7 L tem um comportamento um pouco diferente por se tratar de uma escala laboratorial, sendo que o balão é inoculado com 200 ml de inóculo, representando uma porcentagem de inóculo baixa. Além disso, isso interfere diretamente na concentração final, já que o valor final de absorvância não ultrapassou 1,700. Esse motivo interfere também no início da fase exponencial, que acontece um pouco mais tarde (Por volta de 5 h) que as escalas seguintes. Os testes laboratoriais são muito importantes, porém, futuros estudos de otimização estão focados nas escalas maiores.

Os valores de S foram baixos em todas as escalas, evidenciando que o modelo de Gompertz obteve sucesso em ajustar os dados experimentais. As escalas de 7 e 100 L apresentaram valores ligeiramente mais altos em relação às escalas maiores, e foi perceptível alguns valores um pouco distantes do ajuste na transição entre as fases exponencial e estacionária. Uma possível explicação para esse distanciamento é que houve períodos onde amostras não foram coletadas, podendo ter interferido no momento do ajuste.

Por se tratar de uma bactéria de crescimento rápido, a fase lag não interfere muito no crescimento celular, sendo que quase todas as escalas apresentaram fases *lag* abaixo de 3 horas. Apenas na escala de 7 L que a fase lag durou cerca de 5 horas, sendo que foi a escala a receber uma quantidade menor de inóculo.

Em relação à cinética, a escala de 100 L apresentou os melhores resultados, com o maior valor de $\mu_{\text{máx}}$, menor duração da fase logarítmica e atingiu valores altos de absorvância rapidamente. Porém, em relação à concentração celular, o tanque de 500 L foi o que revelou o melhor resultado, apresentando valores e absorvância maiores que 2,000. Levando em conta os critérios de liberação de produto e análises do departamento da qualidade, o caldo pode ser liberado após atingir uma absorvância de 1,600 sem nenhuma não conformidade de concentração. O gráfico da Figura 27 representa a comparação entre a variação da taxa de crescimento de cada escala.

Figura 27 – Comparação da taxa de crescimento.



Fonte: Autoria própria.

Fica evidente que a escala de 100 L se sobressai em relação as outras escalas. É comprovado também que a escala de laboratório demora um pouco mais para começar a fase logarítmica, a além disso, fica claro o quanto as escalas de 500 e 1500 L apresentam uma deficiência de crescimento, causada principalmente pela alta proporção de inóculo.

7. CONCLUSÃO

Mesmo com pequenos desvios dos pontos experimentais, o modelo de Gompertz apresentou resultados positivos para ajustar os dados da curva de crescimento do *Rhizobium sp*, apresentando baixos valores de erros em todas as escalas. Além disso, com a metodologia utilizada, foi possível definir as fases de crescimento microbiano que são importantes para a transferência de escalas e para a liberação de produtos. A variação da taxa específica de crescimento foi possível ser calculada utilizando a fórmula apresentada na teoria, e foi de extrema importância para a definição das fases de crescimento e para seguir com a análises futuras de melhorias. Ao se comparar as escalas, notou-se que a escala de 100 L apresentou parâmetros cinéticos mais desejáveis, levando em consideração a velocidade de crescimento. Por outro lado, as escalas maiores foram afetadas pela alta proporção de inoculo, reduzindo bastante o valor da taxa de crescimento. É importante ressaltar que as curvas de crescimento não foram feitas em mais repetições devido à dificuldade de disponibilidade dos biorreatores, já que os experimentos foram feitos utilizando tanques compartilhados com a Produção. Por fim, o trabalho em questão foi importante para apresentar de uma maneira mais clara os dados de curvas de crescimento, além de analisar parâmetros diferentes que apenas concentração indireta de células. Há projetos sendo realizados para a implementação de melhorias nos biorreatores, como a instalação de sondas de densidade óptica e turbidez, além de instrumentação para analisar outros fatores, como por exemplo, a concentração de oxigênio dissolvida.

8. REFERÊNCIAS

ANPII – Associação Nacional dos Produtores e Importadores de Inoculantes – “**A ANPII e a qualidade dos inoculantes**” Disponível em <http://www.anpii.org.br/>. Acesso em: 06 out. 2019.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. Azospirillum – plant relationships: environmental and physiological advances (1990 – 1996) **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p.103 – 121, 1997.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Perspectivas para a agropecuária**. Brasília, v.6, Safra 2018/2019, p. 43, 2018. Disponível em: <file:///C:/Users/icaroteofilo/Downloads/PerspectivasZparaZaZAgropecuariaZ-V.6ZZ2018-2019.pdf>. Acesso em: 26 out. 2019.

DALSENTER, F. D. H. **Efeito da temperatura na cinética de crescimento de Rhizopus oryzae em cultivo no estado sólido**. 2005. 136 p. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

ERKMEN, O. & ALBEN, E. Mathematical modeling of citric acid production and biomass formation by *Aspergillus niger* in undersized semolina. **Journal of Food Engineering**, v.52, p.161-166, 2002.

GADEN, E. L. Jr. Fermentation kinetics and productivity. **Chemistry and Industry**, February 12, p. 154 – 9, 1955.

GIBSON, A. M.; BRATCHELL, N. & ROBERTS, T.A. The effect of sodium chloride and temperature on the rate and extent of growth of *Clostridium*

botulinum type A in pasteurized pork slurry. **Journal of Applied Bacteriology**, v.62, p.479-490, 1987.

GOMPERTZ, B. On the nature of the function expressive of the law of human mortality and on a new method of determining the value of life contingencies. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, London, v. 115, p. 513-585, 1825.

HUNGRIA, M.; TEIXEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. **Fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro-comum**. Planaltina: Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados-CPAC, p. 189-294. 1997.

MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Desenvolvimento. **Legislação de Fertilizantes, Corretivos, Inoculantes e Biofertilizantes**. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/>> 2019. Acesso em: 06 out. 2019.

MAZUCHELI, J.; SOUZA, R. M.; PHILIPPSSEN, A. S. **Gompertz growth model in the presence of normal heteroscedastic errors: A case study**. Rev. Bras. Biom., São Paulo, v.29, n.1, p.91-101, 2011.

ORGANIZAÇÃO PARA A COOPERAÇÃO E DESENVOLVIMENTO ECONÓMICO - OECD. **Crop production (indicator)**. França: OECD, 2018. Disponível em: <www.oecd.org>. Acesso em: 06 out. 2019.

REIS, V. M. Uso de bactérias fixadoras de nitrogênio como inoculante para aplicação em gramíneas. **Documentos Embrapa** no 232, 22 p, Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2007.

SCHMIDELL, Willibaldo et al. **Biotecnologia Industrial - Engenharia Bioquímica**. V.2, p. 96 – 107. Blücher, São Paulo, 2001.

SILVA SANTOS, C. E.R.; FREITAS, A. D. S.; VIEIRA, I. M. M. B.; COLAÇO, W. Fixação simbiótica do N₂ em leguminosas tropicais in **Microrganismos e Agrobiodiversidade**, 1ª edição, Guaíba: Agrolivros, 2008, 568p.

SILVEIRA, J. M. F. J. da, BORGES, I. de C., & BUAINAIN, A. M. (2005). Biotecnologia e agricultura: da ciência e tecnologia aos impactos da inovação. **São Paulo Em Perspectiva**, 19(2), 101 – 114. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0102-88392005000200009>. Acesso em: 06 out. 2019.

THORNLEY, J. H. M.; FRANCE, J. **Mathematical models in agriculture: quantitative methods for the plant, animal and ecological sciences**. 2th ed. Wallingford, UK: CABI Publishing, 2007.

WHITING, R. C. **Microbial Modeling in Foods**. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v.35, p.467,494, 1995.

WINSOR, C. P. The Gompertz curve as a growth curve. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 18, p. 1-17, 1923.

ZWIETERING, M. H.; JONGENBURGER, I.; ROMBOUTS, F. M.; VAN TRIET, K. Modeling of the Bacterial Growth Curve. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, p. 1875-1881, 1990.