

## DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE AREJAMENTO NECESSÁRIAS À PRODUÇÃO DE NEMÁTODOS EM BIOREACTOR

J. M. NEVES<sup>1</sup>, J. A. TEIXEIRA<sup>2</sup>, N. SIMÕES<sup>1</sup> e M. MOTA<sup>2</sup>

### RESUMO

Determinou-se o consumo de oxigénio para o estado adulto e para os outros estados de desenvolvimento (L<sub>1</sub>- L<sub>4</sub>) de *Steinernema carpocapsae* estirpe Az 20. Verificou-se que o consumo de oxigénio pelo estado adulto é cerca de 12 vezes superior relativamente aos juvenis. A análise dos valores obtidos para o K<sub>L</sub>a em função de vários caudais de arejamento indica que o reactor de circulação induzida pelo ar utilizado não assegura as condições de transferência de massa para satisfazer as necessidades de consumo de oxigénio do nemátodo.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Steinernema carpocapsae* Az 20, arejamento, consumo de oxigénio.

### INTRODUÇÃO

A utilização de nemátodos parasitas de insectos e particularmente dos géneros *Steinernema* e *Heterorhabditis*, em luta biológica é considerada actualmente como uma das vias alternativas à utilização de pesticidas químicos no controlo de pragas agrícolas (Glazer, 1992). No entanto, a aplicação, em grande escala, destes agentes de controlo biológico de insectos praga, só será possível quando se conseguir produzi-los em elevado número e a baixo custo, isto é, quando a sua produção for competitiva com outros meios de controlo.

A produção *in vivo* sobre um insecto, *Galleria mellonella*, embora simples de executar porque se limita a recriar sobre um hospedeiro o ciclo de vida do parasita, é economicamente inviável devido ao peso da mão de obra

---

<sup>1</sup> J. M. Neves, N. Simões, Departamento de Biologia - Universidade dos Açores 9502 Ponta Delgada Codex

<sup>2</sup> J. A. Teixeira, M. Mota, Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Campus de Gualtar 4709 Braga Codex

que incorpora. Por outro lado, a produção *in vitro* no qual o nemátodo cresce em monoxenia com a bactéria simbiote, *Xenorhabdus*, utilizando esponja de poliuretano como suporte (Bedding, 1981, 1984) embora diminua os custos e aumente a produção só é economicamente viável se o nível de produção for superior a  $10^{12}$  nemátodos por mês na medida em que só a partir deste valor o custo da mão de obra permanece constante embora o seu peso no custo de produção continue a ser bastante significativo (Friedman, 1989).

A produção em meio líquido e em fermentador é actualmente aceite como o processo mais indicado à produção de nemátodos com vista à sua comercialização. Para tal, é fundamental determinar os factores críticos e suas interacções.

Uma vez que os nemátodos são seres estritamente aeróbios e constituem, no fermentador, uma fase sólida não homogénea, pois coexistem estados de desenvolvimento diferenciados, é fundamental determinar as necessidades em oxigénio do estado adulto e dos outros estados de desenvolvimento ( $L_1 - L_4$ ), bem como o coeficiente volumétrico de transferência de oxigénio ( $K_{La}$ ) para que desta forma, se consiga assegurar a transferência dos níveis suficientes de oxigénio, da fase gasosa para a fase líquida, necessários e fazer com que o oxigénio não seja um factor limitante na produção de *Steinernema carpocapsae* Az 20.

## **MATERIAL e MÉTODOS**

### **Nemátodo**

O nemátodo utilizado nos ensaios foi *Steinernema carpocapsae* estirpe Az 20 que é um isolado da Ilha Terceira (Açores). A sua conservação é feita em água à temperatura de  $10^{\circ}$  C e à concentração de  $50 \times 10^4$ /ml.

### **Cultura monoaxénica**

Inoculou-se o meio de cultura -meio soja (MS)- (farinha de soja, 1g; extracto de levedura, 1 g; gema de ovo, 2 g; óleo de milho, 1 ml; NaCl, 0,5 g e  $KH_2PO_4$ , 0,25 g; água destilada, 100 ml) com a bactéria simbiote, *Xenorhabdus nematophilus* e incubou-se durante 48 horas a  $30^{\circ}$  C. Dois dias depois, procedeu-se à inoculação dos estados infectantes de *S. carpocapsae* Az 20 previamente desinfectados em superfície com água de javel (10%, 10 min.). Para a obtenção do estado adulto a incubação foi feita durante 4 dias à temperatura de  $25^{\circ}$  C. Para obter os outros estados de desenvolvimento ( $L_1 - L_4$ ) o tempo de incubação foi alargado para 10 dias.

### **Determinação do consumo de oxigénio**

A determinação do consumo de oxigénio foi medida em reactores perfeitamente agitados com 25 ml de volume útil. Foi utilizado este tipo de sistemas para que não houvesse limitações ao consumo de oxigénio. O procedimento seguido constou na determinação da variação da concentração de oxigénio dissolvido com o tempo no meio de cultura após paragem do arejamento. O oxigénio dissolvido foi medido usando um eléctrodo de oxigénio polarográfico Ingold e a aquisição de dados foi feita em computador. O número médio de juvenis utilizados foi de  $4 \times 10^5$  e de adultos de  $6 \times 10^3$  por ensaio num total de 8 repetições para cada ensaio.

### **Determinação experimental do coeficiente volumétrico de transferência de massa ( $K_L a$ )**

A determinação do  $K_L a$  em função de vários caudais de arejamento foi feita no meio MS por diversas vezes e utilizando o método dinâmico (Atkinson & Mavituna, 1983). A concentração do oxigénio dissolvido foi determinada assumindo que a concentração de saturação do oxigénio em meio aquoso arejado (i.e., 100% de saturação) era de 1,26 mmol/L à temperatura de 25° C (Bailey & Ollis, 1986). Estes ensaios foram efectuados na ausência de nemátodos e num reactor de circulação induzida pelo ar.

### **Cálculo do coeficiente volumétrico de transferência de massa ( $K_L a$ ) necessário**

A determinação do coeficiente volumétrico de transferência de massa da fase gasosa para a fase líquida capaz de satisfazer as necessidades de oxigénio foi feita com base na equação 1:

$$K_L a (C^* - C_l) = q_{O_2} X \quad (\text{Eq. 1})$$

que resulta da equação do balanço do oxigénio na fase líquida :

$$dC_l/dt = K_L a (C^* - C_l) - q_{O_2} X \quad (\text{Eq. 2})$$

em que:

$dC_l /dt$  é a variação da concentração de oxigénio dissolvido num determinado período de tempo;  $K_L a$  é o coeficiente volumétrico de transferência de massa da fase gasosa para a fase líquida;  $C^*$  é a concentração de saturação do oxigénio na fase líquida;  $C_l$  é a concentração do oxigénio dissolvido;  $q_{O_2}$  é a velocidade específica de consumo de oxigénio e  $X$  é o número de nemátodos.

## RESULTADOS

### Consumo de oxigénio

No decurso da produção de *S. carpocapsae* Az 20 a população é constituída por uma mistura de estados de desenvolvimento. Dada a impossibilidade de os distinguir e separar, excepção feita ao estado adulto que é facilmente reconhecido e separado (Neves et al., 1996) optamos por dividir a população em dois grupos: os juvenis englobando os estados de desenvolvimento L<sub>1</sub> a L<sub>4</sub> e os adultos englobando machos, fêmeas e, eventualmente, fêmeas grávidas. Foi sobre estes dois grupos que se fez a determinação das necessidades de oxigénio. Os resultados obtidos estão representados na Tabela I.

Tabela I - Oxigénio consumido pelos vários estados de desenvolvimento de *Steinernema carpocapsae* Az 20.

Estado de desenvolvimento	Número de repetições	Média do número de nemátodos	Taxa individual de consumo de oxigénio (mmol/s/individuo)
Adulto	8	$6 \times 10^3$	$1,13 \times 10^{-4}$
Juvenis (L <sub>1</sub> - L <sub>4</sub> )	8	$4 \times 10^5$	$9,48 \times 10^{-6}$

Como se pode verificar pelos resultados apresentados e, embora não seja de excluir a hipótese de existirem variações dentro de cada grupo, os estados adultos apresentam necessidades de oxigénio cerca de 12 vezes superiores aos estados juvenis.

### Caracterização do mecanismo de transferência de massa

Como anteriormente foi referido, os reactores de circulação induzida pelo ar constituem uma alternativa atraente para simultaneamente se obter um bom fornecimento de oxigénio e uma boa mistura. É, pois, importante caracterizar os mecanismos de transferência de oxigénio no reactor projectado para o crescimento dos nemátodos. Tal é efectuado determinando o coeficiente volumétrico de transferência de oxigénio e relacionando-o com o caudal de arejamento. Os valores obtidos encontram-se representados na Fig. 1.

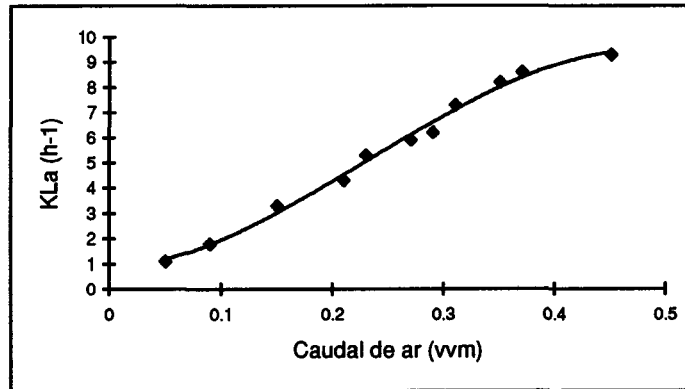


Fig. 1. Variação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigénio com o caudal de ar fornecido.

Os ensaios efectuados, até um caudal de ar de 0.45 v.v.m., indicam um aumento do  $K_La$  com o caudal de arejamento, verificando-se um ligeiro atenuar deste crescimento para os caudais mais elevados, o que está de acordo com o descrito para outros sistemas (Atkinson & Mavituna, 1983). Todavia, os valores obtidos são relativamente baixos. O valor mais elevado,  $9.3 \text{ h}^{-1}$ , é bastante inferior aos descritos na literatura para sistemas idênticos. Tal pode ser devido não só às pequenas dimensões do rector mas também a um deficiente projecto do sistema de distribuição de ar.

#### **Cálculo das necessidades em arejamento do nemátodo**

A aplicação à equação 1 dos valores obtidos para o consumo de oxigénio, permite calcular o coeficiente de transferência de massa capaz de satisfazer as necessidades de oxigénio dos nemátodos. Para a situação menos exigente em termos de consumo de oxigénio correspondente aos estados juvenis e para uma população de  $40 \times 10^3/\text{ml}$  verifica-se que o valor de  $K_La$  exigido é de  $300 \text{ h}^{-1}$  ou seja, 30 vezes superior ao maior  $K_La$  obtido experimentalmente.

## DISCUSSÃO

A produção de *Steinernema carpocapsae* Az 20 exige, como já se referiu, a introdução de processos biotecnológicos onde o fermentador desempenha um papel preponderante (Lima, 1994). A concepção correcta de um fermentador a utilizar na produção de *S. carpocapsae* Az 20 terá que ter em atenção as variáveis a que o sistema físico-biológico se revela mais sensível, nomeadamente a transferência de oxigénio. Da comparação entre os valores de  $K_L a$  determinados experimentalmente e os valores calculados por aplicação da equação de balanço, no estado estacionário, resulta que é fundamental melhorar de forma substancial a transferência de massa. Essa melhoria passa pela introdução de modificações no reactor no que concerne ao volume, ao sistema de distribuição e à operação a caudais de ar mais elevados.

Segundo Friedman et al., 1989 a sensibilidade dos nemátodos às tensões de corte varia ao longo do seu ciclo de vida. Assim sendo, é fundamental que no processo de fornecimento de oxigénio se tenha em atenção a susceptibilidade dos diferentes estados de desenvolvimento do nemátodo a tensões de corte mais elevadas:

A optimização do balanço entre a satisfação das necessidades de oxigénio dos vários estados de desenvolvimento de *S. carpocapsae* Az 20 e a necessidade de aumentar os seus índices de cópula constitui outro factor que deve ser considerado ao ser efectuada a selecção das condições de arejamento.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATKINSON, B. & F. Mavituna. 1983. Gas-liquid mass transfer. In *Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook*. The Nature Press, New York. 727-802.
- BAILEY, J. E. e D. F. Ollis. 1986. Transport phenomena in microbial systems. In: *Biochemical Engineering Fundamentals*. MacGrowth-Hill, New York. 411-495.
- BEDDING, R. A. 1981. Low cost in vitro mass production of *Neoplectana* and *Heterorhabditis* species (Nematoda) for field control of insect pests. *Nematologica* **27**: 109-114.
- BEDDING, R. A. 1984. Large scale production, storage and transport of the insect-parasitic nematodes *Neoplectana* and *Heterorhabditis* spp. *Annals of Applied Biology* **104**: 117-120.
- FRIEDMAN, M. J. ; S. L. Langston & S. Pollitt. 1989. Mass production in liquid culture of insect-killing nematodes. *International Patent WO 89/04602*.

- FRIEDMAN, M. J. 1990. Commercial production and development. In: *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*, eds., R. Gaugler and H. K. Kaya. Boca Raton, Florida: CRC Press. 327-345.
- GLAZER, I. 1992. Invasion rate as a measure of infectivity of Steinernematid and Heterorhabditid nematodes to insects. *Journal of Invertebrate Pathology* **59**: 90-94.
- LIMA, N. 1993. Rastreio e melhoramento genético de características fúngicas com interesse industrial. *Dissertação de Doutoramento em Engenharia. Universidade do Minho*. 2-23.
- NEVES, J. M.; J. A. Teixeira, N. Simões & M. Mota. 1996. A rapid method for separation of adults in a mixed population of *Steinernema carpocapsae* (Nematoda: Steinernematidae). *Fundamental and Applied Nematology* **19** (1): 95-102.