

Este trabalho não contempla as críticas, sugestões e correcções sugeridas pelo Júri.

Assinaturas dos membros do júri

Presidente

Orientador externo

Orientador externo

Arguente

Classificação Final

Agradecimentos

Ao Instituto de Tecnologia Química e Biológica agradeço ter-me permitido desenvolver a componente prática do trabalho no laboratório de fermentação.

Ao Instituto Nacional de Recursos Biológicos agradeço ter disponibilizado o material biológico sob o qual incidiu parte do trabalho.

À Doutora Noémia Farinha pela orientação, a amizade a motivação e a confiança, demonstrada ao longo deste ano de trabalho.

Ao Doutor Eugénio Ferreira, co-orientador, pela orientação científica cuidada e atenciosa dos trabalhos e tese de mestrado e pelo apoio e amizade demonstrados.

À Doutora Lúcia Saraiva, co-orientadora, agradeço as palavras que me motivaram nos momentos decisivos e por poder contar com a sua competência e amizade.

Ao Professor Doutor Miguel Teixeira, agradeço os anos de confiança e amizade e o seu apoio sempre incondicional para a concretização de todos os objectivos relevantes para a minha vida. Obrigado.

À Doutora Isabel Castro pelo apoio no início dos trabalhos experimentais.

Aos meus amigos, Doutora Manuela Pereira e Doutor Cláudio Gomes pela paciência, a amizade e o carinho dedicados.

À Doutora Andreia Veríssimo pela amizade, palavras de apoio.

Ao Engenheiro António Cunha pela sua disponibilidade pelo apoio no trabalho experimental realizado na Unidade Piloto do Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica. Acima de tudo agradeço as longas horas de discussão conselhos e amizade.

Ao Engenheiro João Clemente pela competência e pelas horas dedicadas à aquisição de dados dos ensaios na Unidade Piloto sem as quais este trabalho não seria possível.

À Doutora Paula Fareleira e à Doutora Lúcia Martins pelos conselhos e amizade.

À Sandra Rodrigues pela informação de carácter científico partilhada.

Aos meus colegas de laboratório, obrigado.

À Ana Paula e ao João Vicente, thank you.

Finalmente agradeço a toda a minha família cujo apoio foi fundamental.

Aos meus pais por me proporcionarem chegar até aqui.

Aos meus filhos Francisco e Pedro agradeço os sorrisos e a alegria que dão à minha vida.

À Regina e ao nosso amor que nos mantêm juntos em tudo e para tudo na vida.

Resumo

O objectivo da primeira parte do trabalho consistiu em estabelecer condições de crescimento microaerófilo em fermentadores, para a produção industrial de *Bradyrhizobium japonicum* com vista à obtenção de células com citocromo oxidase *cbb3* expresso.

Após optimização, foi obtida uma taxa de crescimento média de 0.015 h^{-1} , que serviu de referência para o processo de produção à escala industrial.

Os resultados obtidos nesta primeira parte do trabalho, foram alcançados pela implementação de um conjunto de metodologias associadas a processos biotecnológicos determinantes para a segunda parte do trabalho.

O objectivo da segunda parte do trabalho consistiu em otimizar condições de crescimento de estirpes autóctones de *Rhizobium* (123Ts2, 19Ms e 55Mp) com o fim de produzir inoculantes com potencial interesse na produção de leguminosas.

Para a estirpe *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* 123Ts2, as maiores concentrações celulares foram obtidas em meio TYG, 28°C, pH 6 e 50 mM de NaCl. Estes valores, serviram de referência para os ensaios realizados à escala piloto, onde os melhores resultados foram obtidos para um caudal de ar de 2000 ml/min a pH 6 constante.

Para a estirpe *Sinorhizobium meliloti* 19Ms as maiores concentrações celulares registaram-se nos crescimentos efectuados em meio TYG a 28°C, pH 6 e a 150 mM de NaCl. Já para a estirpe *Sinorhizobium meliloti* 55Mp concluiu-se que os níveis de temperatura e pH mais elevados estudados permitem taxas de crescimento mais altas, sendo as maiores concentrações celulares atingidas nos crescimentos a pH 6.

Nos ensaios à escala piloto procedeu-se à optimização das condições de crescimento para a estirpe *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* 123Ts2 de modo a se obterem resultados conclusivos que fornecessem informação útil para a produção de inoculantes.

Palavras chave: *Rhizobium*; Crescimento microbiano, Expressão de proteínas; Produção de inoculantes, Biotecnologia, Fermentação.

Abstract

The purpose of the first part of this work regarded the establishment of microaerophilic growth conditions in fermenters, to obtain large yields of *Bradyrhizobium japonicum* cells over-expressing *cbb3* cytochrome oxidase. After optimization, an average growth rate of 0.015 h^{-1} was obtained, which was used as a reference rate for the large-scale processes. The results acquired from the first part of the work were attained by employing methodologies related to biotechnological processes, which were crucial for the second part of the work.

The purpose of the second part consisted of optimizing growth conditions of wild-type strains of *Rhizobium*, namely 123Ts2 *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and 19Ms, and 55Mp *Sinorhizobium meliloti*, with the objective of obtaining inoculants with a potential interest for leguminous production. The largest cell densities of strain 123Ts2 were obtained in TYG medium, at 28°C , pH 6.0, and 50 mM NaCl. These values were used as reference for the large-scale tests, where the best results were obtained with an air-flow of 2000 ml/min at constant pH of 6.0. Regarding *Sinorhizobium* strain 19Ms, the highest cell densities were reached in TYG medium, at 28°C , pH 6.0, and 150 mM NaCl. As for *Sinorhizobium* strain 55Mp, it was observed that higher temperatures and pH result in higher growth rates, the highest cell densities being attained at pH 6.0.

Large-scale growth conditions for *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* 123Ts2 were optimized to obtain conclusive results in the production of inoculants.

Keywords: *Rhizobium*, Microbial growth, Protein expression, Inoculants production, Biotechnology, Fermentation.

Índice

I - Introdução Geral	1
II - Produção de células de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> para a expressão de proteínas	5
1. Introdução e objectivos	5
2. Materiais e métodos	6
2.1 Materiais	6
2.1.1 Material biológico	6
2.1.2 Meio de cultura	6
2.2 Métodos	7
2.2.1 Crescimento e monitorização do bioprocesso	7
2.2.1.1 Crescimento	7
2.2.1.2 Monitorização do bioprocesso	9
2.3 Processamento de biomassa	10
3. Resultados e discussão	12
3.1 Optimização de condições de crescimento para ambiente microaerofílico e produção industrial de biomassa	12
3.1.1 Primeira estratégia	12
3.1.2 Segunda estratégia	13
3.1.3 Terceira estratégia	14
3.1.4 Quarta estratégia	15
4. Conclusão	16
III - Estudo de condições de crescimento de estirpes de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> e <i>Sinorhizobium meliloti</i>	18
1. Introdução e objectivos	18
2. Materiais e métodos	20
2.1 Materiais	20
2.1.1 Material biológico	20
2.1.2 Meios de cultura	20
2.2 Métodos	22
2.2.1 Delineamento experimental e análise estatística	22
2.2.2 Caracterização morfológica das estirpes de <i>Rhizobium</i>	22

2.2.2.2	Caracterização de colónias com Azul de Bromotimol	23
2.2.3	Manutenção e preservação de inóculos em culturas activas	24
2.2.4	Crescimento e monitorização do bioprocesso	24
2.2.4.1	Determinação da relação entre densidade óptica e o número de células	25
2.2.4.2	Crescimentos	26
2.2.4.2.1	Crescimentos à escala laboratorial	26
2.2.4.2.2	Crescimentos à escala piloto	28
2.2.4.3	Monitorização dos crescimentos	30
2.2.5	Processamento de biomassa	30
3.	Resultados e discussão	31
3.1	Caracterização de colónias com Vermelho do Congo	31
3.2	Caracterização de colónias com Azul de Bromotimol	31
3.3	Ensaio em meio CML	32
3.4	Determinação da relação entre a densidade óptica e o número de células	33
3.5	Crescimentos à escala laboratorial, optimização de condições de crescimento	34
3.5.1	Estudo de interacção pH/temperatura para a estirpe de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> 123 Ts2	34
3.5.2	Estudo de interacção pH/temperatura para a estirpe de <i>Sinorhizobium meliloti</i> 19Ms	37
3.5.3	Estudo de interacção pH/temperatura para a estirpe de <i>Sinorhizobium meliloti</i> 55Mp	41
3.5.4	Estudo de estirpes de <i>Rhizobium</i> sob diferentes concentrações salinas	45
3.5.4.1	Estirpe de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> 123Ts2	46
3.5.4.2	Estirpe de <i>Sinorhizobium meliloti</i> 19Ms	47
3.5.4.3	Estirpe de <i>Sinorhizobium meliloti</i> 55Mp	48
3.5.5	Estudo de estirpes de <i>Rhizobium</i> crescidas em meios de cultura enriquecidos	49
3.5.5.1	Estirpe de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> 123Ts2	49
3.5.5.2	Estirpe de <i>Sinorhizobium meliloti</i> 19Ms	50
3.5.5.3	Estirpe de <i>Sinorhizobium meliloti</i> 55Mp	52
3.6	Crescimentos à escala piloto	53
3.6.1	Crescimentos realizados para a estirpe de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> 123Ts2	53
3.6.1.1	Optimização de caudais de ar	55

3.6.1.2 Optimização de pH.....	60
4. Conclusão.....	62
IV - Conclusão geral	64
V- Referências bibliográficas.....	65

I - Introdução Geral

Nas últimas décadas o Mundo tem assistido a uma explosão demográfica, cujas previsões apontam já para que no ano 2025 a população mundial atinja os 177 milhões de habitantes. A acompanhar este crescimento exponencial da população está um conseqüente e inevitável aumento da procura de alimentos, em particular nos países em vias de desenvolvimento.

Como resposta a este problema, o aumento das áreas de cultivo não é uma opção aceitável, pois trata-se de uma medida que vai contra os princípios do desenvolvimento sustentável. Neste contexto será essencial avaliar e debater o potencial das Ciências da Vida e da Biotecnologia para assegurar uma agricultura sustentável (Carvalho, 2006).

O entendimento mais consensual dos sistemas de produção sustentáveis assenta no princípio de que esta estratégia de desenvolvimento deve satisfazer as necessidades da geração actual, sem comprometer as gerações futuras.

A implementação de um modelo agrícola sustentável, integrando as dimensões económica, social e ecológica levaram a um aumento significativo da complexidade dos processos de decisão, com vista à eficaz implementação de um conjunto de boas práticas agrícolas compatíveis com os princípios da sustentabilidade (Carvalho, 2006).

Elevadas produtividades em solos empobrecidos é uma realidade que se tem mantido até aos dias de hoje recorrendo a grandes quantidades de fertilizantes. Esta prática agrícola acarreta inevitavelmente custos de produção e impactes ambientais indesejáveis. “Optar por tecnologias sustentáveis, que permitam conservar os recursos naturais e promovam uma melhoria na qualidade de vida das populações constitui um importante componente na inversão deste quadro” (Medeiros *et al.*, 2007).

Como alternativa ao uso de fertilizantes químicos, contribuindo para o aumento da produtividade dos solos, a biotecnologia surge como uma ferramenta inquestionável. A produção e posterior utilização de microrganismos promotores do crescimento, só são possíveis através do recurso à biotecnologia, uma resposta actual para a viabilização dos sistemas de produção.

Um dos exemplos concretos da evolução tecnológica na agricultura trata do desenvolvimento do processo de fixação biológica de azoto que ocorre naturalmente nas leguminosas. Os rizóbios podem viver como bactérias livres no solo ou ao estabelecerem uma relação simbiótica com as leguminosas, convertendo o azoto atmosférico (fixação biológica de azoto), forma utilizável pelas

plantas. Esta relação simbiótica é amplamente aceite como alternativa à fertilização química (Freitas *et al.*, 2007).

Os rizóbios são organismos aeróbios quimioorganotróficos. A temperatura óptima de crescimento situa-se entre os 25 e os 30°C e o pH mais favorável varia entre 6 e 7 (Vincent, 1970).

Segundo Sahgal & Johri (2003), a relação simbiótica entre os rizóbios e as leguminosas é responsável por uma fixação biológica de azoto estimada em 180 milhões de toneladas ano, equivalente a uma produção de recursos no valor de 166180 milhões de dólares.

Para classificar as diversas espécies de *Rhizobium*, foram, tradicionalmente, utilizados testes morfológicos, fisiológicos, bioquímicos e simbióticos, como a taxa de crescimento em meio de cultura manitol, a capacidade de utilizar fontes de carbono e de nodular leguminosas hospedeiras, entre outros (Jordan, 1984). Contudo, particularmente nas últimas duas décadas, as técnicas de biologia molecular vêm ganhando um espaço crescente nos estudos de taxonomia, de competitividade e de ecologia destas bactérias.

Muitas características fisiológicas, bioquímicas e genéticas, além de inoculação cruzada, taxas de crescimento e produção de álcali ou ácido *in vitro* passaram a ser consideradas, a partir da década de 1940, para a divisão do género *Rhizobium* em dois grupos, os de crescimento rápido e os de crescimento lento. Até 2003 eram reconhecidas trinta e seis espécies de rizóbio agrupadas em sete géneros (Sahgal & Johri, 2003). Nos três anos seguintes oito novas espécies de rizóbio foram descritas, estando actualmente reconhecidas 44 espécies de bactérias que nodulam nas raízes de leguminosas, distribuídas por nove géneros, nomeadamente *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Devosia*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Ochrobacterium*, *Sinorhizobium* e *Rhizobium* (Sahgal & Johri, 2006).

A inoculação de leguminosas com *Rhizobium* é actualmente uma prática comum, especialmente recomendada quando se introduzem espécies vegetais novas ou quando as condições do solo não são favoráveis à sobrevivência das bactérias ou ao estabelecimento da simbiose. Por esta razão, para alcançar uma fixação efectiva do azoto no sistema rizóbio-leguminosa, é necessário seleccionar estirpes apropriadas de *Rhizobium*.

O facto de hoje se ter um conhecimento aprofundado do metabolismo dos rizóbios, alguns deles já com o genoma sequenciado, torna possível a sua utilização como instrumentos ou componentes de trabalhos científicos com fins variados.

A primeira parte do trabalho que se apresenta, teve como objectivo a multiplicação industrial de células de *B. japonicum* para a expressão de uma proteína.

O *B. japonicum* é um rizóbio de crescimento lento, pode crescer aerobicamente, anaerobicamente usando nitrato como aceitador terminal de electrões, e em microaerobiose, condição em que prevalecem quando a simbiose planta/rizóbio é estabelecida (Ramseier, 1991; Parke & Ornston, 1984).

Este trabalho beneficiou do nível de conhecimento existente da espécie *B. japonicum*, permitindo que este microorganismo fosse utilizado num projecto de investigação cujo objectivo é estudar a sua redutase de oxigénio. Esta enzima é o último componente da cadeia respiratória, aceitando electrões provenientes da degradação de nutrientes pelo oxigénio. A enzima designada citocromo oxidase *cbb₃*, apresenta uma grande afinidade para o oxigénio, desempenhando um papel fundamental em processos microaerófilos, nomeadamente nos mecanismos de simbiose, que geralmente se dão em ambientes com baixa tensão de oxigénio (Veríssimo, 2008).

A grande diversidade de espécies de rizóbio actualmente reconhecidas, permitem ainda, responder a uma grande diversidade de solicitações de carácter agronómico, com vista a uma gestão sustentável dos recursos naturais e compatíveis com níveis de produtividade elevados.

A importância da segunda parte do trabalho reside na necessidade actual de manter níveis elevados de produtividade das culturas, o que, obriga a um estudo atento, continuado e inovador, das bactérias fixadoras de azoto, com vista à obtenção de simbioses mais eficazes.

“A fixação biológica do azoto desempenha especial importância nos sistemas agrícolas extensivos, devendo proceder-se à utilização de plantas seleccionadas que suportem as condições limitantes inerentes a este tipo de agricultura bem como à selecção de estirpes de rizóbio que com elas formem simbioses altamente eficazes, englobando assim estudos de solos, plantas e bactérias” (Ferreira *et al.*, 2005).

A temperatura, a concentração salina do solo e o pH do solo, são os principais factores com influência na sobrevivência dos rizóbio (Rodrigues, 2008).

A inoculação de estirpes de rizóbio em leguminosas pode suprimir em parte ou totalmente a necessidade em azoto da cultura através do processo de fixação biológica de azoto, desde que as estirpes seleccionadas, para além de eficientes, sejam competitivas, tanto para se estabelecerem no solo e superfície da raiz, como para vencer outras estirpes nativas na infecção e produção de nódulos (Mercante *et al.*, 1992).

O estudo sobre a capacidade de adaptação das diferentes espécies de rizóbio, serviu para o delineamento dos objectivos que constituem a segunda parte deste trabalho, nomeadamente a análise das condições de crescimento para três estirpes autóctones de rizóbio com vista à produção de inoculantes.

O recurso à biotecnologia foi indispensável para a concretização dos dois trabalhos apresentados. A biotecnologia é uma actividade de base científica que requer um conhecimento detalhado dos mecanismos biológicos que se pretendem utilizar e a integração de processos de engenharia de forma a optimizar as bio-reações e a sustentabilidade do processo. Para que se possa optimizar um processo é muito importante a recolha de dados, pois interessa que o processo seja reprodutível e que os resultados sejam comparáveis.

II - Produção de células de *Bradyrhizobium japonicum* para a expressão de proteínas

1. Introdução e objectivos

O *B. japonicum* é uma bactéria simbiótica cujo genoma já foi sequenciado e observado que contem um gene codificante para um citocromo oxidase *cbb₃*. Esta bactéria tem grande importância agronómica pois permite a fixação de azoto em simbiose com leguminosas. Foi demonstrado um aumento na fixação de azoto simbioticamente quando há uma sobreprodução da reductase do oxigénio *cbb₃* (Veríssimo, 2007).

Neste trabalho, utilizaram-se condições de microaerobiose, pois esta condição é a mais favorável à expressão da citocromo oxidase *cbb₃* (Sciotti *et al.*, 2003).

Para a obtenção de um produto, é necessário inicialmente proceder-se à optimização da produção, passo fundamental para a viabilização económica e consequente sustentabilidade do sistema de produção. Nos bioprocessos, a optimização das condições de crescimento, passam pela avaliação da acção de um conjunto de variáveis, factores de crescimento, sobre o rendimento da cultura, expresso em massa celular obtida ou a quantidade de produto por unidade de massa ou substrato consumido, e sobre a produtividade, taxa na qual o produto ou biomassa é formado.

Em microbiologia industrial, o termo fermentação refere-se a qualquer processo microbiológico para obtenção de um produto de interesse. A maioria dos processos não constitui metabolicamente uma fermentação mas sim processos aeróbios. O biorreactor onde ocorre o processo é chamado de fermentador.

Objectivos

Este trabalho teve como objectivo estabelecer as condições óptimas de crescimento microaerófilo em fermentadores, de *B. japonicum* com vista à obtenção de células que produzam o citocromo oxidase *cbb₃*.

2. Materiais e métodos

2.1 Materiais

2.1.1 Material biológico

A estirpe utilizada foi a *B. japonicum* 4639. Nesta estirpe, cedida pelo Professor Hans Martin Fischer, Zurique Suíça, foi introduzido um plasmídeo Prj4639 o qual contém os genes do operão *fix* OQP que codificam para o citocromo *cbb₃* e permite ainda produzir uma proteína recombinante com uma cauda de histidina (Veríssimo 2008).

2.1.2 Meio de cultura

As células foram crescidas em meio de cultura peptona / extracto de levedura (PSY) tal como descrito em (Preising *et al.*, 1993).

Composição por litro:

K ₂ HPO ₄	0.44g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0.176g
NaCl.....	0.088g
Extracto de Levedura.....	0.352g
Peptona.....	2.64g
Correcção do pH para 7.0 com HCl	

O meio de cultura foi esterilizado durante 15 minutos a 121°C (Vincent, 1970).

Adições:

Arabinose (259 mg/ml).....	4 ml
Spectromicina (100 mg/ml)...	1 ml
Streptomicina (100mg/ml)...	500µl

Antes da inoculação o pH é ajustado a 7.0 com NaOH 2M.

2.2 Métodos

2.2.1 Crescimento e monitorização do bioprocesso

Na primeira fase do trabalho procedeu-se à optimização das condições de crescimento de *B. japonicum* em condições de microaerofilia. Uma vez atingido este objectivo deu-se início à produção industrial de células de *B. japonicum*. A avaliação do crescimento foi feita por turbidimetria e por observação da cultura ao microscópio.

2.2.1.1 Crescimento

O bioprocesso, tendo como objectivo final a obtenção máxima de biomassa, foi dividido em três etapas, nomeadamente, preparação de pré-inóculo, inóculo e fermentação.

O pré-inóculo foi preparado num frasco Schott de 500 ml, com um volume de 300 ml, etapa fundamental para a activação da cultura que se encontrava congelado a -80°C, e que vai após incubação a 28°C, 150 rpm, durante 48 horas, ser utilizado como inóculo para a fase seguinte.

Ao fim de 48 horas os 300 ml de cultura foram transferidos para um frasco Schott de 5 l, contendo 2.7 l de meio de cultura. Este frasco possui adaptações que permitem a sua ligação ao fermentador e a transferência do inóculo para o fermentador em ambiente estéril. A incubação dos pré-inóculos e inóculos foram feitas numa incubadora New Brunswick Scientific Incubator Shakers modelo Innova 44 com agitação orbital. As culturas do pré-inóculo e do inóculo foram feitas em frascos completamente fechados e sem entradas de ar para garantir a anaerobicidade.

A biomassa foi produzida num fermentador B-Braun Biostat UD-30, 30 l de volume útil e 43 l de volume total, com esterilização automática *in-situ*, motor de agitação e uma unidade de controlo incluindo, hardware e software para controlo de temperatura, pH, pO₂ e anti-espuma. O oxigénio dissolvido é controlado através do sistema de agitação e da injeção de ar.

Os fermentadores permitem estabelecer as condições óptimas de crescimento para os microrganismos, nomeadamente temperatura, pH, oxigénio dissolvido e permitem, se o desejarmos, manter concentrações estáveis de substratos e de produtos.

Para os ensaios realizados optou-se por fazer crescimentos em sistema fechado, ou seja, sem adição de qualquer composto ao meio de cultura (Madigan *et al*, 1997).

Para criar condições de microaerofilia no fermentador, favoráveis à expressão da citocromo oxidase *cbb₃*, foi necessário fazer crescimentos teste, delineando-se para cada um estratégias distintas, com o objectivo de otimizar o rendimento da cultura.

Na primeira estratégia optou-se por criar condições de crescimento semelhantes às utilizadas para as culturas dos pré-inóculo e inóculo. Seguidamente descrevem-se os procedimentos usados.

Foi feita a preparação de 22 l de meio de cultura, carga do fermentador e esterilização do meio. No final da esterilização o vácuo criado pelo arrefecimento do meio foi quebrado com ar, sendo esta a única altura em que foi injectado ar no sistema. Ao meio estéril foram adicionados os antibióticos e a arabinose. Procedeu-se à correcção do pH para 7.0 e foi feita a inoculação. O crescimento, com controlo de pH em contínuo, utilizando-se para o efeito HCl e NaOH 0.5 N, decorreu à pressão atmosférica num sistema fechado, sem entrada de gases. O oxigénio disponível para o crescimento era o que, à hora da inoculação existia na massa de ar presente dentro do fermentador, equivalente ao volume morto do vaso (18 l). A velocidade de agitação das pás foi de 100 rpm.

A segunda estratégia foi igual à primeira com excepção da velocidade de agitação das pás, que foi aumentada para 150 rpm.

Para a terceira estratégia os procedimentos relativos à preparação do meio, esterilização e inoculação foram os acima descritos. Neste crescimento tentamos manter uma pressão parcial de oxigénio entre 0% e 2%. Para manter a pO_2 dentro destes valores, activou-se o sistema de controlo de pO_2 em cascata, fazendo-se variar o caudal de ar de cúpula, entre 5 l/min e 30 l/min e a agitação entre 150 rpm e 300 rpm. O equipamento utilizado permite a injeção de ar no sistema por um “sparger” (dispersor de ar colocado na base do vaso do fermentador), ou através de uma válvula, no espaço vazio entre a tampa do fermentador e nível de carga (ar de cúpula).

A quarta estratégia difere das anteriormente descritas na medida em que se manteve um caudal de ar de 10 l/min (ar de cúpula) constante e agitação também constante a 150 rpm, com o objectivo de manter a pressão parcial de oxigénio igual ou inferior a 1%. Pretendíamos aqui uma transferência de oxigénio superior à obtida na primeira e segunda estratégia.

No final de cada crescimento teste, foi feita a análise do produto no laboratório de Metaloproteínas e Bioenergética do Instituto de Tecnologia Química e Biológica, para se avaliar os níveis de expressão do citocromo oxidase *cbb₃*, e concluir assim, se seria ou não necessário proceder a alterações das estratégias implementadas.

2.2.1.2 Monitorização do bioprocesso

O crescimento dos microrganismos pode ser avaliado por diferentes técnicas, como por exemplo contagem de células viáveis, avaliação do rendimento em massa celular, turbidimetria, análises químicas, número mais que provável (NMP) e curvas de crescimentos (Madigan *et al*, 1997). Para qualquer uma das opções referidas é necessário proceder à recolha de amostras ao longo do crescimento, em intervalos de tempo a definir.

Nos crescimentos efectuados, procedeu-se à avaliação da variação total de densidade óptica (DO) entre a inoculação e o final do crescimento (fundamentos do método descritos em Fareleira, 1986) e construção de curvas de crescimento representando a evolução do logaritmo das concentrações celulares ao longo do tempo.

Para a leitura da densidade óptica (DO) foi utilizado um espectrofotómetro Beckman DU-70. O comprimento de onda (λ) escolhido para efectuar a determinação da turbidez foi 600 nm (Wais, 2002). Foram utilizadas cuvets descartáveis de polysterol, de 1.5 e 3 ml de capacidade.

Tipicamente, o crescimento bacteriano desenvolve-se por quatro fases: de arranque, exponencial, estacionária e de morte celular. Durante as fases de arranque e exponencial verifica-se o crescimento exponencial da concentração celular, X (avaliado pelo número de células ou, equivalentemente, pela densidade óptica) em função do tempo (t) de acordo com

$$X = ae^{bt}$$

Logaritmizando, obtém-se $\ln X = \ln a + bt$, onde b representa o declive da recta e $\ln a$ a ordenada na origem. A constante b pode, por isso, interpretar-se como a variação de $\ln X$ por unidade de variação temporal, ou seja, representa a taxa de variação da concentração celular por unidade de tempo, vulgarmente designada por taxa de crescimento.

Por outro lado, repare-se que a constante a representa a concentração celular inicial, isto é, será o valor de X para $t=0$. Representando a taxa de crescimento por μ e designando a concentração celular inicial por X_0 , pode escrever-se

$$X = X_0 e^{\mu t} \Leftrightarrow \frac{X}{X_0} = e^{\mu t}$$

Estabelecendo $X = 2 X_0$ e logaritmando, obtém-se $t = \frac{\ln 2}{\mu}$, que define o tempo de duplicação (t_d), isto é, o tempo necessário para que a concentração celular inicial duplique.

A taxa específica de crescimento (μ), e o tempo de duplicação (t_d) ou tempo de geração, de uma população microbiana são parâmetros muito importantes em microbiologia, pois permitem prever a evolução da concentração de um microrganismo ao longo do tempo de crescimento exponencial. Estes parâmetros dão indicação sobre a resposta dos microrganismos às diversas condições ambientais incluindo a modificação do meio de cultura (Madigan *et al*, 1997). Estes parâmetros não correspondem a valores fixos, uma vez que são dependentes de factores genéticos e nutricionais, indicando o estado fisiológico da cultura microbiana.

Sempre que se procedeu à recolha de amostras para leitura da DO foi efectuado o registo dos valores de temperatura, pH, pO₂, caudal de ar (air flow) e agitação (stirrer).

Para a leitura do pH foi utilizado um eléctrodo de pH 405-DPAS-SC-K8S/120 da Mettler-Toledo. Na leitura do oxigénio dissolvido foi utilizada uma sonda da Broadley-James, modelo D400. Antes da esterilização do equipamento procedeu-se à calibração dos sensores de pH e de pO₂. O eléctrodo de pH foi calibrado para os valores de pH 4 e pH 7 utilizando-se para isso as soluções tampão da Mettler Toledo pH 4 (referência 51 340 057) e pH 7 (referência 51 340 050).

No final de cada crescimento, a massa celular foi determinada a partir da estimativa do peso húmido.

Ao longo do crescimento foi também feito um acompanhamento da cultura com observações ou microscópio, utilizando-se um microscópio Micros Áustria, modelo MC300.

2.3 Processamento de biomassa

Terminado o crescimento, o caldo foi refrigerado a 18°C.

A centrifugação foi o processo de separação utilizado para a recolha da biomassa. Depois do caldo refrigerado foi feita a descarga do fermentador e efectuada a centrifugação a 8500 rpm

durante 10 min a 4°C. Para a centrifugação utilizou-se um rotor JA-10 Fixed Angle Rotor numa centrífuga Beckman, modelo Avanti J-25I.

No final da centrifugação o sobrenadante foi removido e procedeu-se à recolha da biomassa. O peso húmido da biomassa obtida em cada crescimento foi determinado numa balança decimal.

Avaliado o rendimento da cultura, a biomassa foi resuspendingida em tampão e procedeu-se à sua disrupção. Para a disrupção celular foi utilizado um homogeneizador APV-2000, cuja pressão máxima de funcionamento é de 29.000 psi. A pressão utilizada para a disrupção das células foi de 16000 psi, tendo sido necessário efectuar três disrupções consecutivas do extracto para que a lise celular fosse eficaz.

3. Resultados e discussão

3.1 Optimização de condições de crescimento para ambiente microaerofílico e produção industrial de biomassa

Nos gráficos apresentados em cada uma das figuras, relativas ao processo de optimização das condições de crescimento de *B. japonicum*, para crescimentos em ambiente microaerofílico, estão representadas as variações da concentração de células, medida por turbidimetria (DO), em função do tempo, durante o crescimento exponencial.

3.1.1 Primeira estratégia

Na Figura 1 está representada a recta de regressão ajustada aos dados para a primeira estratégia de crescimento ($\ln(\text{DO}) = -2.920 + 0.025t$, $r^2 = 0.9356$, $p < 0.001$). A taxa de crescimento é de 0.025 h^{-1} e o tempo de duplicação nas condições proporcionadas foi de 27.7 horas. Tendo em conta que para um crescimento aeróbio de *B. japonicum*, um rizóbio de crescimento lento, o tempo de duplicação em meio ML, varia entre 6 e 8 horas (Jordan, 1984), constata-se que as condições de crescimento impostas têm um impacto significativo no tempo de duplicação, o que traduz uma diminuição considerável da actividade metabólica do microrganismo.

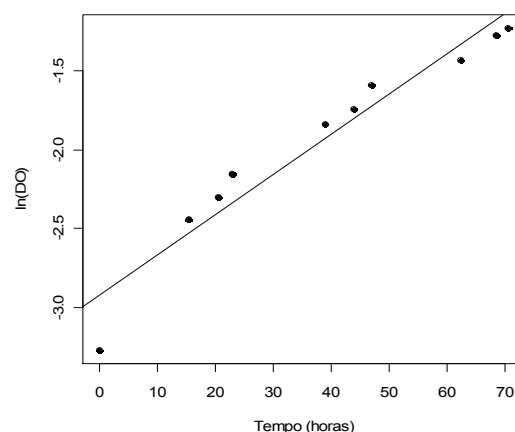


Figura 1. Crescimento de *B. japonicum* em meio PSY, 28°C, 100 rpm, pH 7.0 e caudal de ar 0 l/min.

O rendimento da cultura foi de 0.55 g de biomassa (peso húmido). Após disrupção e análise do extracto concluiu-se que nestas condições era expressa o citocromo oxidase *cbb₃*.

O objectivo do trabalho, a maior produção possível de biomassa com a proteína pretendida expressa, obrigou-nos ao delineamento de estratégias mais produtivas.

3.1.2 Segunda estratégia

Na expectativa de aumentar o rendimento e a eficácia do processo, decidiu-se, através da variação da velocidade de agitação, aumentar a transferência de oxigénio.

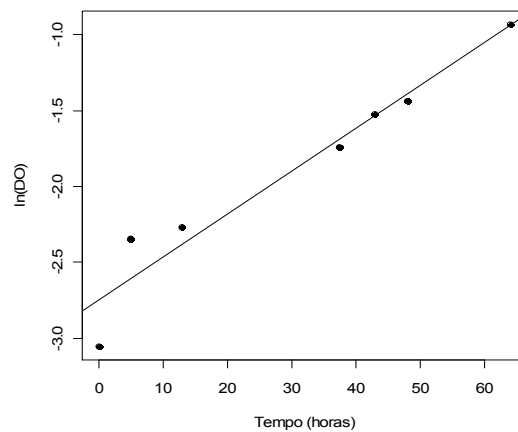


Figura 2. Crescimento de *B. japonicum* em meio PSY, 28°C, 150 rpm, pH 7.0 e caudal de ar 0 l/min.

Na Figura 2 está representado o crescimento de *B. japonicum* tendo-se usado uma recta ($\ln(\text{DO}) = -2.751 + 0.028t$, $r^2 = 0.9399$, $p < 0.001$). Também para este ensaio o resultado das análises relativo à expressão do citocromo oxidase *cbb₃* foi positivo (Veríssimo, 2008). Verificou-se contudo, uma diminuição muito significativa no tempo de crescimento, menos 48 horas que no ensaio descrito em 3.1.1, e que muito provavelmente se deve a uma maior transferência de oxigénio como resultado do aumento da velocidade de agitação. A taxa de crescimento de 0.028 h^{-1} , assim como a diminuição do tempo de duplicação da cultura para 24.8 horas, apontam para uma maior eficácia deste processo relativamente à primeira estratégia.

3.1.3 Terceira estratégia

Tendo-se verificado que se mantêm os rendimentos das culturas, da estratégia descrita em 3.1.1 para a descrita em 3.1.2, optou-se, neste terceiro ensaio, por melhorar a produtividade aumentando significativamente a transferência de oxigénio.

A curva de crescimento representada na figura 3 ($\ln(\text{DO}) = -2.554 + 0.034 t$, $r^2 = 0.9952$, $p < 0.001$), evidencia, quando comparada com as curvas de crescimento das Figuras 1 e 2, que a estratégia definida para este terceiro ensaio, nomeadamente a manutenção de uma pressão parcial de oxigénio de 2%, alterou o crescimento do *B. japonicum*.

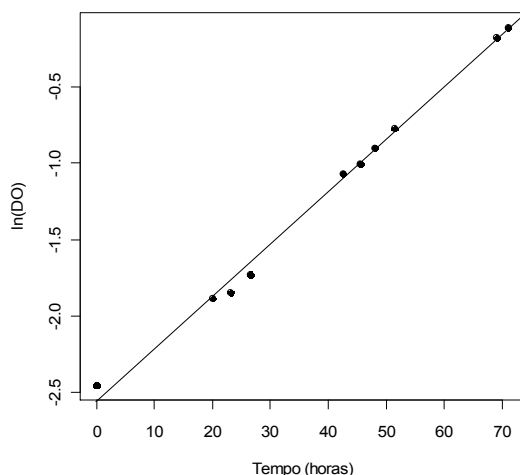


Figura 3. Crescimento de *B.japonicum* em meio PSY, 28°C, 150/300 rpm, pH 7.0 e caudal de ar a variar entre 10 e 30 l/min.

Em particular, obteve-se uma taxa de crescimento de 0.0342 h^{-1} e um tempo de duplicação 20.3 horas, que traduzem explicitamente as consequências das alterações causadas pela variação da concentração de oxigénio na eficácia metabólica do microrganismo. O rendimento da cultura foi de 1.41 g/l.

Contudo, o resultado da análise do extracto celular revelou que, a expressão do citocromo oxidase *cbb₃* diminuiu significativamente quando comparada com os resultados dos ensaios previamente descritos em 3.1.1 e 3.1.2.

3.1.4 Quarta estratégia

Face aos resultados obtidos nas estratégias anteriores, foi delineada uma quarta estratégia na expectativa de maximizar a expressão do citocromo oxidase *cbb₃*, aumentando o rendimento da cultura.

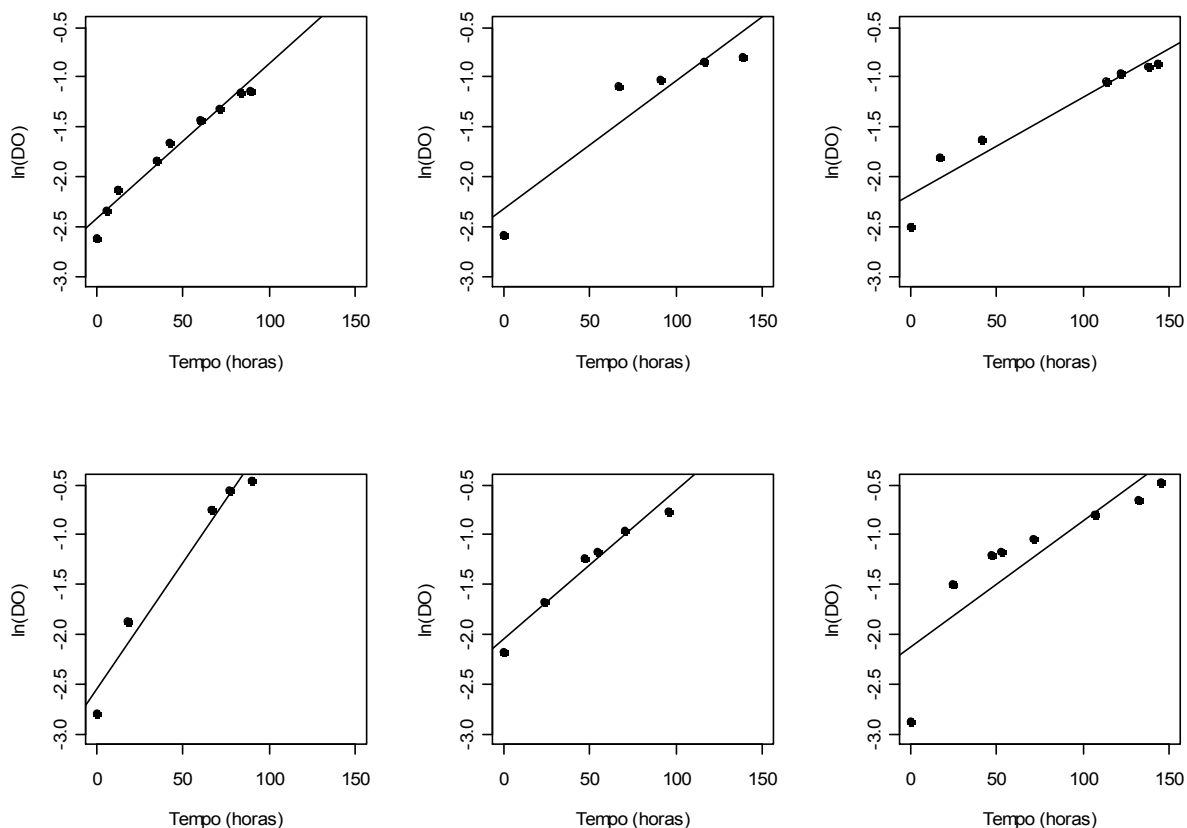


Figura 4. Representação de crescimentos de *B. japonicum* em meio PSY, 28°C, 150 rpm, pH 7.0 e caudal de ar de cúpula de 10 l/min.

A taxa de crescimento e o tempo de duplicação para os seis crescimentos são apresentados no Quadro 1. Encontramos referências para tempos de duplicação de *B. japonicum* de 10 a 14 horas (Kalita & Malek 2004), o que nos permite concluir que nas condições de crescimento utilizadas as estratégia acima definidas, se verifica efectivamente uma diminuição acentuada da actividade metabólica traduzindo-se num aumento dos tempos de duplicação. Estes resultados permitem-nos concluir que os crescimentos estão a decorrer em condições onde existe limitação de oxigénio e que este facto é responsável pela diminuição da actividade metabólica.

O rendimento médio das culturas, em biomassa foi de 0.71 g/l, o que representa, comparativamente com o rendimento obtido na primeira estratégia, um aumento de 0.16 g/l.

Verificou-se que a indução da expressão do citocromo oxidase *cbb₃* é activada pela criação de condições de crescimento em ambiente microaerófilo, durante cinco dias, pH 7.0 com agitação a 150 rpm e uma tensão de oxigénio menor que 1% (Veríssimo, 2008).

Quadro 1. Curvas de crescimento (escala logarítmica) e estimativas da taxa de crescimento e tempo de duplicação correspondentes à quarta estratégia

Crescimentos	$\ln(DO) = \ln(DO_0) + \mu t$	r^2	μ	td
4a	$\ln(DO) = -2.43 + 0.016 t$	0.97	0.016	43.32
4b	$\ln(DO) = -2.33 + 0.013 t$	0.87	0.013	53.32
4c	$\ln(DO) = -2.19 + 0.009 t$	0.92	0.009	77.02
4d	$\ln(DO) = -2.57 + 0.026 t$	0.96	0.026	26.66
4e	$\ln(DO) = -2.05 + 0.015 t$	0.96	0.015	46.21
4f	$\ln(DO) = -2.13 + 0.013 t$	0.75	0.013	53.32

Após a análise dos resultados, obtivemos uma taxa de crescimento média de 0.015 h⁻¹ e um tempo de duplicação médio de ≈50 horas, valores que serviram de referência, ao longo do processo de produção de células de *B. japonicum* à escala industrial, permitindo-nos intervir, se necessário, com o objectivo de manter as condições de crescimento favoráveis à expressão da citocromo oxidase *cbb₃*.

4. Conclusão

As sondas utilizadas para a leitura da pressão parcial de oxigénio no meio de cultura, não têm capacidade para detectar percentagens de oxigénio que se encontram dentro dos valores favoráveis à expressão do citocromo oxidase *cbb₃*, nomeadamente concentrações de oxigénio muito baixas, próprias de ambientes microaerófilos, semelhantes às condições existentes nos nódulos das leguminosas (≈ 3 a 22 nM de O₂) (Presing *et al.*, 1996). Esta condicionante obrigou-nos ao desenvolvimento de várias estratégias que, durante o processo de optimização, apenas nos permitiu encontrar as condições desejáveis, com base num processo de tentativa e erro.

Observou-se também que a expressão da citocromo oxidase *cbb₃* ocorre quando temos uma taxa de crescimento média de 0.015 h⁻¹. A maior produtividade, proteína expressa por grama de células, foi obtida através da implementação das condições de crescimento correspondentes à quarta estratégia, manutenção de um caudal de ar de cúpula de 10 l/min que manteve uma pressão parcial de oxigénio menor que 1% e pH 6 constante ao longo do crescimento, a qual foi utilizada na produção industrial.

III - Estudo de condições de crescimento de estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* e *Sinorhizobium melilotii*

1. Introdução e objectivos

A variabilidade entre estirpes de rizóbio é um importante factor a ter em consideração na selecção e preservação de culturas de rizóbio com interesse para a produção de inoculantes. A avaliação de características das colónias, capacidade de nodulação, eficiência na fixação e a competitividade entre estirpes para a formação de nódulos, são algumas das características avaliadas que ajudam à selecção das estirpes com potencial para serem utilizadas como inoculantes (Kober *et al.*, 2004).

Diferentes estirpes de rizóbios podem estabelecer relações simbióticas com um mesmo hospedeiro e a distinção entre cada uma delas pode ser feita pela avaliação da eficácia na fixação de azoto molecular, quando estas estirpes são inoculadas num mesmo hospedeiro.

Para justificar a utilização de uma estirpe como inoculante é contudo necessário proceder a outro tipo de observações, nomeadamente características relacionadas com a competitividade e a capacidade de se estabelecerem com sucesso nos solos e de promoverem, nas condições ambientais existentes nos locais onde se pretendem introduzir, simbioses eficazes no que respeita à nodulação e à fixação de azoto atmosférico (Fareleira, 1986).

Segundo Laranjo *et al.* (2002), as populações nativas de rizóbio são as que melhor adaptam às condições climáticas e de solo. Acresce que o processo de nodulação e a fixação simbiótica de azoto é fortemente influenciado por condições ambientais como valores extremos de temperatura e pH do solo, assim como pela elevada salinidade (Silva *et al.*, 2002).

A avaliação do potencial de estirpes autóctones de rizóbio em relação à eficiência, competitividade e adaptação às regiões sujeitas a altas temperaturas é importante no estudo da fixação simbiótica de azoto (Medeiros *et al.*, 2007).

A acidez do solo, considerada a maior ameaça à produtividade em muitas áreas do mundo (Rodrigues, 2008), afecta todos os aspectos da nodulação e fixação biológica de azoto, desde a sobrevivência e multiplicação do rizóbio no solo, até ao processo de infecção e desenvolvimento do nódulo e finalmente a actividade de fixação biológica de azoto (Graham, 1992). Poucas

estirpes de rizóbio são capazes de crescer a níveis de pH menores que 4.5 (Stralioetto & Runjanek, 1999).

Para a maioria das estirpes de rizóbio regista-se que a temperatura óptima de crescimento varia entre os 25° e os 30°C e os valores de pH mais favoráveis variam entre pH 6 e pH 7 (Somasegaran & Hoben 1994). A selecção de estirpes de rizóbio tolerantes à acidez tem melhorado notavelmente a produtividade das leguminosas em solos ácidos (Rodrigues, 2007), o que evidencia a necessidade de se procederem a ensaios de tolerância, dos rizóbios, aos valores extremos de pH.

Relativamente à concentração salina, de um modo geral, os efeitos prejudiciais são mais evidentes, particularmente em relação aos efeitos da concentração de iões específicos do que ao efeito osmótico. Neste contexto, o NaCl tem sido considerado um bom indicador da tolerância de bactérias aos sais (Xavier *et al*, 2007), o que nos levou a utilizar este composto na realização dos testes de avaliação de tolerância à salinidade. O crescimento da maioria das estirpes de rizóbio é inibido por concentrações de 100 mM de NaCl, enquanto que algumas estirpes podem tolerar concentrações de 300 mM (Embalomatis *et al*, 1994) ou mesmo 1 M de NaCl (Medeiros *et al*, 2007). Este problema é importante uma vez que a FAO estima que anualmente se percam cerca de 1 a 5 milhões de hectares e 1 milhão de toneladas de grão devido ao aumento da salinidade nos solos agrícolas.

Objectivos

Tendo em consideração as crescentes restrições à aplicação de fertilizantes químicos, nomeadamente azotados, e usufruindo da experiência adquirida em trabalhos já realizados na área da microbiologia e biotecnologia, nomeadamente com o trabalho realizado com o *B. japonicum*, descritos na primeira parte do trabalho, o objectivo desta segunda parte do trabalho consistiu em optimizar condições de crescimento de estirpes autóctones de *Rhizobium* (uma estirpe proveniente de trevo subterrâneo, uma estirpe de luzerna anual e outra de luzerna perene da colecção do Laboratório de Microbiologia da antiga Estação Florestal Nacional, actual Instituto Nacional de Recursos Biológicos) com vista à produção de inoculantes à escala industrial.

2. Materiais e métodos

2.1 Materiais

2.1.1 Material biológico

As estirpes de *Rhizobium* (designação genérica das estirpes estudadas) utilizadas neste trabalho foram a 123Ts2-*Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* isolada de trevo subterrâneo, a 19Ms-*Sinorhizobium meliloti* isolada de *Medicago sativa* (luzerna perene) e a 55Mp-*Sinorhizobium meliloti* isolada de *Medicago polymorpha* (luzerna anual).

2.1.2 Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados foram os seguintes:

Meio de Agar manitol-levedura (AML) (Vincent, 1970), composição por litro:

K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0.2g
NaCl.....	0.1g
Manitol.....	10g
Extracto de Levedura.....	0.4g
Agar.....	15g

No final da preparação do meio o pH foi corrigido para 6.8 com NaOH.

Esterilização do meio por autoclavagem durante 15 minutos a 121°C.

Meio caldo manitol-levedura (CML) (Vincent, 1970), composição por litro:

K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0.2g
NaCl.....	0.1g
Manitol.....	10g
Extracto de Levedura.....	0.4g

No final da preparação do meio o pH foi corrigido para 6.8 com NaOH.

Esterilização do meio por autoclavagem durante 15 minutos a 121°C.

Meio AML com Vermelho de Congo (VC) a 0.1% W/V:

AML.....990 ml

VC*.....10 ml

*Solução de Vermelho do Congo (VC): 0.25 g de VC em 100 ml de água destilada. A solução é esterilizada por autoclavagem e adicionada ao meio AML estéril.

Meio AML com Azul de Bromotimol (BTB), composição por litro:

AML.....1000 ml

BTB*.....5 ml

Correcção do pH para 6.8

Solução Azul de Bromotimol (BTB): 0.5 g BTB em 100 ml de Etanol. O BTB é adicionado ao meio AML antes da esterilização.

Meio de triptona- levedura (TY) (Beringer, 1984), composição por litro:

Triptona.....5g

Extracto de Levedura.....3g

Água destilada.....990 ml

Solução CaCl₂*.....10 ml

Esterilização do meio por autoclavagem durante 15 minutos a 121°C.

Fazer à parte solução concentrada, 14 g de CaCl₂/100ml de água destilada, e esterilizar separadamente. Adicionar ao meio antes de inocular.

Meio de triptona- levedura (Beringer, 1984), duplamente concentrado (2TY).

Meio de triptona- levedura (Beringer, 1984), suplementado com 1% de glucose (TYG).

2.2 Métodos

2.2.1 Delineamento experimental e análise estatística

Neste estudo estudaram-se os factores temperatura (com níveis 26°, 28°, 30° e 32°C), pH (na gama 5 - 8, com incrementos unitários), salinidade (com níveis 0, 50, 100 e 150 mM de NaCl) e concentração de nutrientes no meio de cultura (usando meios sucessivamente mais ricos, TY, 2TY e TYG). A análise efectuada incluiu apenas uma fracção do conjunto total de combinações factoriais dos diversos níveis dos factores. Este tipo de delineamento experimental, designado por *Delineamento Factorial Fraccionado* (Gomez & Gomez, 1984) foi utilizado por o número total de combinações dos níveis dos 4 factores ser demasiado elevado para a sua implementação prática.

Para o estudo do efeito da temperatura e pH sobre o crescimento microbiano considerou-se coexistência de cada nível de um dos factores com todos os níveis do outro factor.

A análise dos factores salinidade e concentração de nutrientes foi feita sob um único cruzamento entre a temperatura e o pH, para cada uma das estirpes. A análise estatística da influência dos factores sobre os valores médios da variável resposta (neste caso, a taxa de crescimento) foi feita utilizando a Análise de Variância. Quando registados efeitos significativos recorreu-se ao Teste de Tukey para efectuar as comparações múltiplas de médias. Em todos os testes estatísticos consideraram-se existir diferenças significativas para $p \leq 0.05$ (segundo Casella & Berger (2002) o termo *p-value*, ou simplesmente *p*, designa o menor valor de significância para o qual os dados observados conduzem a rejeição da hipótese nula subjacente ao teste estatístico).

2.2.2 Caracterização morfológica das estirpes de *Rhizobium*

As estirpes estudadas, foram caracterizadas em meio de AML, pH 6.8, com Vermelho do Congo (VC) e meio AML, pH 6.8 com Azul de Bromotimol (BTB). As características culturais observadas foram a transparência, forma, borda, consistência do muco, mudança do pH após crescimento, avaliado por alteração de cor do indicador, e observação do indicador Vermelho do Congo.

2.2.2.1 Caracterização de colónias com Vermelho do Congo

O Vermelho do Congo (VC) é um corante com propriedades fungicidas que facilita a distinção entre estirpes de rizóbios e contaminantes. Os rizóbios, quando incubados no escuro, geralmente formam colónias brancas ou absorvem muito pouco o VC (Bloem *et al.*, 2002), existem no entanto exceções, pois a espécie *Sinorhizobium meliloti* absorve o VC (Somasegaran, 1994).

As estirpes são incubadas no escuro, em AML com Vermelho do Congo durante 3 dias a 28°C. No final do período de incubação as colónias são avaliadas relativamente à sua uniformidade. A constituição de “stocks” de rizóbio depende do estado de uniformidade da biomassa. As culturas puras são novamente repicadas para frascos ou placas com meio AML e conservadas a 4°C (Rodrigues, 2008).

2.2.2.2 Caracterização de colónias com Azul de Bromotimol

O Azul de Bromotimol é um indicador de pH, que em solução ácida fica amarelo, em solução básica fica azul e em solução neutra fica verde (Figura 5). É um indicador adequado para determinações de ácidos e bases fracos, preferencialmente em pH próximo de 7 (Mendham, 1981).



Figura 5. Alteração da cor do indicador BTB devido à variação do pH.

As estirpes estudadas foram incubadas em placas AML com BTB, a 28°C durante três dias, para perceber as alterações de pH causadas no meio de cultura resultantes do crescimento dos microrganismos. Os rizóbio de crescimento lento alcalinizam o meio, ficando este azul, enquanto

os de crescimento rápido acidificam o meio, ficando o meio de cor amarela (Somasegaran, 1994, citado por Rodrigues, 2008).

2.2.3 Manutenção e preservação de inóculos em culturas activas

Durante a realização do trabalho, as três estirpes de rizóbio utilizadas, foram mantidas em estado de cultura activa, em meio AML e conservadas a 4°C, após avaliada a uniformidade de cada uma das estirpes em placas AML com VC. A preservação de culturas de rizóbio em meio sólido como AML, é o processo mais conveniente, pois permite a manutenção da cultura em perfeito estado de conservação. As culturas de rizóbio, podem ser mantidas durante 6 meses se conservadas a 15°C e durante 2 anos se conservadas a 2°C (Vincent, 1970).

Os trabalhos de preparação de placas e manuseamento das culturas foram feitos numa câmara de fluxo laminar CRUMA 670 FL, previamente esterilizada por ultra violeta (UV) durante 20 minutos.

2.2.4 Crescimento e monitorização do bioprocesso

Para a optimização das condições de crescimento das três estirpes autóctones de rizóbio, consideradas com elevado potencial para serem utilizadas como inoculantes, foi inicialmente realizado um ensaio para determinar a relação entre dois métodos de avaliação do crescimento, nomeadamente a turbidimetria e a contagem de células.

Numa segunda fase do trabalho efectuou-se uma série de ensaios laboratoriais em pequena escala, com vista à determinação das condições óptimas de crescimento, para cada uma das estirpes. Os crescimentos foram realizados em meio de cultura TY, fazendo-se variar a temperatura, pH e concentração salina. Para a realização dos ensaios, inicialmente foi preparado meio CML. Verificou-se contudo, que para as estirpes utilizadas este meio de cultura favorece a formação de agregados. Por esta razão tornou-se necessário optar por outro meio de cultura. Utilizou-se o meio TY (descrito em 2.1.2).

Foram feitos mais dois ensaios em meio TY suplementado com 1% de glucose (Rebah, 2007) e a utilização de meio TY duplamente concentrado (2TY), com o objectivo de avaliar o impacto de cada uma das estratégias no rendimento das culturas.

Finalmente, depois de analisados os resultados, procedeu-se à optimização das condições de crescimento em fermentadores e à escala piloto, admitindo como valores de referência para as variáveis com influência directa no rendimento das culturas, os resultados obtidos na segunda fase do trabalho.

2.2.4.1 Determinação da relação entre densidade óptica e o número de células

A avaliação do crescimento, obtida por um método indirecto, como a turbidimetria (Fareleira, 1986), e por um método directo como a contagem de células por mililitro de caldo de cultura, pode relacionar-se medindo a suspensão bacteriana pelos dois métodos em simultâneo e estudando a correlação entre os valores obtidos em cada um dos processos de medição. A correlação estuda o grau de associação entre variáveis cuja relação pode ou não ser de dependência funcional (Maroco & Bispo, 2003). Existe, dentro de certos limites, uma relação linear entre a Absorvância ou DO da cultura e o número total de células por mililitro de suspensão, ou seja a concentração celular. Contudo, para concentrações celulares muito densas é frequentemente necessário diluir as culturas de modo a que todos os valores de DO medidos estejam incluídos na parte linear da curva DO *versus* concentração celular.

Para a leitura da DO procedeu-se como o descrito em 2.2.1.2.

Na contagem de células por ml (ZZ/ml) utilizou-se um hemocitometro, Guaringia Improved Doble Neubauer Ruling (metodologia descrita em Brock, 1997). Foi feita a contagem de células em nove campos, cada um com 0.004 mm^3 . O volume total a considerar foi de 0.036 mm^3 . Determinou-se o número médio de células por campo ($\bar{x}$) e procedeu-se ao cálculo de modo a obter o número de células por mililitro (C). Sempre que foi necessário proceder a diluições de modo a tornar possível a realização da contagem, para os cálculos finais, teve-se em consideração o factor de diluição (f). Assim, o número de células por mililitro foi calculado através de:

$$C = \frac{\bar{x}}{4 \times 10^{-6}} \times f$$

Foram preparados inóculos em duplicado de cada uma das estirpes. Cada inóculo foi feito num erlenmeyer contendo 20 ml de meio e incubado a 28°C durante 20 horas. Os ensaios foram feitos também em duplicado contendo cada erlenmeyers com capacidade para 250 ml, 100 ml de meio de cultura. A percentagem de inóculo utilizada em cada ensaio foi de 2%.

As culturas foram crescidas numa incubadora orbital à temperatura de 28°C com 180 rpm de agitação. Durante o crescimento procedeu-se à recolha de amostras em ambiente estéril, na câmara de fluxo laminar e foi feita a leitura da DO e a contagem de células.

No final do crescimento procedeu-se à análise dos dados recolhidos por regressão linear.

2.2.4.2 Crescimentos

2.2.4.2.1 Crescimentos à escala laboratorial

Com o objectivo de perceber quais as condições mais favoráveis ao crescimento de cada uma das estirpes de rizóbio em estudo, foram feitos vários ensaios laboratoriais para avaliar o crescimento microbiano, em diferentes condições de temperatura, pH, concentração salina e diferentes meios de cultura.

Com base em estudos já realizados por Rodrigues (2008) e dado que segundo Medeiros *et al.* (2007) a maioria das estirpes de rizóbio apresentam bons padrões de crescimento a 28°C, entendeu-se assumir os valores próximos dos 28°C, mais precisamente 26, 28, 30 e 32°C para a realização destes ensaios

As relações de tolerância à salinidade tem sido estudada por diversos autores que afirmam que o nível de tolerância destas bactérias se encontra numa escala entre 0 e 60 g/l⁻¹ de NaCl (CHEN *et al.*, 1995). Contudo, uma vez que, o crescimento da maioria das estirpes de rizóbio é inibido a concentrações de 100 mM de NaCl (Embalomatis, 1994; Mohammed, 1991; Muller, 1995, citado por Rodrigues, 2008), utilizaram-se valores da concentração salina de 0, 50, 100 e 150 mM NaCl.

De um modo geral, as estirpes de rizóbio de crescimento rápido, são pouco tolerantes a valores de pH baixo (Zahran, 1999), o que nos levou a considerar o pH 5 como valor mínimo a testar para cada uma das estirpes de rizóbio em estudo.

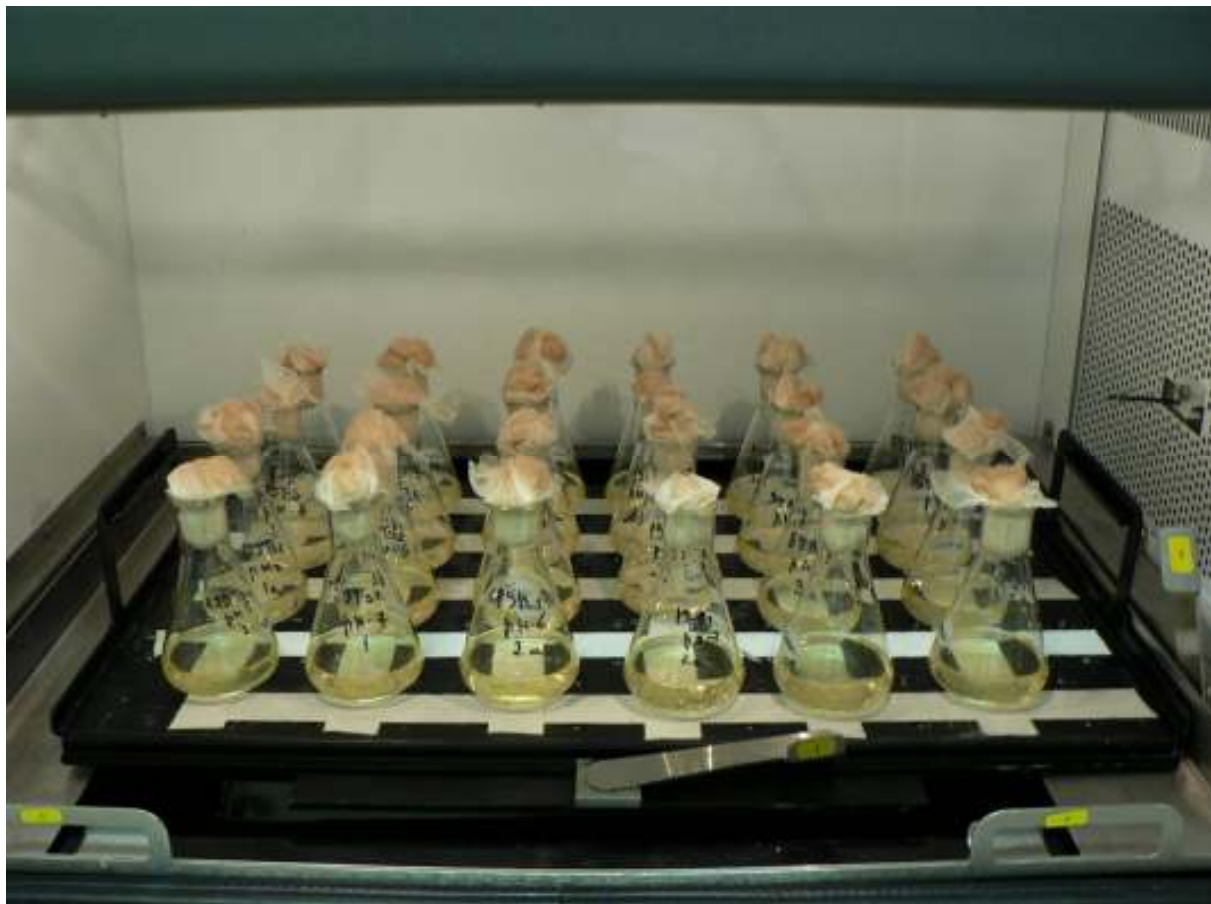


Figura 6. Erlenmeyers na incubadora com agitação orbital

Foram realizados ensaios em meio de cultura ML, meio TY, 2TY e meio TYG.

Este trabalho teve como finalidade a obtenção de informação fundamental, para a realização dos primeiros testes de crescimento à escala piloto das estirpes autóctones de rizóbio.

As condições de crescimento testadas encontram-se descritas no Quadro 2.

Quadro 2. Factores e níveis estudados

Factor estudado	Níveis
Estirpe	123Ts2
	19Ms
	55Mp
Temperatura °C	26
	28
	30
	32
PH	5
	6
	7
	8
Concentração salina NaCl mM	0
	50
	100
Meio de cultura	150
	ML
	TY
	2TY
	TYG

Os valores de pH referidos e utilizados em cada ensaio, são valores iniciais para cada crescimento.

Os meios de cultura foram preparados tal como descrito em 2.1.2.

Após a esterilização, foram distribuídos 100 ml de meio por cada erlenmeyer com 250 ml de capacidade.

Foi feito um pré-inóculo para cada uma das estirpes. A preparação dos pré-inóculo consistiu em retirar uma ansada de cada uma das culturas em “stock” e resuspende-la em meio líquido. Os pré-inóculo foram incubados a 28°C e 150 rpm.

Foi utilizado 2% de volume de inóculo para cada ensaio.

2.2.4.2.2 Crescimentos à escala piloto

Com a realização dos crescimentos à escala piloto, procuramos executar um trabalho com um nível de controlo, das condições técnicas e operacionais do bioprocesso, facilmente reprodutíveis. Com estes crescimentos pretende-se assegurar a reprodutibilidade do bioprocesso para viabilizar a produção industrial.

Foram preparados inóculos em erlenmeyers de 250 ml, contendo 20 ml de meio de cultura TY, e inoculados com uma porção de biomassa retirada com uma alça de inoculação, de placas com culturas em stock. Estes inóculos foram colocados a 28°C, 180 rpm durante 20 horas.

Os crescimentos feitos em fermentador decorreram em sistema fechado (Batch) tal como descrito em 2.2.1.1. Foram utilizados fermentadores (Biostat B, B. Braun Germany) (Figura 7). O volume final de cada ensaio em fermentador foi de 1 l.



Figura 7. Fermentador Braun e sistema de controlo Biostat B

Para a preparação do meio de cultura neste equipamento, foi necessário recorrer à esterilização por calor húmido, efectuada em autoclave. O fermentador, depois de montado e contendo o meio de cultura, é introduzido numa câmara com vapor de água saturado à pressão de 1 atm e uma temperatura de 121°C. O tempo necessário para a esterilização, a esta temperatura,

depende da natureza do material. Para uma esterilização eficaz dos fermentadores de 2 l, o tempo de esterilização é de 60 min.

Para além dos sensores de pH e pO_2 , os fermentadores dispõem de motor de agitação, uma sonda para controlo de temperatura, três sistemas de adição que permitem a ligação, após esterilização, do sistema para controlo de pH, nomeadamente de um frasco com ácido (HCL 0.5 N) e outro com base (NaOH 0.5 N). Foi ainda acoplado ao fermentador um sistema de amostragem, indispensável para a monitorização do bioprocesso.

Depois do equipamento estéril e estabelecidas as ligações entre o fermentador e a unidade de controlo Biostat B, esta foi programada para gerar as condições de crescimento, nomeadamente temperatura, pH, agitação e caudal de ar, necessários a cada um dos crescimentos realizados. Uma vez estabilizadas as condições de crescimento a testar, antes da inoculação foi activado o sistema de aquisição automático de dados.

As operações de ligação do sistema de controlo de pH, inoculação e recolha de amostras, implicam a “abertura” do fermentado, existindo inevitavelmente riscos de contaminação. Para a minimização destes riscos todas estas operações tiveram lugar numa câmara de fluxo laminar Holten, previamente esterilizada por radiação UV.

2.2.4.3 Monitorização dos crescimentos

Os crescimentos em fermentador foram monitorizados por leitura da densidade óptica DO, (método descrito em 2.2.1.2) e foi feita a aquisição contínua de dados utilizando um sistema universal de controlo de bioprocessos “Universal Bio-processo Control System – UBICON (Electronic System Design, Hannover, Germany). Este sistema de controlo, inclui hardware e software de interface, com ligação ao equipamento (Fermentador) via CAN field-bus (ISO 11898). Este sistema de aquisição de dados, permite que se faça um acompanhamento da evolução da cultura por observação das curvas de variação do pH e pO_2 .

2.2.5 Processamento de biomassa

No final de cada crescimento procedeu-se à recolha de biomassa para avaliar o rendimento da cultura em peso húmido. O processo de separação utilizada foi a centrifugação tal como em 2.3.

3. Resultados e discussão

3.1 Caracterização de colónias com Vermelho do Congo

Os testes realizados em placas com meio ML e VC, para as três estirpes de *Rhizobium* estudadas, 123Ts2, 19Ms e 55Mp, revelaram culturas homogêneas com características próprias que nos permitem uma fácil distinção entre cada uma das estirpes. Todas as culturas absorvem ligeiramente o VC.

Na Figura 8, podem ser observadas colónias das estirpes de *Rhizobium* (123Ts2, 19Ms e 55Mp) onde se observam nas colónias formadas, bordas homogêneas com elevação notória e expressiva produção de hexapolissacaridos pela estirpe 123Ts2. É clara uma maior absorção de VC pela estirpe 123Ts2 e formação de zonas de contraste para a 55Mp. Fenotipicamente a estirpe 55Mp é completamente distinta da 123Ts2 e da 19Ms. A 19Ms é a que revela uma menor absorção de VC.

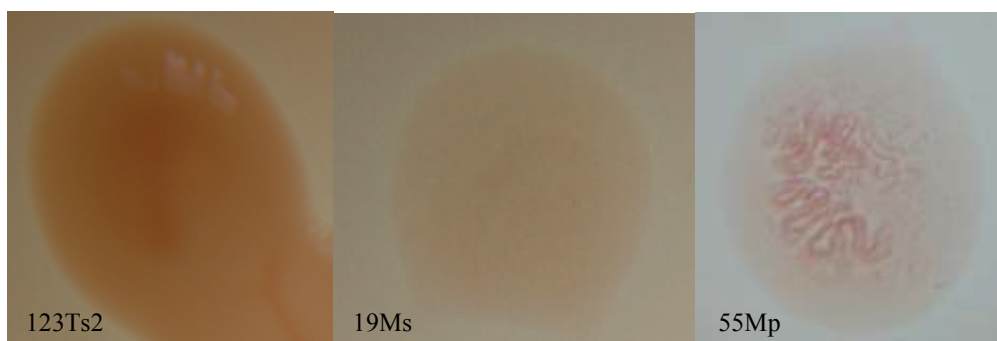


Figura 8. Colónias isoladas das estirpes 123Ts2, 19Ms e 55Mp crescidas em ML com VC

3.2 Caracterização de colónias com Azul de Bromotimol

Das três estirpes autóctones de rizóbio estudadas, todas elas revelaram que quando crescidas em meio ML com BTB acidificam o meio, razão pela qual o corante passa a amarelo nas zonas onde há crescimento.

Na figura 9 pode-se observar a variação da coloração do meio com BTB onde é mais notória a variação da cor de verde para amarelo para as estirpes 123Ts2 e 19Ms.

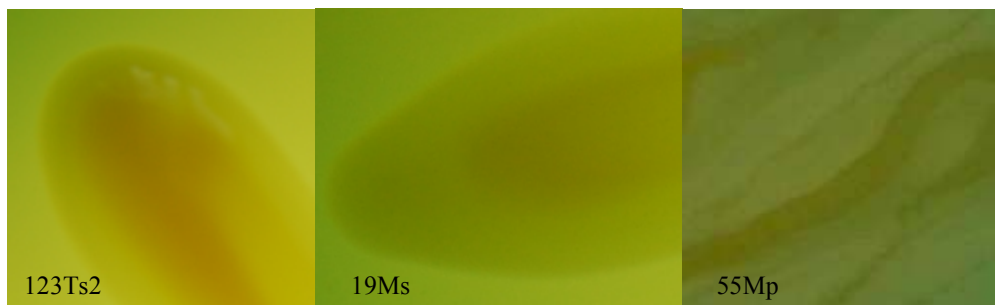


Figura 9. Culturas das estirpes 123Ts2, 19Ms e 55Mp em meio ML com BTB

Todas as estirpes formaram colónias em menos de 24 horas o que segundo Vincent (1970) nos permite caracterizar as estirpes como sendo de crescimento rápido.

3.3 Ensaio em meio CML

Verificou-se que, as culturas das estirpes de *Rhizobium* 123Ts2, 19Ms e 55Mp, crescidas em meio de cultura CML, formam agregados celulares (Figura 6).

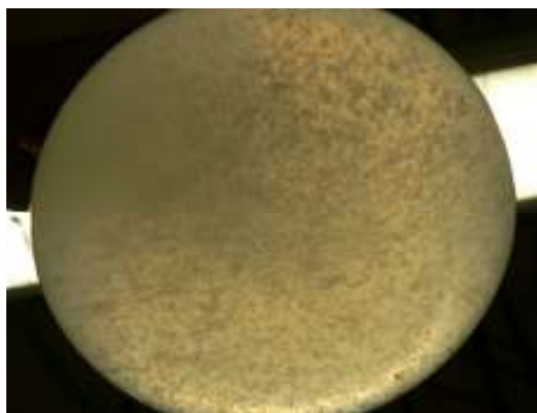


Figura 10. Crescimento em meio CML da estirpe 123Ts2, onde se pode observar a formação de agregados.

A formação de agregados não permite a monitorização do crescimento por turbidimetria nem por contagem de células, dado que não é possível nestas condições obter uma solução coloidal, condição sem a qual os dois métodos de detecção que pretendemos utilizar (Espectrofotometria e contagem de células ao microscópio) não se aplicam.

Segundo Fareleira (1986), a floculação de culturas de bactérias Gram-negativas tem sido atribuída à formação de fibrillas exocelulares de celulose, o que foi já verificado em relação às bactérias *Rhizobium*. Esta ocorrência não se regista para crescimentos em meio de cultura TY.

3.4 Determinação da relação entre a densidade óptica e o número de células

Para determinar a relação existente entre este dois métodos de avaliação do crescimento, decidiu-se realizar os ensaios em meio de cultura CML. Após algumas horas de crescimento em CML era evidente a formação de agregados descrita em 3.3. Para contornar este problema optamos por realizar os crescimentos em meio TY, onde a ocorrência referida não foi detectada.

Os resultados obtidos encontram-se no Quadro 3, confirmando uma relação linear significativa ($p < 0.001$), verificando-se existir uma forte correlação positiva entre o número de células e a densidade óptica, em cada uma das estirpes estudadas.

Quadro 3. Relação entre a densidade óptica (y) e o número de células (x) para as três estirpes estudadas.

Estirpe	Regressão	r^2	p
23Ts2	$y = 1.43 \times 10^{-9} x$	0.9479	< 0.001
19Ms	$y = 1.71 \times 10^{-9} x$	0.9971	< 0.001
55Mp	$y = 1.27 \times 10^{-9} x$	0.9750	< 0.001

3.5 Crescimentos à escala laboratorial, optimização de condições de crescimento

3.5.1 Estudo de interacção pH/temperatura para a estirpe de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* 123 Ts2

Na Figura 7, estão representadas as curvas de crescimento da estirpe 123Ts2 sob as diversas condições de temperatura e pH estudadas.

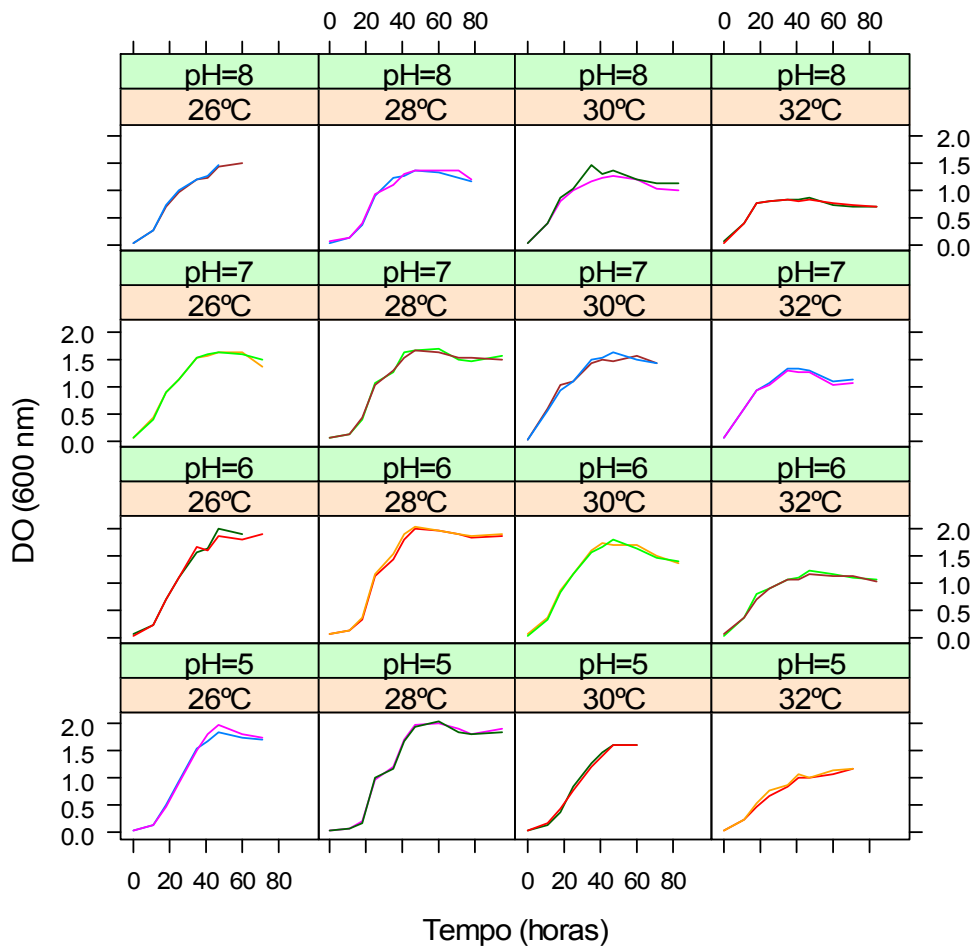


Figura 11. Curvas de crescimento (variação da densidade óptica em função do tempo), relativas aos ensaios em pequena escala, para a estirpe de rizóbio 123Ts2.

Com base nestas curvas foram seleccionadas as fases de crescimento exponencial, com vista à determinação das taxas de crescimento e tempos de duplicação, sob cada uma das condições estudadas. Os resultados médios obtidos para os dois parâmetros encontram-se resumidos no Quadro 4.

Quadro 4. Valores médios da taxa de crescimento (μ) e tempo de duplicação (td) relativos aos ensaios em pequena escala para a estirpe 123Ts2 sob os diferentes pH e temperaturas testados.

Temp. (°C)	pH	μ	td
26	5	0.131	5.297
	6	0.145	4.795
	7	0.134	5.169
	8	0.138	5.021
28	5	0.100	6.945
	6	0.132	5.247
	7	0.130	5.319
	8	0.128	5.427
30	5	0.087	8.005
	6	0.108	6.443
	7	0.099	6.971
	8	0.102	6.814
32	5	0.083	8.374
	6	0.073	9.525
	7	0.127	5.461
	8	0.125	5.529

O Quadro 4 e a Figura 12(a) mostram as da taxa de crescimento para os vários níveis de temperatura. O gráfico (a) da Figura 12 evidencia uma tendência para a diminuição dos valores da taxa de crescimento com o aumento da temperatura. Por outro lado, no gráfico (b) da Figura 12, observa-se que a taxa de crescimento tende a aumentar com o pH, embora os valores medianos para pH 6, 7 e 8 sejam bastante próximos.

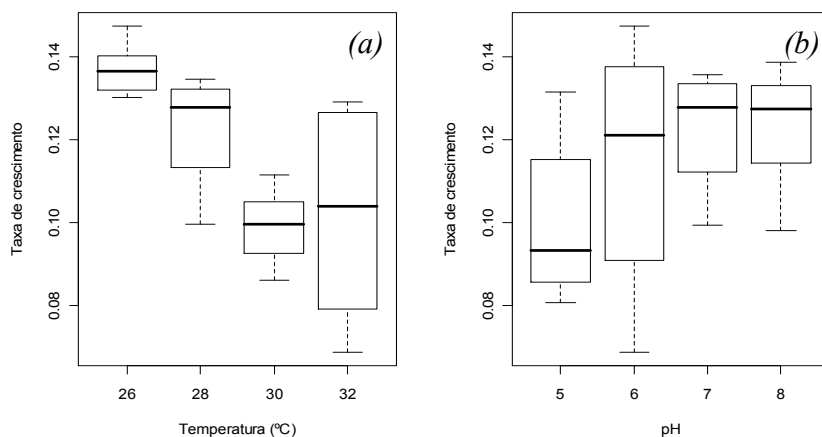


Figura 12. Distribuição dos valores da taxa de crescimento (a) em função da temperatura (°C) e (b) em função do pH.

A comparação estatística dos valores médios revelou um efeito significativo quer da temperatura ($F(3,16) = 208.5, p < 0.001$) quer do pH ($F(3,16) = 76.5, p < 0.001$) sobre a taxa de crescimento. Os testes de comparações múltiplas de médias (Quadro 5), revelaram que as taxas

médias observadas às temperaturas de 26°C ($\mu = 0.1369$) e 28°C ($\mu = 0.1225$) são significativamente mais elevadas do que todas as restantes e que os valores médios entre 30°C ($\mu = 0.0989$) e 32°C ($\mu = 0.1021$) não diferem significativamente entre si ($p = 0.3093$).

Quadro 5. Valores de *p-value* relativos às comparações múltiplas de médias (Teste de Tukey) para o factor temperatura

Temperatura	26°C	28 °C	30 °C	32 °C
26 °C	-	0.001	0.001	0.001
28 °C	-	-	0.001	0.001
30 °C	-	-	-	0.3092
32°C	-	-	-	-

“***” Diferenças significativas a 0.01 ($p < 0.01$).

Relativamente ao pH (Quadro 6), verificou-se que as taxas médias a pH 5 são inferiores a todas as restantes ($p < 0.001$). Os valores das taxas médias obtidas a pH 6 são também significativamente diferentes das obtidas a pH 7 ($p = 0.001$) e a pH 8 ($p < 0.001$). Entre as taxas médias observadas a pH 7 e 8 não se registam diferenças significativas ($p = 0.9897$).

Quadro 6. Valores de *p-value* relativos às comparações múltiplas de médias (Teste de Tukey) entre os diferentes níveis de pH.

pH	5	6	7	8
5	-	0.001	0.001	0.001
6	-	-	0.001	0.001
7	-	-	-	0.989
8	-	-	-	-

“***” Diferenças significativas a 0.01 ($p < 0.01$).

A análise dos dados revelou também a existência de uma interacção significativa ($F(9,16) = 36.2$, $p < 0.001$) entre os factores temperatura e pH (Figura 13). Observando a Figura 13, conclui-se que de facto a variação da taxa média de crescimento em função do pH depende da temperatura (e vice-versa). Em particular, verificou-se que a taxa de crescimento média, sob as temperaturas de 26°C a 30°C, aumenta quando o pH varia de 5 para 6 e mantém-se sensivelmente constante entre os pH 6 e 8. Já à temperatura de 32°C, observa-se outro comportamento, sendo os valores das taxas de crescimento sob pH 5 e 6 inferiores aos registados a pH 7 e 8.

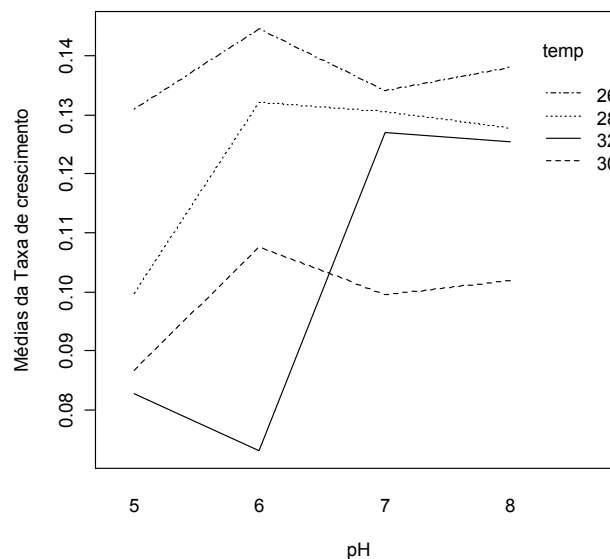


Figura 13. Curvas de interacção entre pH e temperatura e seu efeito sobre a taxa de crescimento para a estirpe 123Ts2.

Com base nos resultados obtidos para as taxas de crescimentos da estirpe 123Ts2 poderíamos concluir que as condições mais favoráveis à multiplicação celular se verificam para os crescimentos realizados a 26°C e pH 6, visto que as taxas médias observadas às temperaturas de 26°C ($\mu = 0.1369$) e 28°C ($\mu = 0.1225$) a pH são significativamente mais elevadas do que todas as restantes (Figura 13). Esta conclusão seria válida se a apreciação dos resultados apenas se baseasse na análise das taxas de crescimento. Contudo, e como já foi dito, a taxa específica de crescimento e o tempo de duplicação ou tempo de geração, de uma população microbiana, permite-nos apenas prever a evolução da concentração de um microrganismo ao longo do tempo de crescimento exponencial (Madigan, *et al*, 1997). Após a fase exponencial ainda se verifica crescimento celular, que pode ou não ser significativo, dependendo das condicionantes do sistema (pH, produção de metabolitos tóxicos, disponibilidade de nutrientes, etc). Após a apreciação das curvas de crescimento da estirpe 123Ts2 sob as diversas condições de temperatura e pH estudadas (Figura 11), verificou-se que as concentrações celulares mais elevadas foram obtidas para os crescimentos realizados a 28°C e pH 6.

3.5.2 Estudo de interacção pH/temperatura para a estirpe de *Sinorhizobium meliloti* 19Ms

Na Figura 14 estão representadas as curvas de crescimento da estirpe 19Ms sob as diversas condições de temperatura e pH estudadas.

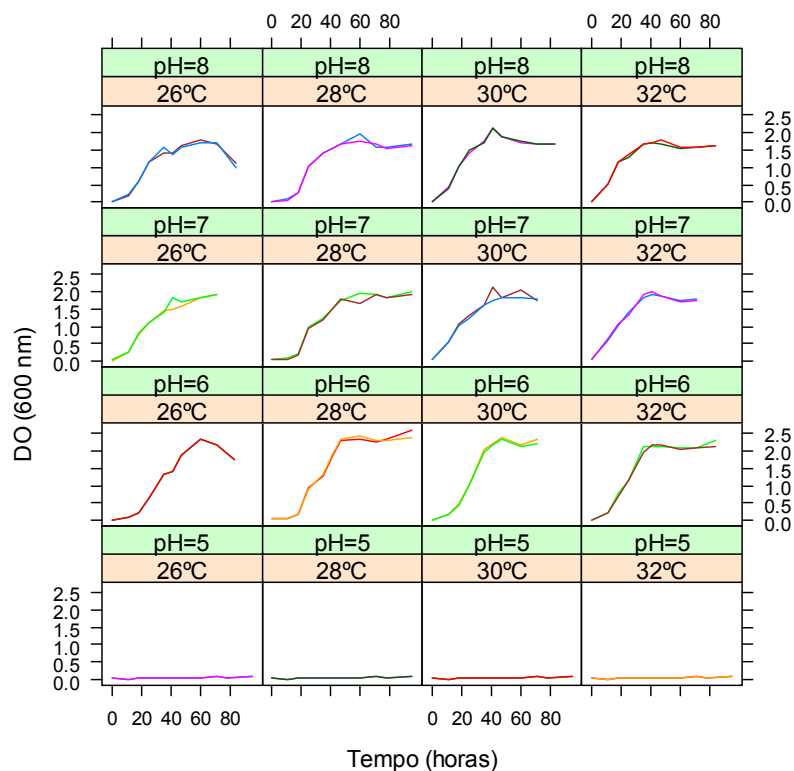


Figura 14. Curvas de crescimento (variação da densidade óptica em função do tempo), relativas aos ensaios em pequena escala, para a estirpe de rizóbio 19Ms.

Tal como se pode observar na Figura 14, a pH 5, não se observou crescimento celular para esta estirpe, comportamento que está de acordo com resultados previamente publicados que referem que a relação simbiótica dos *Sinorhizobium meliloti* é particularmente sensível a pH ácidos, que causa uma inibição do seu crescimento e do processo de nodulação (O'Hara, 1989). Assim, os resultados descritos nesta sessão contemplam apenas as comparações sob os níveis de pH 6, 7 e 8. Os resultados médios obtidos para os dois parâmetros encontram-se resumidos no Quadro 7.

Quadro 7. Valores médios da taxa de crescimento (μ) e tempo de duplicação (td) relativos aos ensaios em pequena escala para a estirpe 19Ms sob os diferentes pH e temperaturas testados.

Temp. (°C)	pH	μ	td
26	6	0.104	6.671

	7	0.073	9.491
	8	0.126	5.813
28	6	0.109	6.380
	7	0.101	6.896
	8	0.102	6.802
30	6	0.149	4.645
	7	0.102	6.776
	8	0.163	4.257
32	6	0.161	4.306
	7	0.139	4.998
	8	0.162	4.294

Na Figura 16 observa-se uma tendência para o aumento da taxa de crescimento com o aumento da temperatura. Por outro lado, parece ser sob pH 7 que se observam crescimentos mais lentos registrando-se menores taxas de crescimento do que sob pH 6 ou 8.

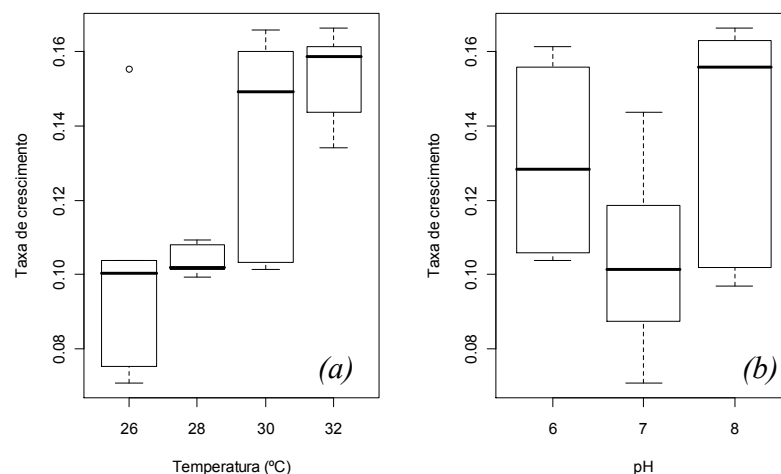


Figura 15. Distribuição dos valores da taxa de crescimento (a) em função da temperatura (°C) e (b) em função do pH.

Também para esta estirpe se registou um efeito significativo da temperatura ($F(3,12) = 26.5$, $p < 0.001$) e do pH ($F(2,12) = 17.1$, $p < 0.001$). Os Quadros 8 e 9 resumem os valores de *p-values* obtidos nos testes de comparações múltiplas de médias para os dois factores em estudo. Verificou-se que os valores médios obtidos a 26°C ($\mu = 0.1010$) e a 28°C ($\mu = 0.1037$) não diferem significativamente entre si ($p = 0.9898$). Por outro lado, os valores médios obtidos a 30°C ($\mu = 0.1382$) e a 32°C ($\mu = 0.1538$) também não diferem significativamente entre si ($p = 0.3172$).

Entre estes dois sub-grupos (26/28°C vs. 30/32°C) observam-se diferenças muito significativas (ver Quadro 8).

Quadro 8. Valores de *p-value* relativos às comparações múltiplas de médias (Teste de Tukey) para o factor temperatura

Temperatura	26°C	28 °C	30 °C	32 °C
26 °C	-	0.9898	0.0027***	<0.001***
28 °C	-	-	0.0052***	<0.001***
30 °C	-	-	-	0.3171
32°C	-	-	-	-

“***” Diferenças significativas a 0.01 ($p < 0.01$).

Relativamente ao pH (Quadro 9), verificou-se que os valores médios da taxa de crescimento a pH 7 ($\mu = 0.1037$) são significativamente menores do que os obtidos quer a pH 6 ($\mu = 0.1307$) quer a pH 8 ($\mu = 0.1538$). Comparando os resultados obtidos para pH 6 e 8, verificou-se que as taxas médias de crescimento não são significativamente diferentes entre si ($p = 0.6060$).

Quadro 9. Valores de *p-value* relativos às comparações múltiplas de médias (Teste de Tukey) entre os diferentes níveis de pH.

pH	6	7	8
6	-	0.0064***	0.6060
7	-	-	<0.001***
8	-	-	-

“***” Diferenças significativas a 0.01 ($p < 0.01$).

À semelhança do que foi feito para a estirpe 123Ts2, foi também analisada a existência de interacção dos factores. Considerando um nível de significância de 0.05, os resultados mostram a ausência de uma interacção significativa ($p = 0.08$). Contudo, fixando o nível de significância em 0.10, pode considerar-se a existência de uma interacção pouco significativa entre os factores para esta estirpe.

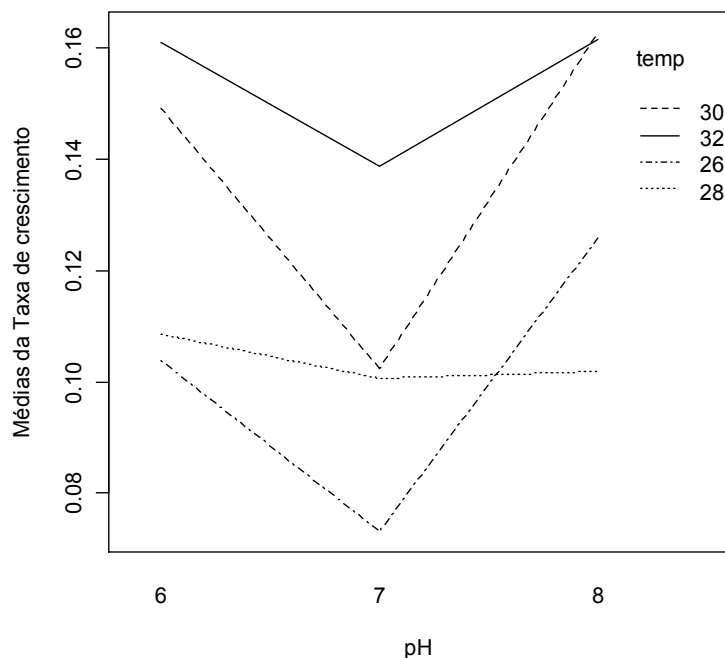


Figura 16. Curvas de interacção entre pH e temperatura e seu efeito sobre a taxa de crescimento para a estirpe 19Ms.

De facto verifica-se uma variação das médias da taxa de crescimento em função do pH, idêntica qualquer que seja a temperatura considerada, verificando-se uma diminuição dos valores de pH 6 para pH 7 e um aumento de pH 7 para pH 8, apontando para a ausência de interacção entre os factores (Figura 16). Contudo, repare-se que este comportamento é menos acentuado para a temperatura de 28°C, onde a taxa média de crescimento é praticamente constante para todos os níveis de pH.

Para a estirpe 19Ms continua a ser a pH 6 que se verifica um maior crescimento celular. Da análise das curvas de crescimento (Figura 14) concluímos que as maiores concentrações celulares se atingem para as temperaturas de 28°C e 30 °C e pH 6.

3.5.3 Estudo de interacção pH/temperatura para a estirpe de *Sinorhizobium meliloti* 55Mp

Na Figura 17 estão representadas as curvas de crescimento da estirpe 55Mp sob as diversas condições de temperatura e pH estudadas.

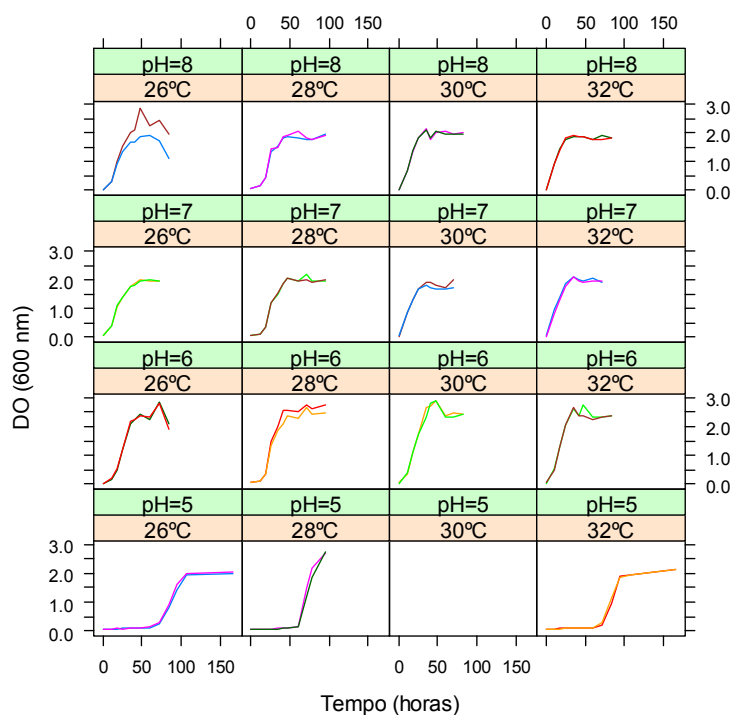


Figura 17. Curvas de crescimento (variação da densidade óptica em função do tempo) relativas aos ensaios em pequena escala, para a estirpe de rizóbio 55Mp.

Tal como anteriormente, estas curvas permitiram, após selecção das fase de crescimento exponencial, determinar as taxas de crescimento e tempos de duplicação em cada uma das condições. Repare-se que para esta estirpe não foi possível obter dados sob temperatura de 30°C e pH 5, dado que numa das repetições ocorreu uma contaminação e na outra não se registou crescimento celular.

Os resultados médios obtidos para os dois parâmetros encontram-se resumidos no Quadro 10.

Quadro 10. Valores médios das taxas de crescimento (μ) e tempo de duplicação (td) relativos aos ensaios em pequena escala com a estirpe 55Mp para as diferentes temperaturas testadas.

Temp. (°C)	pH	μ	td
26	5	0.034	20.266
	6	0.125	5.544
	7	0.104	6.643

	8	0.117	5.917
28	5	0.047	14.719
	6	0.110	6.322
	7	0.096	7.241
	8	0.107	6.424
30	5	-	-
	6	0.160	4.338
	7	0.205	3.390
	8	0.164	4.222
32	5	0.029	23.633
	6	0.166	4.182
	7	0.149	4.659
	8	0.218	3.168

À semelhança do que foi observado para a estirpe 19Ms, registou-se uma tendência para o aumento da taxa de crescimento com o aumento da temperatura. No caso do pH, observaram-se valores claramente inferiores sob pH 5 (Figura 18).

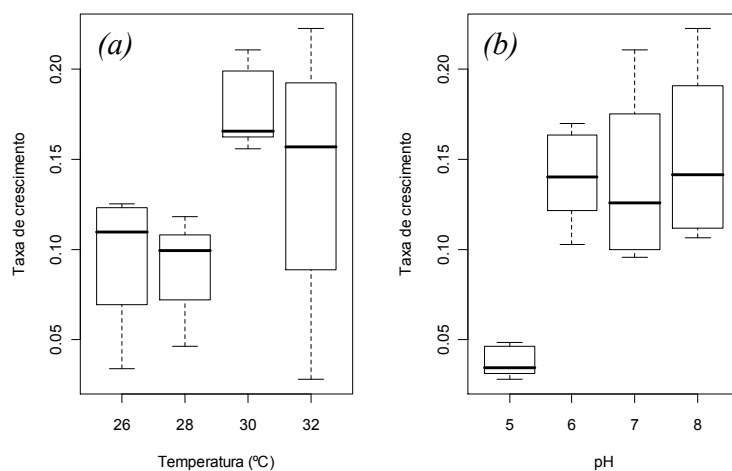


Figura 18. Distribuição dos valores da taxa de crescimento (a) em função da temperatura (°C) e (b) em função do pH.

A análise dos dados revelou um efeito estatisticamente significativo de ambos os factores ($p < 0.001$). Nos Quadros 11 e 12 apresentam-se os valores de p -values obtidos nos testes de comparações múltiplas de médias para os dois factores em estudo. Verificou-se que os valores médios obtidos a 26°C ($\mu = 0.0952$) e a 28°C ($\mu = 0.0902$) não diferem significativamente entre si

($p = 0.0201$). Os valores médios obtidos a 30°C ($\mu = 0.1762$) e a 32°C ($\mu = 0.1407$) são significativamente maiores do que os encontrados quer a 26°C quer a 28°C (ver Quadro 11).

Quadro 11. Valores de *p-value* relativos às comparações múltiplas de médias (Teste de Tukey) para o factor temperatura

Temperatura	26°C	28 °C	30 °C	32 °C
26 °C	-	0.2020	0.001	0.001
28 °C	-	-	0.001	0.001
30 °C	-	-	-	0.001
32°C	-	-	-	-

“***” Diferenças significativas a 0.01 ($p < 0.01$).

Relativamente ao pH (Quadro 12), verificou-se que os valores médios da taxa de crescimento a pH 5 ($\mu = 0.1037$) são significativamente menores do que os obtidos sob qualquer outro valor de pH ($p < 0.0001$).

Quadro 12. Valores de *p-value* relativos às comparações múltiplas de médias (Teste de Tukey) entre os diferentes níveis de pH.

pH	5	6	7	8
5	-	0.001	0.001	0.001
6	-	-	0.862	0.001
7	-	-	-	0.001
8	-	-	-	-

“***” Diferenças significativas a 0.01 ($p < 0.01$).

Nesta estirpe, observou-se uma interacção significativa entre os factores ($F(8,15) = 78.6$, $p < 0.0001$). A Figura 19 ilustra que a variação das taxas médias de crescimento com o aumento de pH depende do nível de temperatura, isto é, apresenta a interacção observada.

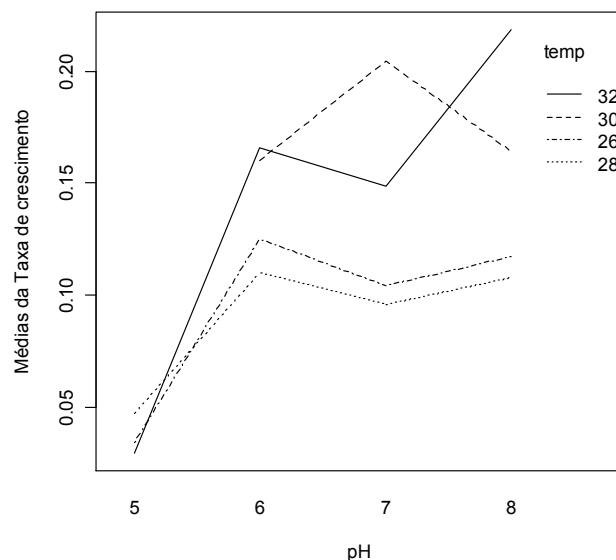


Figura 19. Curvas de interacção entre pH e temperatura e seu efeito sobre a taxa de crescimento para a estirpe 55Mp.

Foi a 30°C e 32°C e a pH 7 e pH 8 que se registara as taxas de crescimento mais elevadas, contudo, pela análise da Figura 17 constatamos que as concentrações celulares mais elevadas se atingiram a pH 6.

3.5.4 Estudo de estirpes de *Rhizobium* sob diferentes concentrações salinas

Nas secções que se seguem são apresentadas as curvas de crescimento da estirpe *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* 123Ts2 e das estirpes *Sinorhizobium meliloti* 19 Ms e 55Mp para as diferentes concentrações salinas estudadas. Tal como nos estudos de interacção temperatura/pH, realizados para cada uma das estirpes de rizóbio, estas curvas permitiram, após selecção das fase de crescimento exponencial, determinar as taxas de crescimento em cada uma das condições de salinidade seleccionadas.

Tendo em conta que a análise do factor salinidade foi feita sob um único cruzamento entre a temperatura e o pH, estes ensaios foram realizados sob os valores considerados óptimos para a produção de biomassa, para cada uma das estirpes e resultantes do estudo realizado em 3.5.1, 3.5.2

e 3.5.3 respectivamente. Foram seleccionadas as fases de crescimento exponencial, e determinadas as taxas de crescimento, sob cada uma das condições estudadas.

3.5.4.1 Estirpe de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* 123Ts2

Os valores óptimos de crescimento, obtidos no estudo realizado para a estirpe 123ts2, e descrito no ponto 3.5.1 foram pH 6 e a temperatura de 28 °C.

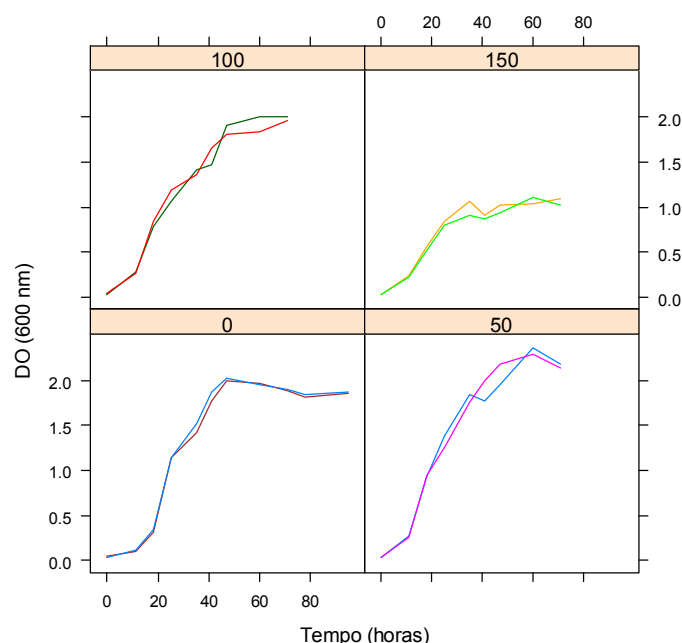


Figura 20. Curvas de crescimento (variação da densidade óptica em função do tempo) relativas aos ensaios em pequena escala, para a estirpe de rizóbio 123Ts2, sob diferentes concentrações salinas.

Os resultados médios obtidos relativos às taxas de crescimento, encontram-se resumidos no Quadro 13.

Quadro 13. Valores médios das taxas de crescimento (μ) relativos aos ensaios em pequena escala com a estirpe 123Ts2 para as diferentes concentrações salinas.

NaCl mM	0	50	100	150
$\mu \text{ h}^{-1}$	0.13212	0.19013	0.17502	0.15449

Registou-se uma taxa de crescimento mais elevada para a concentração salina de 50 mM NaCl. Contudo, a diferença entre a concentração de 50 e 100 mM não é significativa ($p = 0.0842$), o que vai ao encontro de estudos já realizados e que segundo os quais as estirpes de

rizóbio crescem de um modo geral melhor a concentrações de 100 mM do que a concentrações de 20 mM NaCl (Rodrigues, 2008).

Às taxas de crescimento médias mais elevadas, $\mu = 0.19013$ e $\mu = 0.17502$, correspondem também os crescimentos onde se obteve maior concentração celular.

3.5.4.2 Estirpe de *Sinorhizobium meliloti* 19Ms

Tal como para a estirpe 123Ts2 os ensaios realizados para a estirpe 19Ms decorreram a pH 6 e à temperatura de 28°C.

Da análise dos resultados relativos ao estudo do crescimento em diferentes concentrações de salinidade para a estirpe 19Ms, verifica-se que se atingem concentrações celulares mais elevadas nos crescimentos com 100 mM NaCl (Figura 21). Os valores das taxas de crescimento médias (Quadro 14) também confirmam a interpretação dos resultados feita pela análise das curvas de crescimento.

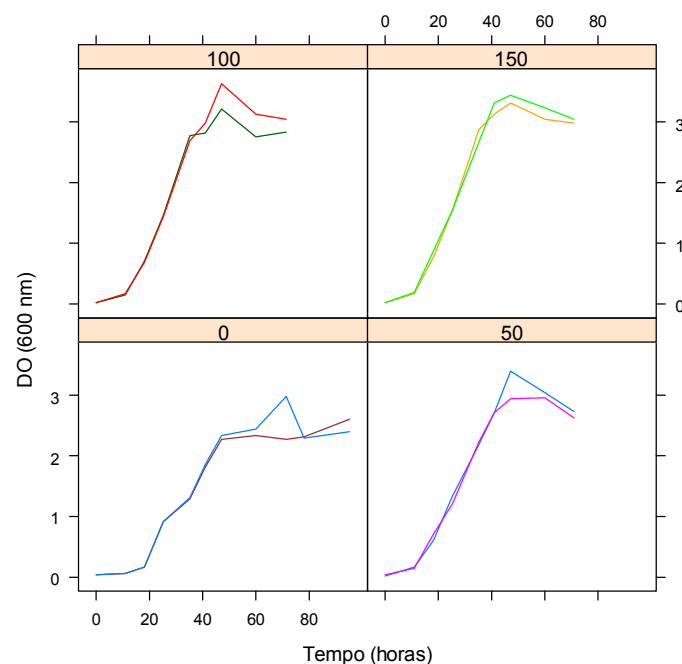


Figura 21. Curvas de crescimento (variação da densidade óptica em função do tempo) relativas aos ensaios em pequena escala, para a estirpe de rizóbio 19Ms, sob diferentes concentrações salinas.

Quadro 14. Valores médios das taxas de crescimento (μ) relativos aos ensaios em pequena escala com a estirpe 19Ms para as diferentes concentrações salinas.

NaCl (mM)	0	50	100	150
$\mu \text{ h}^{-1}$	0.10865	0.12442	0.16698	0.15560

Os resultados obtidos para as concentrações salinas de 50, 100 e 150 mM testadas não apresentam contudo diferenças significativas ($p > 0.05$), o que estatisticamente valida a opção por qualquer um dos valores de concentração salina a utilizar nos ensaios à escala piloto.

3.5.4.3 Estirpe de *Sinorhizobium meliloti* 55Mp

Os ensaios realizados para a estirpe 55Mp decorreram a pH 6 e à temperatura de 30°C. Pela análise das taxas de crescimento médias (Quadro 15) concluímos que não existem diferenças significativas ($p > 0.05$) entre os crescimentos realizados para cada uma das diferentes concentrações salinas.

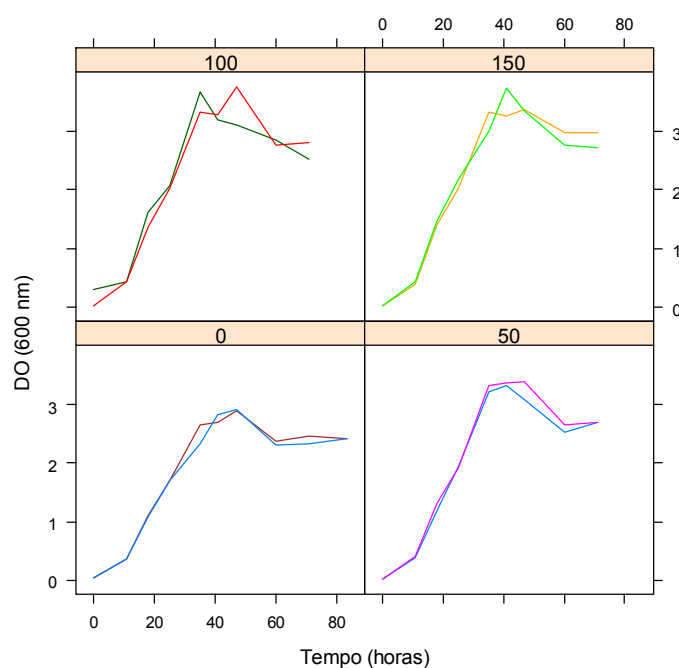


Figura 22. Curvas de crescimento (variação da densidade óptica em função do tempo) relativas aos ensaios em pequena escala, para a estirpe de rizóbio 55Mp, sob diferentes concentrações salinas.

Quadro 15. Valores médios das taxas de crescimento (μ) relativas aos ensaios em pequena escala com a estirpe 19Ms para as diferentes concentrações salinas.

NaCl mM	0	50	100	150
$\mu \text{ h}^{-1}$	0.15992	0.17328	0.12794	0.15820

Segundo Medeiros *et al.*, (2007), existem interações estatisticamente significativas ($p < 0.05$) sobre o rendimento das culturas de rizóbio, quando são testadas diferentes temperaturas de incubação e diferentes concentrações salinas o que deixa em aberto, e suscita o interesse pela realização de novos estudos sobre estas estirpes com o objectivo de melhorar ainda mais a produtividade de cada processo.

3.5.5 Estudo de estirpes de *Rhizobium* crescidas em meios de cultura enriquecidos

Os meios de cultura normalmente utilizados para o crescimento de bactérias não incluem a glucose. No entanto este estudo tem como um dos objectivos a produção de biomassa, pelo que optamos por testar, para os parâmetros de crescimento mais favoráveis, a utilização de meio 2TY e TYG, uma vez que segundo os autores Graham (1964) e Vincent (1970), existem claras evidências de que o crescimento de rizóbios é estimulado em particular, por algumas fontes de carbono, estímulo este que se traduz num aumento da concentração celular em culturas realizadas em meio líquido. Esta metodologia permitiu comparar o meio standard TY com meios enriquecidos 2TY e TYG. Não são apresentados as curvas de crescimento em meio CML visto que como o descrito em 3.3, as três estirpes de rizóbio estudadas quando crescidas neste meio apresentaram formação de agregados. Este facto impossibilita que se faça uma monitorização das culturas em CML com a obtenção de resultados comparáveis às crescidas nos outros meios testados. As condições de temperatura e pH a que decorreram estes ensaios para cada uma das estirpes, foram as mesmas utilizadas nos ensaios da salinidade.

3.5.5.1 Estirpe de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* 123Ts2

Uma primeira apreciação das curvas de crescimento obtidas (Figura 23), permite-nos concluir que as estratégias de enriquecimento do meio de cultura TY, estimularam efectivamente o crescimento celular.

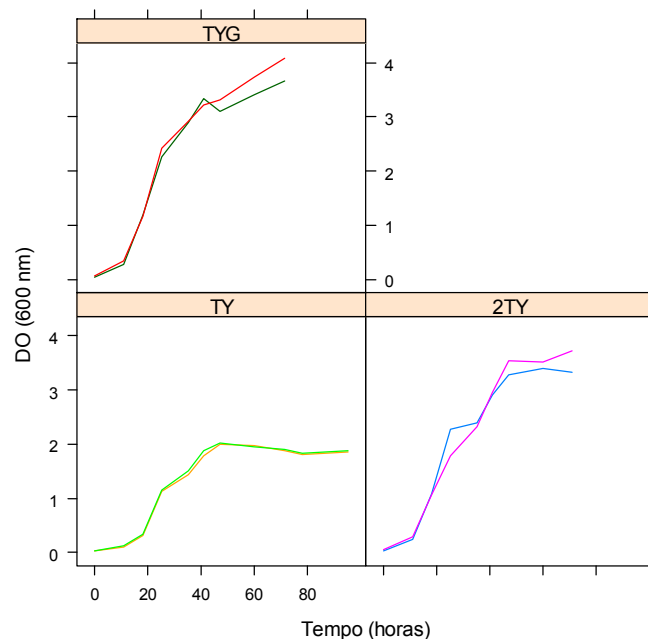


Figura 23. Curvas de crescimento (variação da densidade óptica em função do tempo) relativas aos ensaios em pequena escala, para a estirpe de rizóbio 123Ts2, crescida em diferentes meios de cultura.

No Quadro 16, as taxas de crescimento e os tempos de duplicação médios evidenciam os efeitos das medidas implementadas sob o crescimento celular.

A concentração celular é significativamente maior para os crescimento em 2TY e TYG quando comparada com o resultados obtidos nos crescimentos em meio TY.

Quadro 16. Valores médios da taxa de crescimento (μ) e tempo de duplicação (td) relativos aos ensaios em pequena escala para a estirpe 123Ts2 crescida em diferentes meios de cultura.

Temp. (°C)	Meio	μ	td
26	TY	0.132	5.246
	2TY	0.159	4.370
	TYG	0.165	4.216

3.5.5.2 Estirpe de *Sinorhizobium meliloti* 19Ms

Para a estirpe 19Ms foi observado um comportamento semelhante ao da estirpe 123Ts2, ou seja, à maior disponibilidade de nutrientes favoreceu o crescimento celular atingindo-se consequentemente concentrações celulares finais mais elevadas (Figura 24).

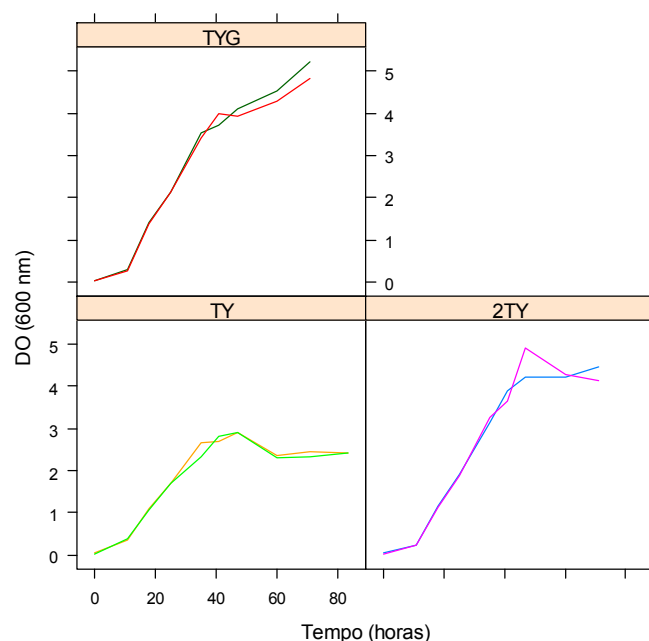


Figura 24. Curvas de crescimento (variação da densidade óptica em função do tempo) relativas aos ensaios em pequena escala, para a estirpe de rizóbio 19Ms, crescida em diferentes meios de cultura.

Os dados do Quadro 17 mostram que embora, as taxas de crescimento médias para os ensaios em meio TY e 2TY são praticamente iguais o crescimento em meio 2TY atinge concentrações celulares significativamente superiores. Esta conclusão, mais uma vez torna evidente que a análise dos resultados deve ser suportada por várias estratégias de avaliação e interpretação de dados.

Quadro 17. Valores médios da taxa de crescimento (μ) e tempo de duplicação (td) relativos aos ensaios em pequena escala para a estirpe 19Ms crescida em meios enriquecidos.

Temp. (°C)	Meio	μ	td
26	TY	0.109	6.380
	2TY	0.108	6.396
	TYG	0.164	4.261

Para o ensaio em meio TYG, um $td = 4.3$ horas, torna claro que estamos perante um processo mais eficaz e sustentável, quando comparado com os outros dois testados, uma vez que

à redução significativa do tempo de duplicação corresponde também um aumento significativo do rendimento da cultura. O mesmo efeito sobre os tempos de duplicação foi constatado por Gouffi *et al.*, (1998), quando os ensaios que realizaram com *Sinorhizobium meliloti*, a diferentes concentrações de sacarose revelaram uma diminuição significativa dos tempos de duplicação e consequente aumento do crescimento celular.

3.5.5.3 Estirpe de *Sinorhizobium meliloti* 55Mp

As estirpe 55Mp reage de igual forma que as estirpes 123Ts2 e 19Ms ao enriquecimento do meio de cultura. Na Figura 25 observa-se que os crescimentos em meio 2TY e TYG são muito semelhantes e apresentam crescimentos celulares superiores aos crescimentos em TY.

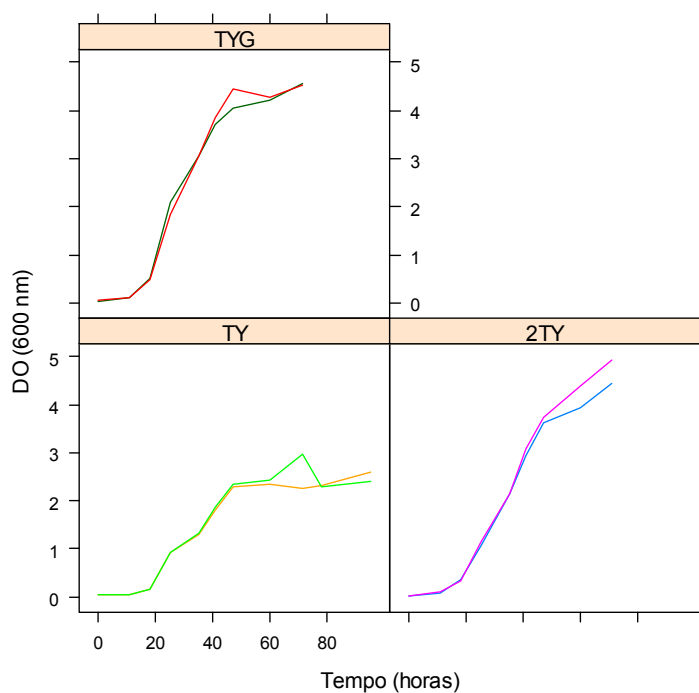


Figura 25. Curvas de crescimento (variação da densidade óptica em função do tempo) relativas aos ensaios em pequena escala, para a estirpe de rizóbio 55Mp, crescida em meios enriquecidos.

Os valores relativos às taxas de crescimento e tempos de duplicação médios obtidos (Quadro 18), poderiam levar-nos a fazer uma interpretação completamente contrária à anteriormente feita

com base na avaliação das curvas de crescimento. No entanto para o ensaio realizado em meio TY confirma-se uma fase exponencial de crescimento acentuada $\mu=0.160 \text{ h}^{-1}$, mas muito curta, a seguir à qual o crescimento celular abranda significativamente, traduzindo-se numa concentração celular final significativamente mais baixa que a dos outros dois ensaios em meio 2TY e TYG.

Quadro 18. Valores médios da taxa de crescimento (μ) e tempo de duplicação (td) relativos aos ensaios em pequena escala para a estirpe 55Mp crescida em meios enriquecidos.

Temp. (°C)	Meio	μ	td
26	TY	0.160	4.338
	2TY	0.125	5.610
	TYG	0.129	5.435

3.6 Crescimentos à escala piloto

Concluído o trabalho de laboratório relativo aos estudos da influência dos factores pH, temperatura e concentração salina, juntamente com os estudos suplementares relativos aos meios de cultura enriquecidos, sobre as estirpes de rizóbios, foram seleccionados os níveis de cada um dos factores estudados que mais favoreceram o crescimento celular e consequentemente levaram a que nesses crescimentos se atingissem as concentrações celulares mais elevadas.

Devido às limitações impostas para a utilização do equipamento, não nos foi possível fazer mais do que sete crescimentos. Por esta razão, optou-se por proceder à optimização das condições de crescimento à escala piloto apenas para uma das estirpes estudadas de modo a ser possível obter resultados conclusivos.

Nos ensaios à escala piloto optamos por testar a estirpe 123Ts2. Os níveis de cada um dos factores estudados que mais favoreceram o crescimento da estirpe 123Ts2 e por isso utilizados nos ensaios à escala piloto, foram a temperatura de 28°C, um pH de 6, concentração salina 50 mM de NaCl e o meio de cultura TYG.

3.6.1 Crescimentos realizados para a estirpe de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* 123Ts2

Para cada um dos ensaios realizados, foram previamente definidas as condições de crescimento (Quadro 19), com o objectivo de obter a maior concentração celular possível no final de cada processo.

A aquisição contínua de dados pelos sistemas de controlo UBICON, permitiu-nos acompanhar a evolução das pressões parciais de oxigénio (pO_2) e registar as variações de pH ao longo do tempo. Importa aqui salientar que, o valor de pH 6 considerado óptimo para a estirpe 123Ts2 nos ensaios laboratoriais, se refere a um valor de pH inicial. A concentração de oxigénio no meio e o pH, são os dois factores possíveis de variar nos crescimentos em fermentados no sentido de maximizar o rendimento do bioprocessos.

Quadro 19. Resumo dos ensaios realizados para cada uma das estirpes de rizóbio estudadas, respectivas condições de crescimento e rendimento das culturas.

Crescimento	Estirpe	Meio	Caudal de ar (ml/min)	pH	Temperatura (°C)	rpm	Rendimento (g)
1	123Ts2	TYG	250	6	28	200	1.20
2	123Ts2	TYG	250	6	28	150	0.98
3	123Ts2	TYG	1000	6	28	150	3.90
4	123Ts2	TYG	350	6	28	150	2.7
5	123Ts2	TYG	1000	6	28	150	4.2
6	123Ts2	TYG	2000	6	28	150	3.2
*7	123Ts2	TYG	2000	6	28	150	5.5

*Crescimento com controlo de pH

O processo de optimização das condições de crescimento em fermentador, inicialmente consistiu em encontrar as concentrações de oxigénio não limitantes ao metabolismo do microrganismo, e que por conseguinte favorecessem o crescimento celular. Numa segunda fase procuramos perceber se as variações de pH registadas ao longo do crescimento são ou não responsáveis por quebras no rendimento final da cultura.

Na Figura 26 estão representadas as curvas de crescimento correspondentes aos crescimentos do Quadro 19, para a estirpe 123Ts2.

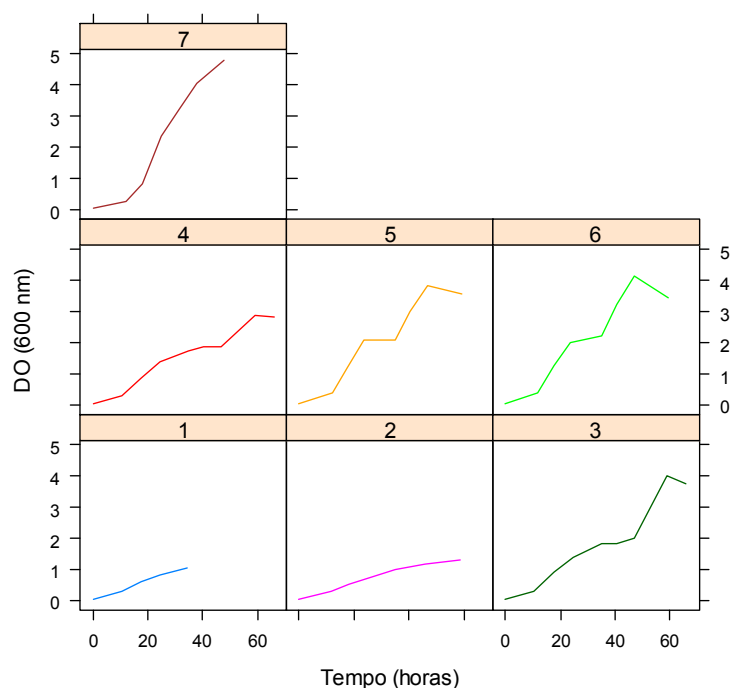


Figura 26. Curvas de crescimento (variação da densidade óptica em função do tempo) relativas aos ensaios à escala piloto, para a estirpe de rizóbio 123Ts2. Os gráficos 1 a 7 correspondem às diferentes condições de crescimento testadas (Quadro 19) com vista à maximização da concentração celular final.

3.6.1.1 Optimização de caudais de ar

Tendo em consideração que muitas estirpes de rizóbios crescem bem em condições de microaerofilia, ou seja, a pressões parciais de oxigénio inferiores a 0.01 atm (<4.76% de O₂ no meio líquido) (Somasegaram, 1994), utilizou-se, para o primeiro ensaio em fermentador, (crescimento 1, Figura 26), fornecer um caudal de ar de 250 ml/min, com o objectivo de manter os níveis de concentração de oxigénio numa situação não limitante, evitando afectar a eficiência metabólica do sistema. Da análise da curva de variação da concentração de oxigénio ao longo do tempo para o crescimento 1 (Figura 27), constatamos que durante o ensaio não se verificou uma situação de limitação de oxigénio.

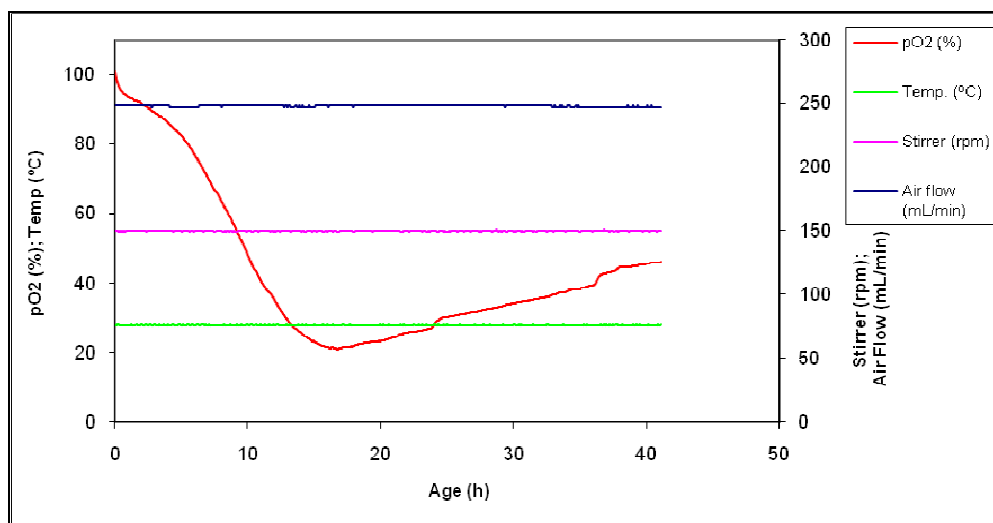


Figura 27. Curvas da variação dos factores pO₂, temperatura, agitação (Stirrer) e caudal de ar (Air flow) ao longo do crescimento 1.

O mesmo já não se registou para o crescimento 2 (Figura 28), onde praticamente se mantiveram as mesmas condições de crescimento com o intuito de confirmar os resultados obtidos no primeiro ensaio.

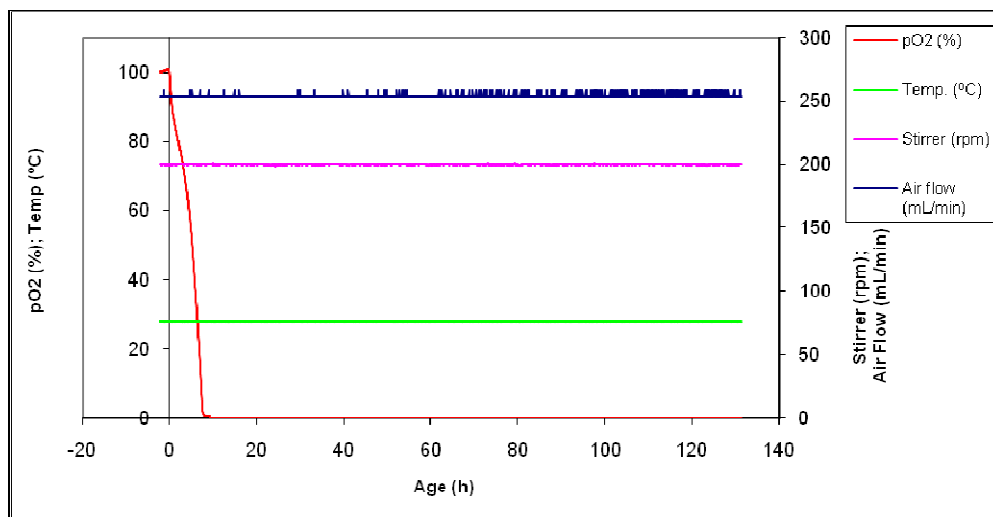


Figura 28. Curvas da variação dos factores pO₂, temperatura, agitação (Stirrer) e caudal de ar (Air flow) ao longo do crescimento 2.

No crescimento 3 (Figura 29) para um caudal de ar de 1000 ml/min, observa-se ainda uma situação de limitação de oxigénio.

Os caudais de ar utilizados para os ensaios correspondentes aos crescimentos 3 e crescimento 4 (Figura 30) 1000 ml/min e 350 ml/min respectivamente, foram definidos com base nos resultados obtidos nos crescimentos 1 e 2, onde os caudais de 250 ml/min não favoreceram a obtenção de rendimentos celulares satisfatórios.

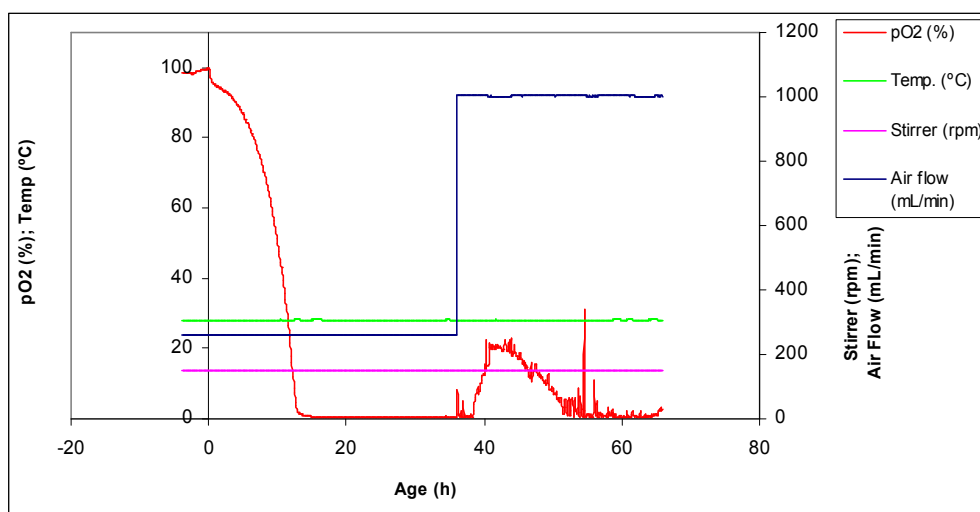


Figura 29. Curvas da variação dos factores pO₂, temperatura, agitação (Stirrer) e caudal de ar (Air flow) ao longo do crescimento 3.

As alterações dos caudais de ar traduziram-se num aumento efectivo das concentrações celulares no final de cada crescimento, registando-se uma concentração celular final mais elevada no ensaio 3, onde até aqui se aplicou o maior caudal de ar (1000 ml/min). No entanto para ambos os ensaios, a interpretação dos gráficos da variação da concentração de oxigénio, mostram que os crescimentos decorreram ainda numa situação de limitação de oxigénio.

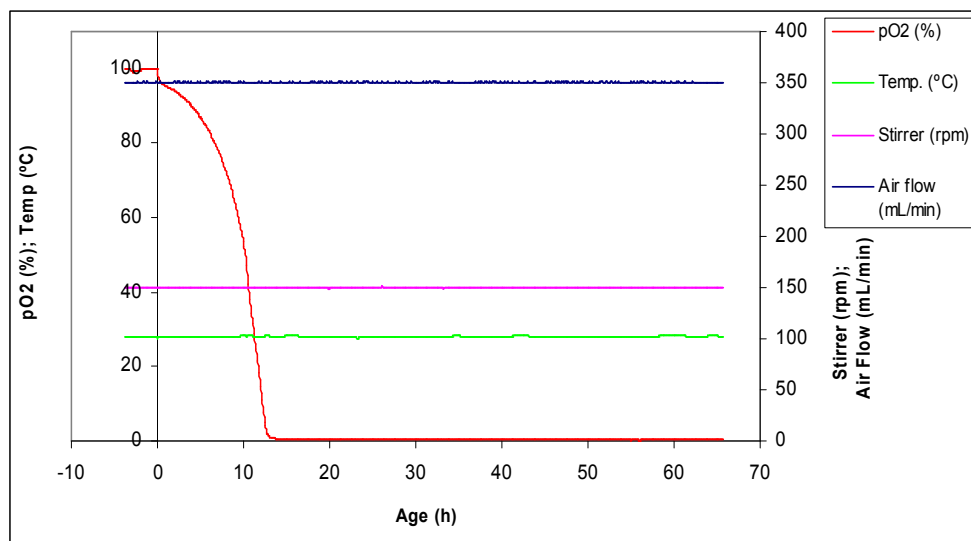


Figura 30. Curvas da variação dos factores pO₂, temperatura, agitação (Stirrer) e caudal de ar (Air flow) ao longo do crescimento 4.

Com o crescimento 5 (Figura 31) pretendeu-se confirmar os resultados obtidos no crescimento 3.

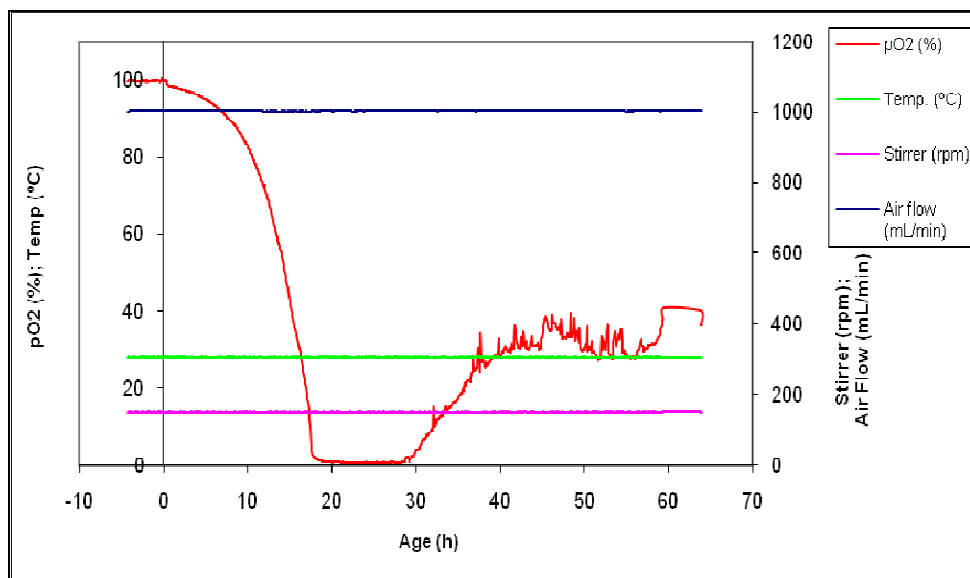


Figura 31. Curvas da variação dos factores pO₂, temperatura, agitação (Stirrer) e caudal de ar (Air flow) ao longo do crescimento 5.

O facto de em todos os crescimentos se verificar uma situação de limitação de oxigénio, levou a que, no crescimento 6 se utiliza-se um caudal de ar mais elevado de 2000 ml/min. Assim

ao deixar de ter o factor concentração de oxigénio como limitante pôde-se intervir sob outra variável com influência directa no rendimento celular, nomeadamente o pH.

De facto, verificou-se que com o caudal de ar de 2000 ml/min, já não se regista uma situação de limitação de oxigénio (Figura 32).

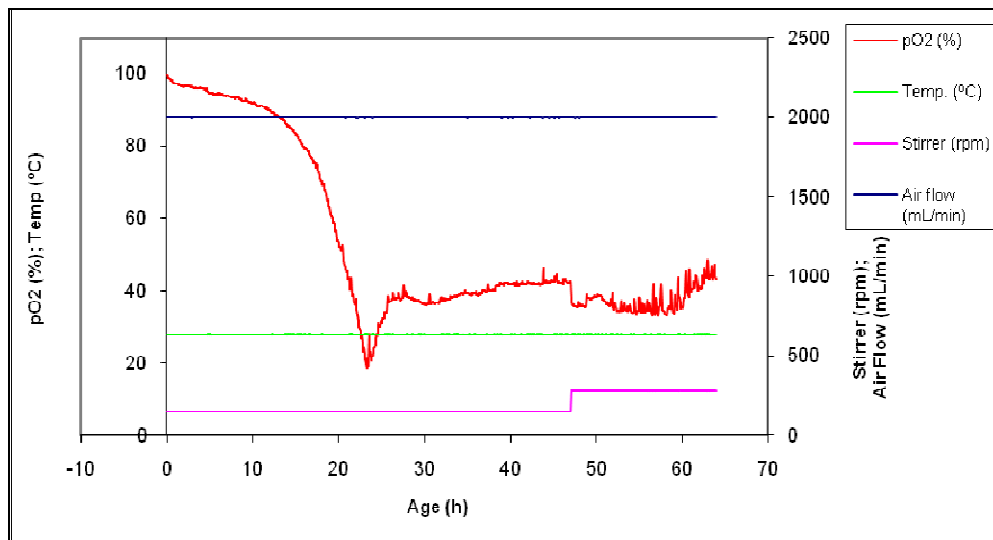


Figura 32. Curvas da variação dos factores pO₂, temperatura, agitação (Stirrer) e caudal de ar (Air flow) ao longo do crescimento 6.

Este caudal (2000 ml/min) onde não se observa situação de limitação de oxigénio, será então utilizado no crescimento 7 (Figura 33) onde se vai analisar crescimento deste rizóbio quando o pH da cultura se mantém constante (pH 6).

No crescimento 7 observou-se que os níveis da concentração de oxigénio atingiram valores inferiores aos registados no crescimento 6.

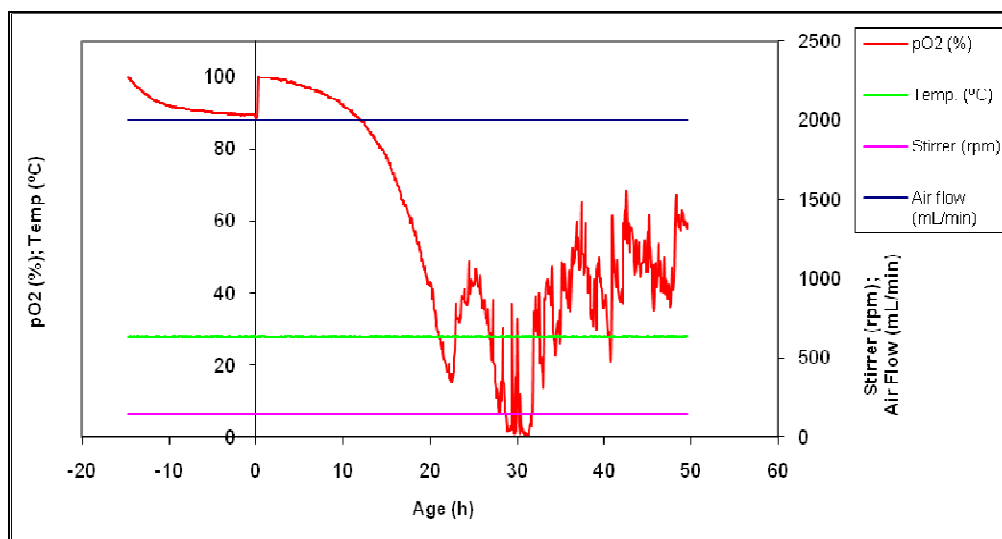


Figura 33. Curvas da variação dos factores pO₂, temperatura, agitação (Stirrer) e caudal de ar (Air flow) ao longo do crescimento 7.

3.6.1.2 Optimização de pH

A observação das curvas de variação do pH ao longo dos crescimentos da estirpe 123Ts2, revelam que o pH inicial (pH 6) não se mantém constante. Conforme se verificou, também no crescimento 6 (Figura 34), se regista uma acidificação do meio de cultura, onde se constata que o pH inicial (pH $\approx$ 6) desce para valores próximos de pH 5.

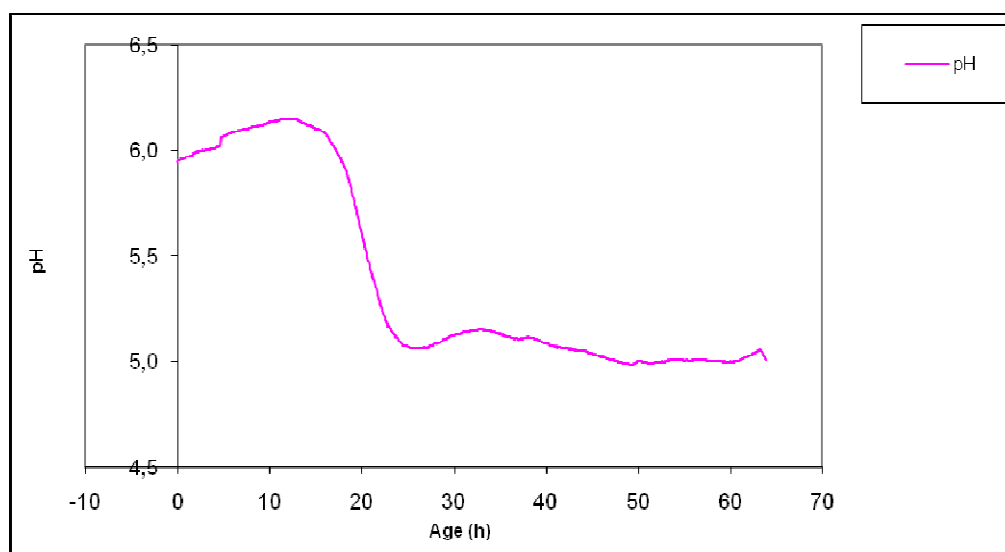


Figura 34. Curvas da variação do pH ao longo do crescimento 6.

Dos estudos realizados durante os ensaios à escala laboratorial, constatamos que a estirpe 123Ts2, crescida a pH 5, apresenta valores médios da taxa de crescimento ($\mu=0.100 \text{ h}^{-1}$) inferiores aos valores registados para os crescimentos a pH 6.

No crescimento 7, decidimos manter o valor do pH inicial constante (Figura 35) activando para isso, o sistema automático de controlo de pH.

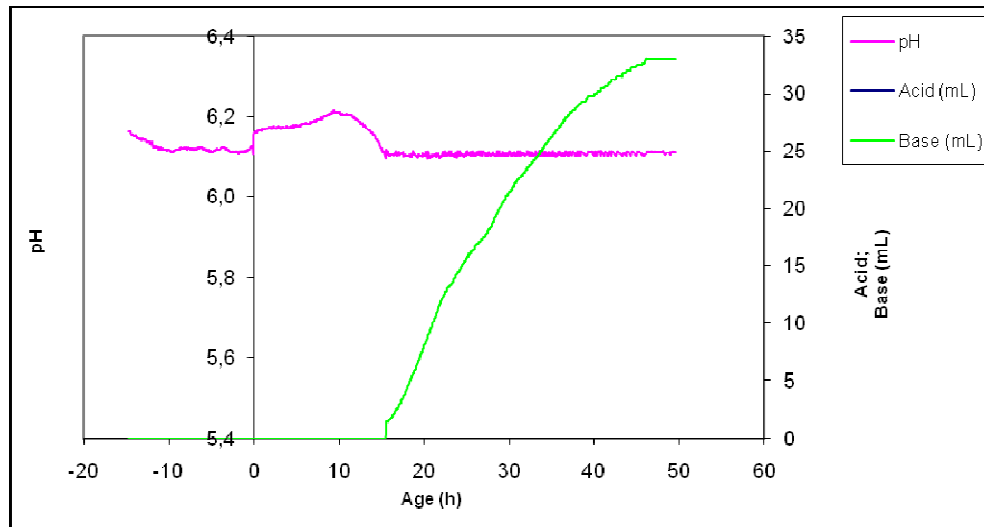


Figura 35. Curvas da variação do pH ao longo do crescimento 7.

O resultado que se obteve, em termos de rendimento celular 5.5 g, revela que de facto a manutenção do pH 6 constante ao longo de todo o crescimento, traduz-se num processo mais rentável. Entre todas as estratégias definidas desde o crescimento 1 ao crescimento 7, esta última é a que claramente corresponde a uma maior eficácia metabólica e consequentemente um maior rendimento celular (Quadro 19).

4. Conclusão

A avaliação do crescimento celular por contagem do número de células em hemocitómetro, seria uma metodologia impraticável face à quantidade de ensaios a realizar em simultâneo. Entendeu-se por esta razão, fazer um estudo que nos permitisse constatar qual o grau de relação entre a aplicação do método de avaliação do crescimento por contagem de células e o método escolhido para fazer a monitorização dos crescimentos, a turbidimetria (leitura da DO a 600nm).

Os resultados obtidos nos ensaios realizados com as três estirpes de rizóbio estudadas, que visam determinar a relação entre a densidade óptica e o número de células por mililitro revelaram uma correlação linear significativa para as todas as estirpes, justificando-se e validando-se assim, a utilização da turbidimetria como método de avaliação do crescimento celular.

Os estudos realizados para a optimização das condições de crescimento das estirpes de rizóbio 123Ts2, 19Ms e 55Mp à escala laboratorial, revelaram-se de extrema importância para o apuramento de resultados, permitindo-nos retirar o maior partido possível dos ensaios à escala piloto, face ao número restrito de crescimentos realizáveis.

Todos os estudos realizados, nomeadamente, estudos de interacção pH/temperatura, avaliação dos crescimentos sob diferentes concentrações salinas e estudos de crescimento em diferentes meios de cultura enriquecidos, resultaram ser conclusivos para os vários níveis testados de cada um dos factores de crescimento.

A estirpe 123Ts2 regista um maior rendimento celular, para os crescimentos realizados em meio de cultura TYG, à temperatura de 28°C, pH 6 e com uma concentração de salina de 50 mM de NaCl. Embora estes resultados não tenham sido significativamente diferentes de outros níveis testados relativamente às taxas de crescimento e tempos de duplicação, foram com estas condições de crescimentos que se atingiram as maiores concentrações celulares. Por esta razão as condições de crescimento referidas foram que serviram de referência para os ensaios à escala piloto.

Para a estirpe 19Ms as maiores concentrações celulares registaram-se nos crescimentos em meio TYG à temperatura de 28°C, pH 6 e a uma concentração salina de 150 mM de NaCl. Para a estirpe 55Mp concluiu-se que os níveis de temperatura e pH mais elevados, que se estudaram, 30°C, 32°C, pH 7 e pH 8 são responsáveis por taxas de crescimento mais altas, mas as maiores concentrações celulares são atingidas para os crescimentos a pH 6. Este facto, revela que é

importante para a validação dos resultados a aplicação de várias metodologias de interpretação dos dados obtidos.

A determinação e das taxas de crescimento e dos tempos de duplicação são indicadores do estado da cultura que traduzem a eficácia do processo durante a fase de crescimento exponencial. Num processo de optimização de condições de crescimento de rizóbios para a produção de inoculantes, esta informação só será útil se for suportada pela avaliação do rendimento celular, ou seja, se conhecermos para cada caso estudado (bioprocesso) a quantidade de células viáveis.

Para os ensaios à escala piloto partimos sem conhecer o caudal de ar mais favorável ao crescimento celular da estirpe em estudo (*Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* 123Ts2). Encontrar um caudal de ar não limitante do potencial metabólico foi o primeiro objectivo, conseguido apenas no sexto ensaio realizado em fermentador (crescimento 6) com aplicação de um caudal de ar de 2000 ml/min. Nesta altura apenas tínhamos a hipótese de realizar mais um crescimento em fermentador. Entendemos intervir sob o pH.

Esta ultima intervenção no sentido de aumentar o rendimento da cultura, decidindo-se manter o pH inicial, pH 6, constante durante todo o bioprocesso, estava de acordo com a tendência observada de descida do pH em praticamente todos os crescimentos, e que se sabe que se repercute na eficiência metabólica dos microrganismos. De facto nestas condições elevou-se o rendimento celular de 3.2 g para 5.5 g.

IV - Conclusão geral

Com a primeira parte do trabalho realizado, produção de células de *B. japonicum* para a expressão de proteínas, conseguiram-se criar condições de crescimento microaerófilo favoráveis e facilmente reprodutíveis, dentro da mesma escala de produção, para a expressão do citocromo oxidase *cbb₃*. O produto foi conseguido, mas não foi possível com o equipamento disponível fazer a monitorização do bioprocessos para que ficassemos com o conhecimento exacto dos valores das concentrações de oxigénio no meio líquido, ao longo do crescimento.

A manutenção de um ambiente microaerófilo, representou efectivamente um obstáculo, no processo de aumento de escala de produção. Por esta razão, para a produção de células de *B. japonicum*, com citocromo oxidase *cbb₃* expresso, foi sempre utilizado o mesmo equipamento no qual foi feito o estudo de optimização das condições de crescimento.

Na segunda parte do trabalho, os estudos realizados para a optimização das condições de crescimento das estirpes de rizóbio 123Ts2, 19Ms e 55Mp à escala laboratorial, revelaram-se de extrema importância para o apuramento de resultados, permitindo-nos retirar o maior partido possível dos ensaios à escala piloto face ao número de crescimentos realizáveis.

A tecnologia disponível, em particular o sistema de aquisição de dados UBICON, permitiu-nos fazer uma monitorização contínua das variáveis pO₂ e pH em cada um dos ensaios realizados em frementador, e saber até que ponto cada uma destas variáveis estaria ou não a limitar a eficiência de cada um dos bioprocessos.

Para a estirpe 123Ts2, a única sujeita ao processo de optimização à escala piloto, a maior produtividade, 5.5 g/l foi obtida num crescimento realizado em meio TYG à temperatura de 28°C, utilizando um caudal de ar de 2000 ml/min, agitação de 150 rpm e mantendo o pH 6 constante ao longo de todo o crescimento.

Este trabalho permitiu mostrar que, para as estirpes de rizóbio estudadas, há um caminho a percorrer no processo da produção de inoculantes, e abre portas à experimentação de metodologias distintas das aqui implementados.

A utilização de *Rhizobium* como microrganismo promotor do crescimento tem um papel determinante na preservação dos sistemas de produção sustentáveis e com este trabalho espera-se ter contribuído para o estabelecimento de melhores condições na produção de inoculantes e consequentemente para uma melhor agricultura.

V- Referências bibliográficas

- Ben Rebah, F., Prévost, D., Yezza, A., & Tyagi, R.D. (2007). Agro-industrial waste materials and wastewater sludge for rhizobial inoculant production. *Bioresource Technology*, **89**, pp. 3535-3546.
- Beringer, J.R. & Hirsch, P.R., (1984). Genetic-Engineering and Nitrogen-Fixation, *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*, **1**, pp. 65-68.
- Bloem, J.F., Botha, W.J. & Law, I.J., (2002). Colony variation in *Sinorhizobium meliloti* inoculant strain U 45, *Microbiological Research*, **157**, pp. 283-292.
- Brockwell & Bottomley, (1995) J. Brockwell and P.J. Bottomley, Recent advances in inoculant technology and prospects for the future, *Soil Biology and Biochemistry* **27**, pp. 683–687.
- Cadima, J.F.C.L., (2000). *A Análise de Variância*. Edições da AEISA.
- Carvalho, N. S., (2006). Agricultura sustentável em regadio e o seu planeamento face aos desafios económicos, sociais e ambientais, Comunicação, 5º Congresso Ibérico, Gestão e Planeamento da Água.
- Casella, G. & Berger, R. (2002). *Statistical Inference*. Duxbury Press, Belmont, California.
- Chen, W.E., Wang, E., Wang, S., Chen, X. & Li, Y., (1995). Characteristics of *Rhizobium tianshanense* sp. Nov., a moderately and slow growing root nodule bacterium isolated from an arid saline environment in Xinjiang, People's Republic of China. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **43**, pp. 153-159.
- Embalomatis, A., Papakosta, D.K. & Katinakis, (1994). Evaluation of *Rhizobium-meliloti* Strains Isolated from Indigenous Populations in Northern Greece, *Journal of Agronomy and Crop Science-Zeitschrift fur Acker und Pflanzenbau* **172**, pp. 73-80.

Fareleira, M.P.A.A., (1986). Estudo do Comportamento de *Rhizobium Trifolium* e *Rhizobium Meliloti* em Condições Adversas de Salinidade, Estágio de Licenciatura em Biologia, Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências. pp. 203.

Ferreira, E.M. & Marques, I.F., (1992). Selection of Portuguese *Rhizobium-leguminosarum* by trifolii strains for production of legume inoculants . Screening for effectiveness in laboratory conditions, plant and soil **147**, pp. 151-158.

Ferreira, E. M. & Castro, I.V., (1995). Nodulation and growth of subterranean clover (*trifolium-subterraneum* l) in soils previously treated with sewage-sludge. *Soil Biology & Biochemistry* **27**, pp. 1177-1183

Ferreira, E. M., Castro, I., Simões, N., Costa, R. & Muacho, C. (2005). A Fixação biológica do azoto no ecossistema montado, *Melhoramento* **40**, pp. 116.

Freitas, A. D. S., Vieira, C., Santos, C., Stanford, N. & Lyra, M. (2007). Caracterização de rizóbios isolados de Jacarés cultivado em solo salino no Estado de Pernambuco, Brazil **66**.

Graham, (1964). Studies on the utilization of carbohydrates and Krebs cycle intermediates by Rhizobia, using an agar plate method. *Antonie V. Leeuwenhoek*, **30**, pp- 245-248.

Graham, P.H. (1992). Stress Tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and Nodulation Under Adverse Soil-conditions. *Canadian Journal of Microbiology* **38**, pp. 475-484.

Gomez, K.A. & Gomez, A.A. (1984). *Statistical Procedures for Agricultural Research*, 2nd Edition, Jhon Wiley & Sons, New York, pp. 339.

Gouffi, K., Pichereau, V., Rolland, J. P., Thomas, D., Bernard, T., & Blanco, C. (1998). Sucrose Is a Nonaccumulate Osmoprotectant in *Sinorhizobium meliloti*, **180**, pp. 5044-5051.

Hubbell D.H. & Gerald K., (2003). *Biological Nitrogen Fixation*, University of Florida IFAS.

Jordan, D. C. (1984). Family III Rhizobiaceae. In: N.R. Kneg and J.G. Holt, Editors, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* **1**, pp. 234–244.

Kalita, M. & Malek, W. (2004). Phenotypic and Genomic Characteristics of Rhizobia Isolated From *Genista Tinctoria* Root Nodules, *System Apply of Microbiology*. **27**, pp. 707-715.

Kober, M.V., Saccol de Sá, E. L., Freire, J. R. J. & Giengo, A. (2004). Characterization of variants of *Bradyrhizobium elkanii* and *B. japonicum* and symbiotic behaviour in soybeans. *Ciência Rural*, **34**, pp.1459-1464.

Laranjo, M., Branco, C., Soares, R., Alho, L., Carvalho, M. & Oliveira, S. (2002) “Comparison of chickpea rhizobia isolates from diverse Portuguese natural populations based on symbiotic effectiveness and DNA fingerprint” *Journal of Applied Microbiology* **92:6**, pp. 1043-50.

Lorite, M.J., Tachil, J., Sanjuán, J., Meyer, O. & Bedmar, E. J., (2000). Carbon Monoxide Dehydrogenase Activity in *Bradyrhizobium japonicum*. Estación Experimental del Zaidín, CSIC, 18008 Granada, Spain, and Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Bayreuth, D-95440 Bayreuth, Germany.

Madigan, M.T., Martinko, J.M.M. & Parker, J., (1997). *Brock Biology of Microorganisms*. Eighth Edition.

Medeiros, E.V., Silva, K.J.P., Martins, C.M. & Borges, W.L. (2007). Tolerância de bactérias fixadoras de Azoto proveniente de município do Rio Grande do Norte à temperatura e salinidade. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, **7**, pp. 160-168.

Maroco, J. & Bispo, R. (2003). *Estatística aplicada às Ciências Sociais e Humanas*, 2ª Edição. Climepsi Editores, pp. 358.

Mendham, J.; Denney, R.C.; Barnes, J.D. & Thomas, M.J.K. (1981). *Análise Química Quantitativa*. 4a. edição COPPE - UFRJ, Rio de Janeiro, pp. 690.

Mercante, F. M., Stralio, R., Duque, F.F. & Franco, A (1992). CNPAB.Embrapa.Br Page 1. ISSN 0103-9407 Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA Centro Nacional de Pesquisa de Biologia do Solo – CNPBS, **10**, p.1-8 Comunicação

O'Hara G.W., Goss T.J., Dilworth M.J. & Glenn A.R. (1989). Maintenance of Intracellular pH and Tolerance in *Rhizobium meliloti*. *Applied and Environmental Microbiology*, **55**, pp. 1870-1876

Parke D. L. & Ornston L.N., (1984) Nutritional diversity of *Rhizobiaceae* revealed by auxonography, *Journal of General Microbiology* **130**, pp. 1743–1750.

Pitcher, R.S., Brittain, T & Watmough, N.J., (2002). Cytochrome cbb(3) Oxidase and Bacterial microaerobic metabolism. *Biochemical Society Transactions* **30**, pp. 653-658.

Preisig, O., Anthamatten D., & Hennecke H. (1993). Genes for a novel. Microaerobically induced oxidase complex on *Bradyrhizobium japonicum* are essential for a nitrogen fixing endosymbiosis. *Proc. Natl. Acad. USA* **90**, pp.3309-3313.

Preisig, O., Zufferey R., Thony-Meyer L., Appleby Cyril A. & Hennecke H. (1996). A High-Affinity cbb3-Type Cytochrome Oxidase Terminates the Symbiosis-Specific Respiratory Chain of *Bradyrhizobium japonicum*, **178**, pp. 1532-1538.

Ramseier, T. M., Harald V. Winteler, and Hauke Hennecke, (1991). Discovery and Sequence Analysis of Bacterial Genes Involved in the Biogenesis of c-Type Cytochromes. *The Journal of Biological Chemistry*, **266**, pp. 7793-7803.

Regensburger, B & Hennecke, H, (1983). Rna-polymerase from rhizobium-japonicum. *Archives of Microbiology*, **135**, pp. 103-109.

Rodrigues, S.M.G., (2008). Caracterização de estirpes de *Sinorhizobium meliloti* isoladas de diferentes variedades de *Medicago sativa*. Universidade de Aveiro, Relatório de estágio.

Sahgal M. & Johri B.N. (2003), The changing face of rhizobial systematics, *Current Science* **84**, pp. 43–48.

Sahgal, M & Johri, BN, (2006) Taxonomy of rhizobia: Current status, *Current Science* **90**, pp. 486-487.

Sciotti, M.A., Chanfon, A., Hennecke, H. & Ficher, H., (2003). Disparate Oxygen Responseveness of Two Regulatory Cascades That Control Expresion of Symbiotic Genes in *Bradyrhizobium japonicum*, **185**, pp. 5639-5642.

Silva, A.F., Freitas, A.D.S. & Stamford, N.P. (2002). Efeito da inoculação da soja (cv. Tropical) com rizóbios de crescimento rápido e lento em solo ácido submetido à calagem. *Acta Scientifiarum*, **24** (5), pp. 1327-1333.

Somasegaran P. & Hoben H. J. (1994). *Handbook For Rhizobia, Methods in legume-Rhizobium Tecnology*, Spring-Verlag, New York.

Straliotto, R. & Runjanek, N. G., (1999). Biodiversidade do rizóbio que nodula o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e os principais factores que afectam a simbiose. *Seropédia*, **94**, pp. 6104-6187.

Streeter, I. G., (2007). Factors affecting the survival of bradyrhizobium applied in liquid cultures to soya bean [*glycine max* (l.) merr.] seeds. *Journal of Applied Microbiology* **103**, pp. 1282-1290

Surpin, M.A. Maier, J. (1998). Role of the *Bradyrhizobium japonicum* terminal oxodade complexes in microaerobic H₂-dependent growth. *Ciochimica et Biophysica Acta* **1364**, pp. 37-45.

Verissimo, A. F., Pereira, M. M., Todorovic, S. & Teixeira, M. (2005), Characterisation of the redox behaviour of the cbb3 oxygen reductase from *Bradyrhizobium japonicum*. *European Biophysics Journal*, **34**, pp. 666.

Verísimo, A. (2008). *Thermodynamic redox behavior of heme-copper oxygen reductase*, Tese de Doutoramento, Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Universidade Nova de Lisboa, pp.143

Wais, R. J., Wells, D. H. & Long, S. R. (2002). Analysis of Differences Between *Sinorhizobium meliloti* 1021 and 2011 Strains Using the Host Calcium Spiking *Response*. **15**, pp. 1245-1252.

Xavier, G.R., Martins, L.M., Rumjanek, N.G. & Neves, M.C.P. Tolerância de Rizóbio de feijão-caupi à salinidade e à temperatura em condições *in vitro*. *Caatinga*-ISSN 0100-316X, Universidade Federal Rural Do Semi-árido.

Zahran, H. H., (1999). Rhizobium-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **63**, pp. 968-989.