

Tecnologia de Biorreatores e Propagação Fotoautotrófica



Ricardo Penchel



Wagner Otoni

Aloisio Xavier

Justificativas para Automação

Aplicação da tecnologia em escala comercial.

+

Necessidade de minimizar custos na micropropagação industrial

↓

Desenvolvimento de novas estratégias e equipamentos de automação

Biorreatores

Termo geralmente utilizado para descrever um recipiente contendo uma reação biológica.
(De Bry, 1986)

Refere a um recipiente utilizado para a cultura aeróbica de células, fermentadores ou colunas de células imobilizada ou enzimas.
(Combs, 1986)



Obtenção de grande número de brotos ou plântulas em ciclos de produção e custos mais reduzidos

Histório de Biorreatores em Plantas

- 1972** Utilização de fermentadores convencionais em suspensão celular de embriões somáticos (Kessel & Carr, 1972)
- 1981** Primeiro relato sobre a utilização da técnica de biorreatores na micropropagação de begônia (Takayama, 1981)
- 1985** Utilização da técnica de imersão temporária e periódica do explante em meio líquido (Tisserat & Vandercook, 1985)
- 1986-96** Produção em larga-escala de espécies ornamentais (Lírio, bromélia) e agrônômicas (batata, estévia, banana).
- 2000-05** Desenvolvimento de novos equipamentos para cultivo de embriões somáticos, multiplicação de gemas e brotos de várias espécies.
- 2005-07** Utilização comercial na micropropagação de espécies arbóreas em biofábricas.

Primeiros Biorreatores

Fermentadores:

- Desenvolvidos para fungos e bactérias
- Imersão contínua dos explantes
- Agitação mecânica e borbulhamento
- Sofisticados e caros
- Adaptados para cultivo de células
- Não se prestam para cultivo de gemas e plântulas



Biorreatores












Vantagens

- Alta produtividade e eficiência do processo
- Melhor controle das condições da cultura
- Suprimento ótimo de nutriente/bioregulador
- Automação do processo
- Mudança e adequação do meio

Desvantagens

- Hiperidricidade do explante
- Variação do tamanho da plântula
- Contaminação microbiana
- Recalcitrância de algumas espécies

Comparação Biorreator x Ágar

Itens	Biorreator	Ágar	Variação
Recipientes			
Volume (L)	20 - 500	0,5 – 1,0	99 % 
Capacidade (L)	15 - 300	0,05 – 0,10	99 % 
Quantidade	6 - 10	1.000	100 X 
Quantidade inóculo	90 - 100	150 - 200	84 % 
Período cultivo (dias)	90	60	33 % 
Espaço cultivo (m³)	1 - 2	35 - 40	27 X 
Mão de obra (min)			
Tempo operacional	200	2.500	92 % 
Preparo meio	60	450	87 % 
Autoclavagem	10	140	93 % 
Inoculação	45	1.250	96 % 
Manejo culturas	55	360	85 % 

Biorreator	Descrição	Aplicação
Aerador agitador	Agitação por hélices em eixo giratório.	Cultivo celular e embriões somáticos.
Tambor rotatório	Movimento leve e rotacional em dois eixos.	Cultivo de embriões e brotos.
Filtro rotatório	Filtro conectado ao eixo central por membrana.	Cultivo de embriões somáticos.
Borbulhamento	Borbulhamento de ar no fundo do frasco.	Multiplicação de gemas e alongamento brotos.
Levantamento ar	Borbulhamento de ar dentro de tubo vertical.	Multiplicação de gemas e alongamento brotos.
Fase gasosa	Meio cultura pulverizado sobre o explante.	Cultivo de células, tecidos e órgãos.
Aeração por membrana porosa	Aeração via canalização porosa em espiral.	Cultivo de tecidos e órgãos.
Sobreaeração	Aeração via ventilação forçada sobre o meio.	Cultivo de células e tecidos.
Imersão temporária	Meio em contato rápido com explante.	Multiplicação de gemas e alongamento brotos.

Biorreator de Imersão Temporária

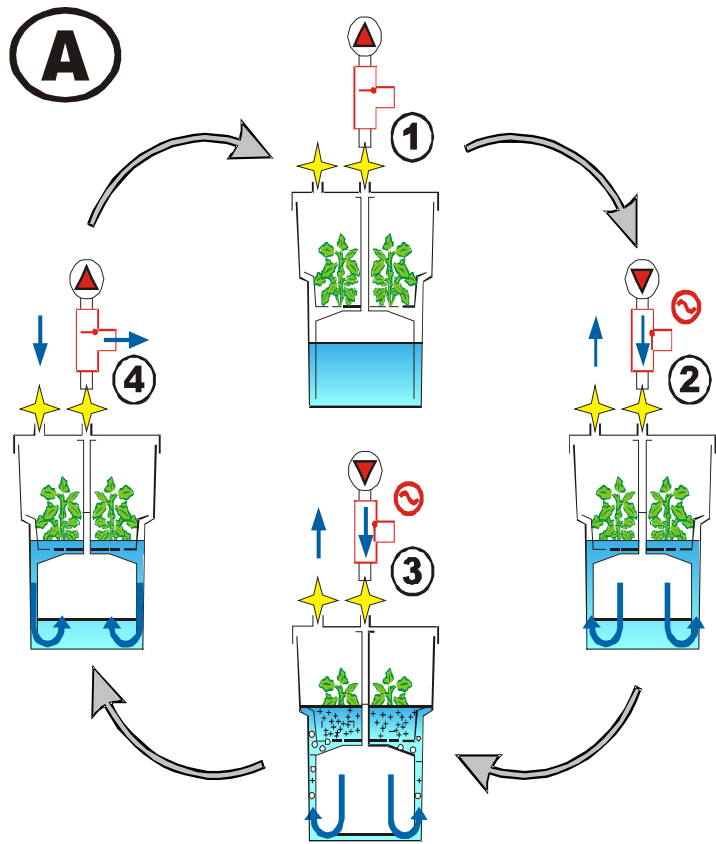
R I T A:

- Imersão da parte aérea
- Cultivo heterotrófico
- Baixo risco contaminação
- Ideal para multiplicação
- Baixa hiperidricidade
- Alvard et al. 1993

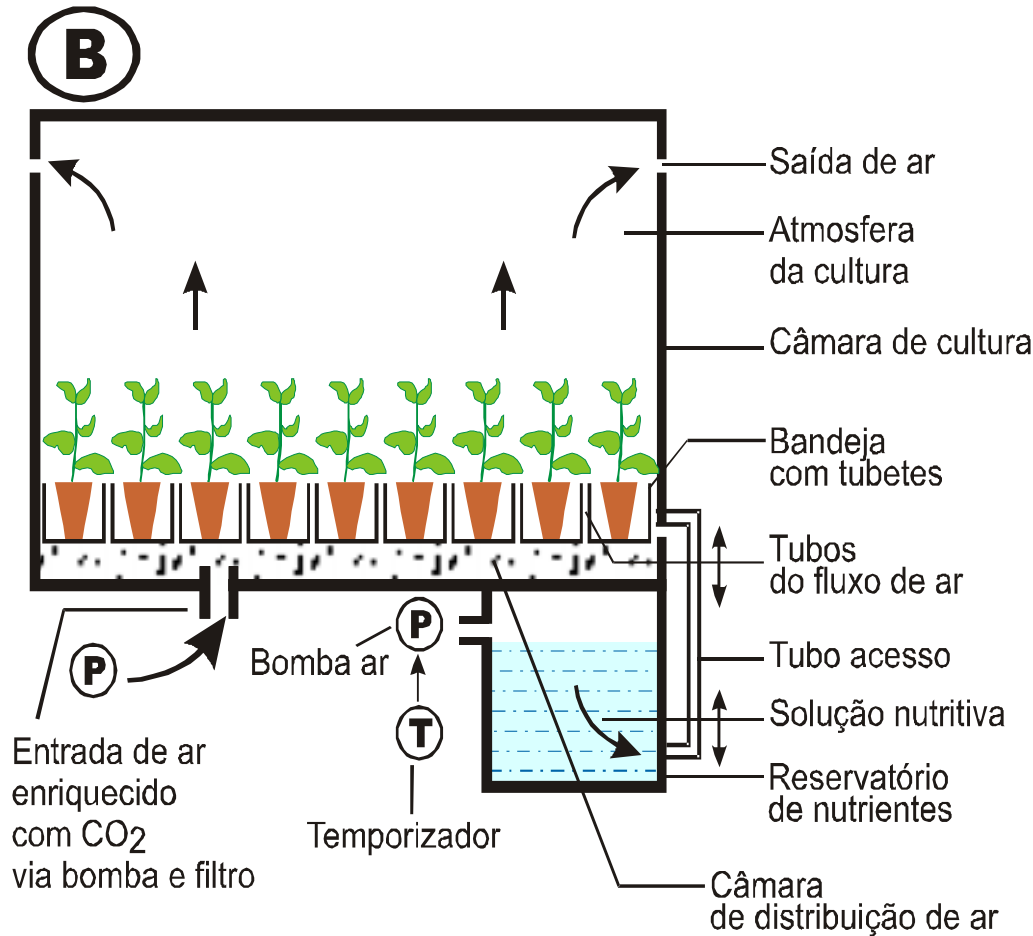
T R I:

- Imersão da parte radicial
- Cultivo autotrófico
- Ausência contaminação
- Ideal para aclimatação
- Ausência hiperidricidade
- Afreen et al. 2002

RITA Vs. TRI



☐ Válvula solenóide ✨ Filtro Ar ▼ Bomba

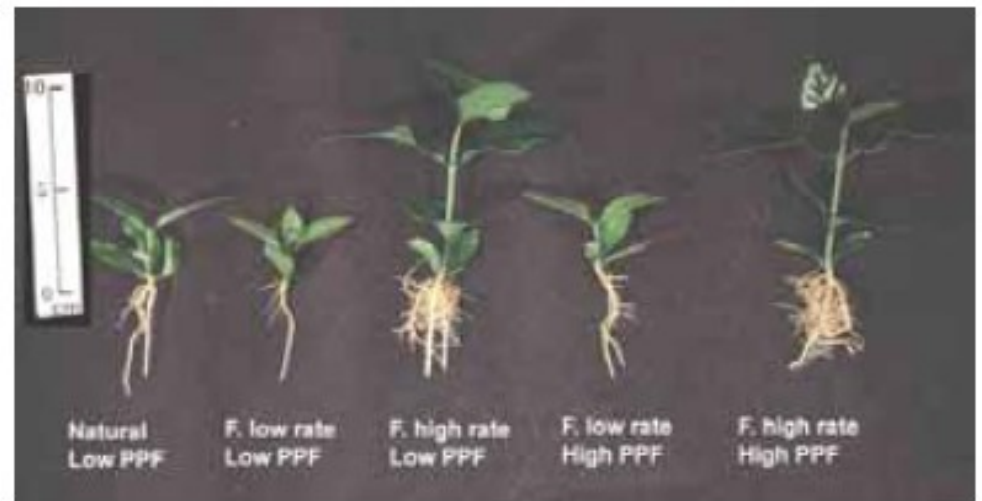


Cultura Fotoautotrófica de Café



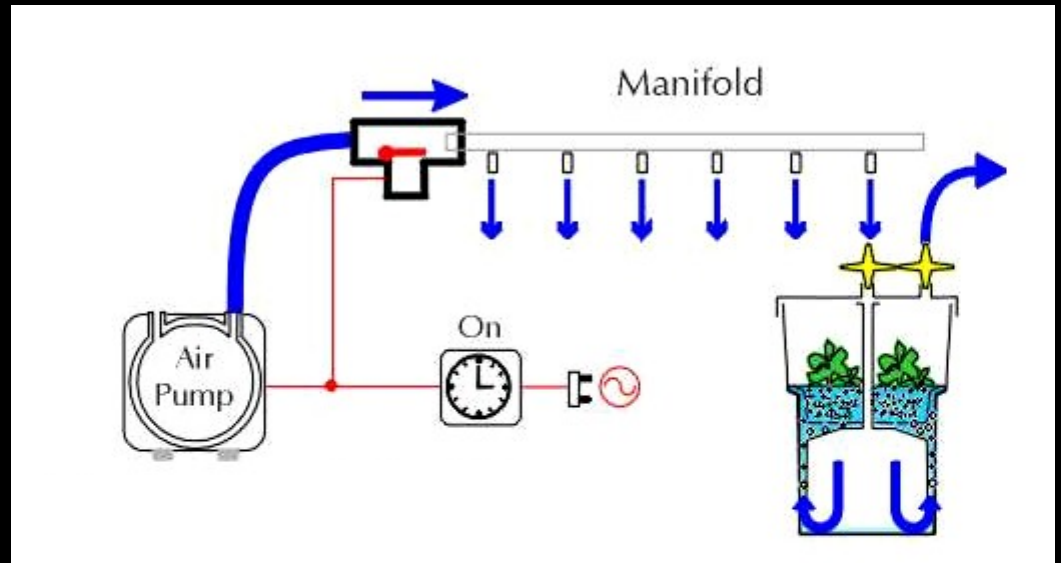
Nguyen et al. 2001

Zobayed et al. 2000

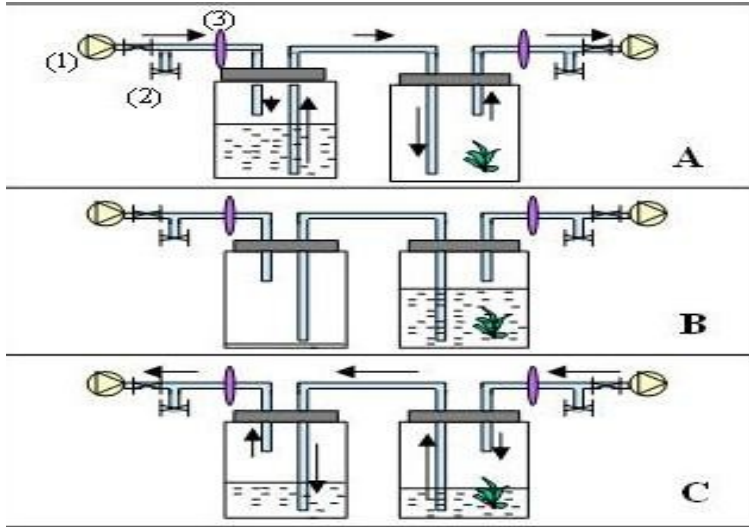




Montagem do Biorreator Rita

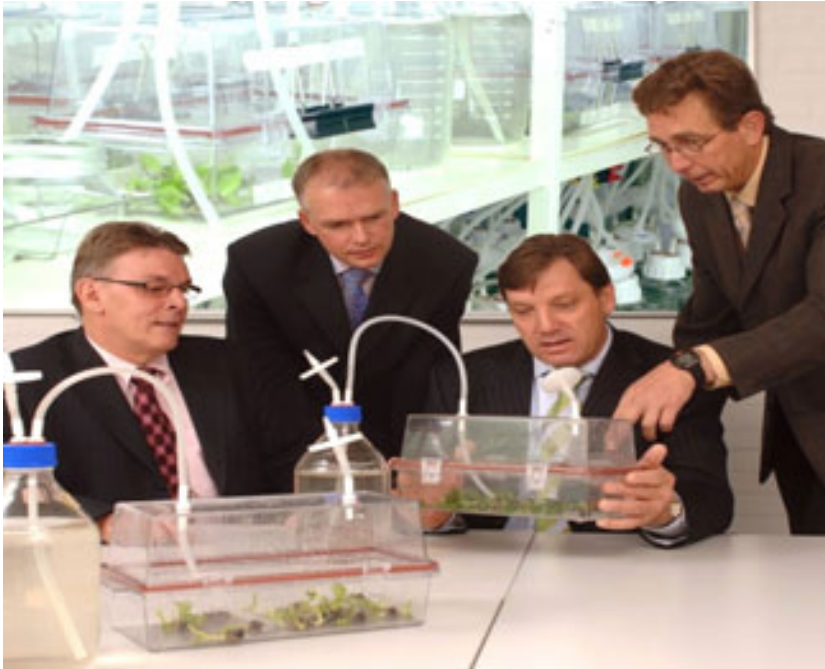


Eucalipto em BIT



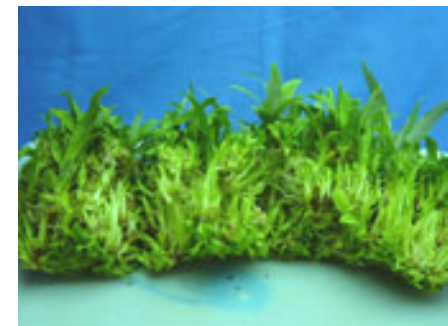
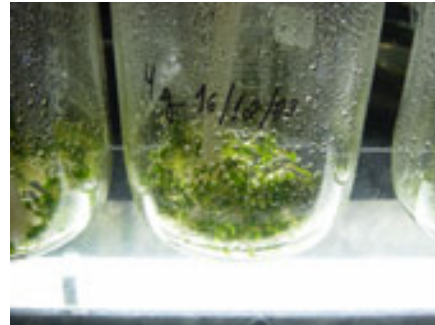


Eucalipto em BIT

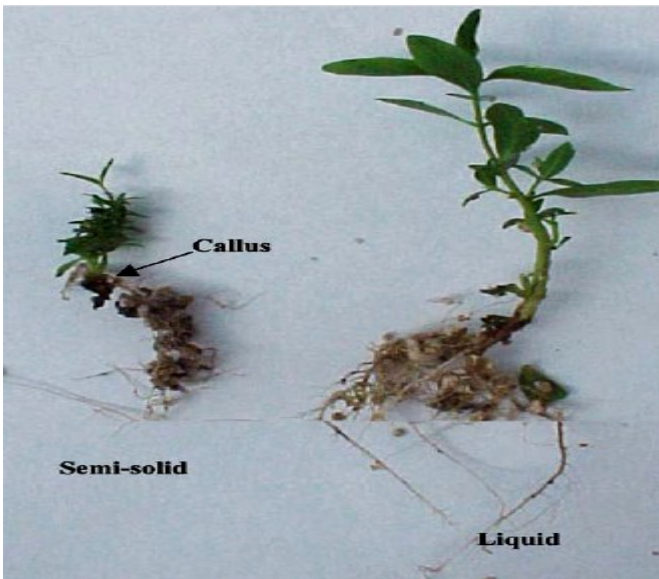
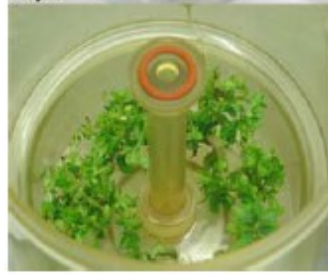
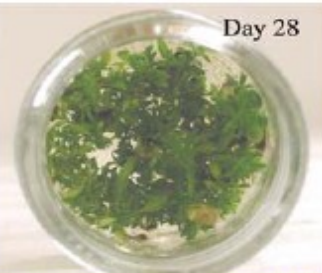
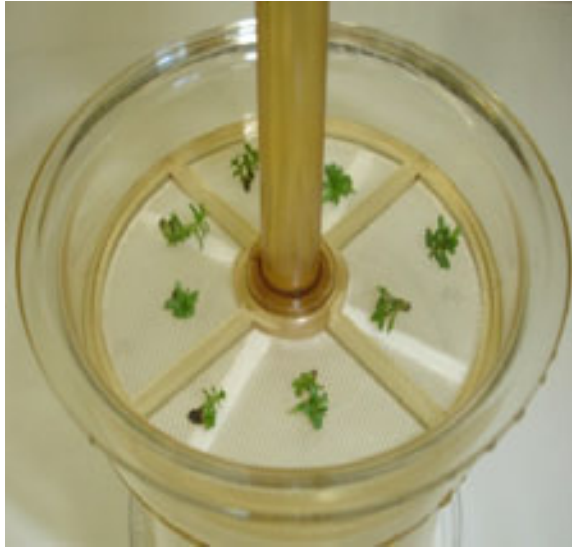


- Pesquisa em andamento em biorreatores comerciais 50 litros
- Liberação controlada de nutrientes e fitoreguladores no meio cultura
- Marcadores para alterações fisiológicas e morfo-anatômicas na cultura

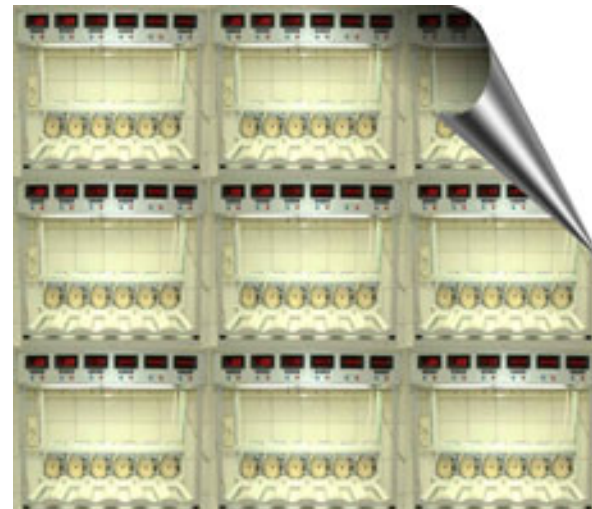
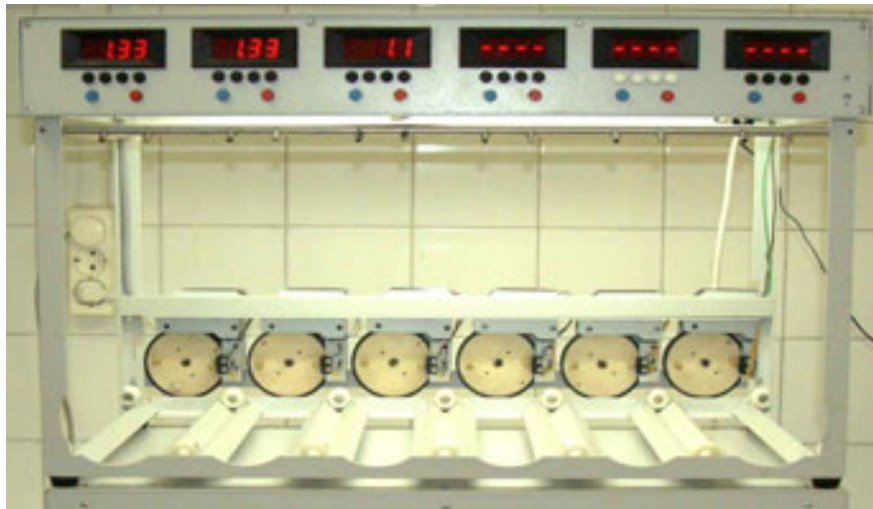
Imersão Temporária



Produção de Mudras de Eucalipto

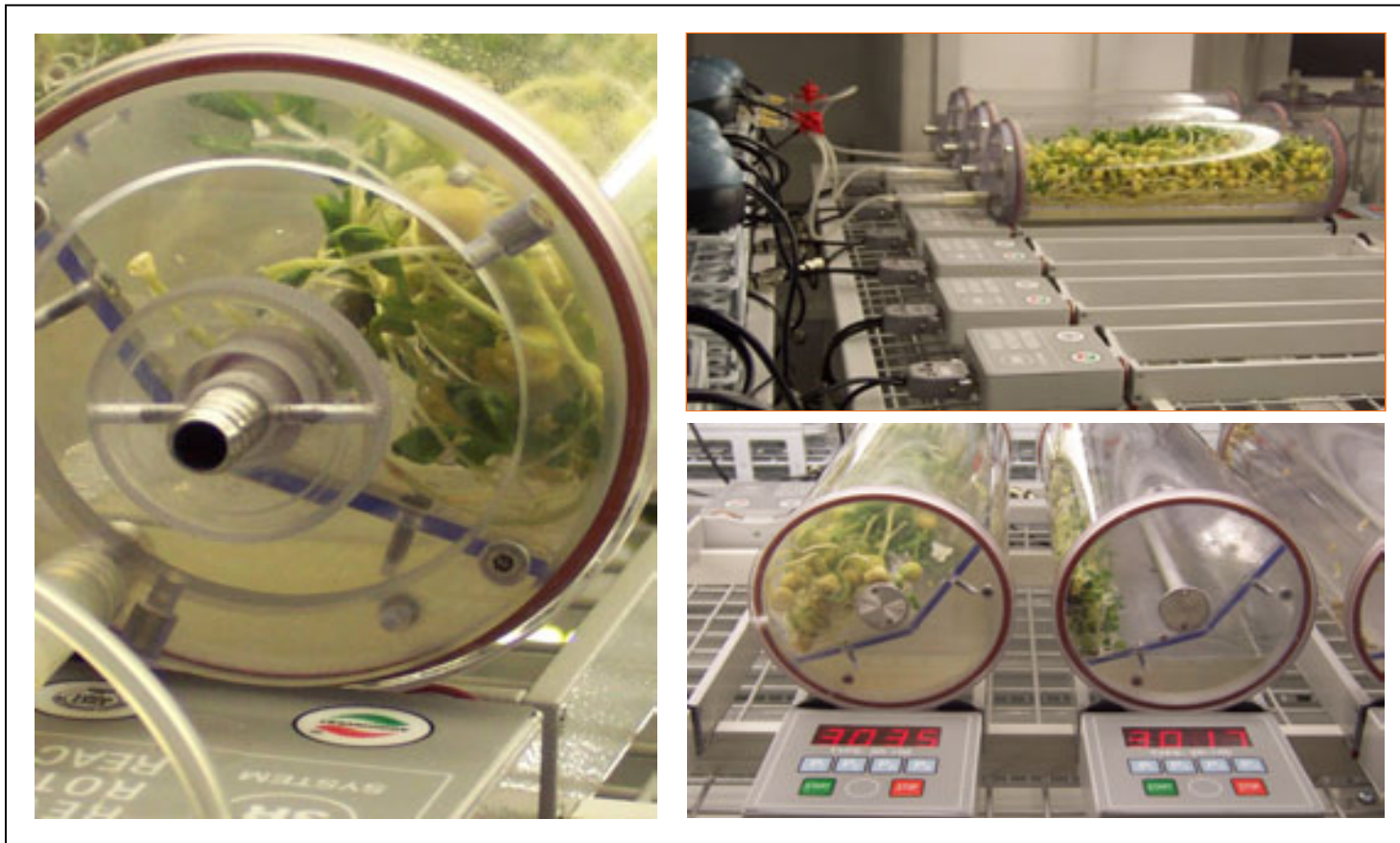


3R-System



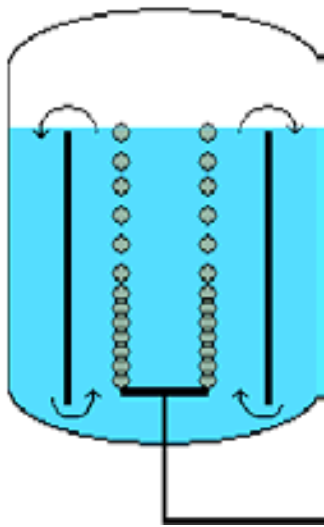
- Agroiinvest, University Debrecen e Faculdade de Horticultura Zsent István (Hungria).
- Concepção modular de biorreator que reúne versatilidade e praticidade de operação.

3R-System

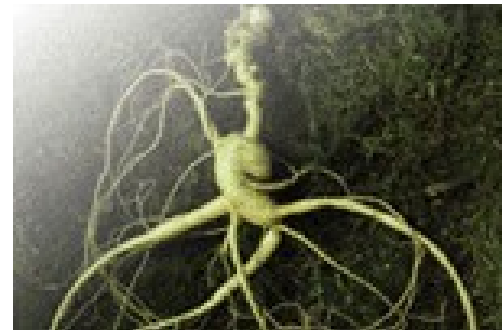
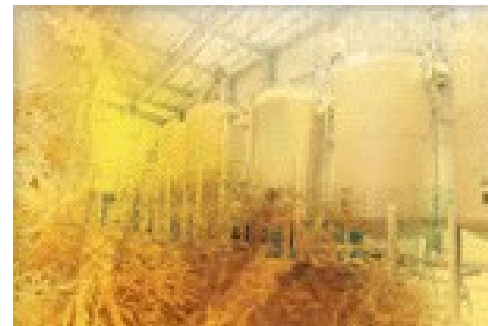


- Permite o enriquecimento da atmosfera com CO_2 , O_2 e H_2O .
- Cilindros dos reatores podem ser construídos com capacidade de 0,5 a 15,0 litros.
- Novas versões otimizadas do biorreator já se encontram em fase de comercialização.

Biorreatores Comerciais



air lift bioreactor



Impactos de Biorreatores

Redução Mão Obra

- Redução número frascos
- Aumento volume frascos
- Redução da frequência de repicagens
- Menor tempo na troca de meio cultura
- Menor tempo etiquetagem

Redução Energia

- Uso frascos descartáveis estéreis
- Dispensa esterilização em autoclave
- Esterilização do meio em filtros, UHT, química
- Menor demanda autoclave

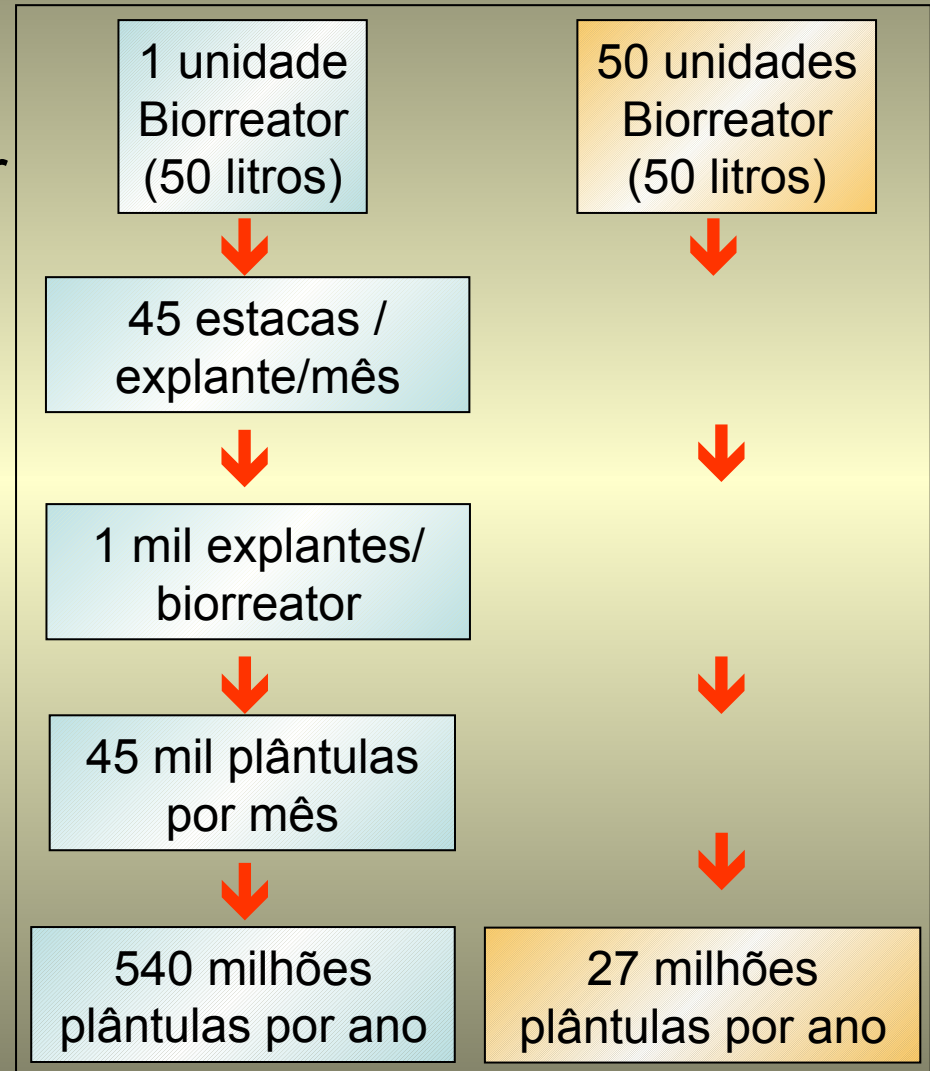
**Maior segurança quanto
pureza e limpeza**

**Menor custo
de produção**

**Maior flexibilidade de
produção**

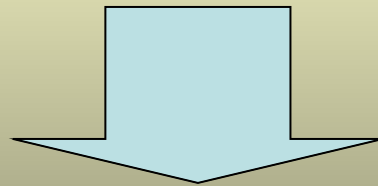
Uso Potencial no Viveiro

- Agilizar a produção de plântulas para reestabelecer matrizes rejuvenescidas ou revigoradas no jardim clonal.
- Multiplicação massiva de microestacas *in vitro* em biorreatores e subsequente estaqueamento, enraizamento *ex vitro* e produção de plântulas.



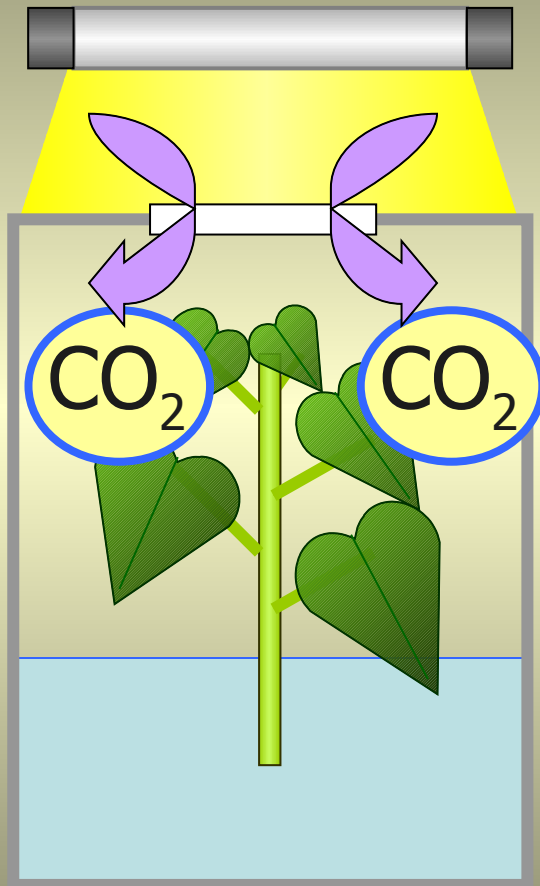
Aspecto das Plântulas *in vitro*

- Pouco lignificadas
- Paredes pouco espessadas
- Abundância de espaços intercelulares
- Sistema vascular pouco desenvolvido
- Baixa sustentação da plântula



POSSÍVEIS DESORDENS FISIOLÓGICAS

Sistema Fotoautotrófico

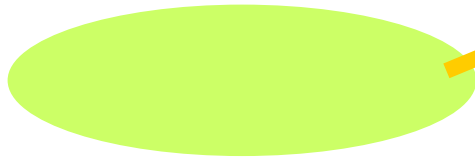


O conceito baseia na alta capacidade fotossintética da cultura com consequências positivas sobre o crescimento e percentual de sobrevivência *ex vitro*, aumentada ainda mais com aumento das trocas gasosas nos recipientes de cultivo.

(Kozai et al., 1999)

Estágio de Multiplicação

Condição fotomixotrófica

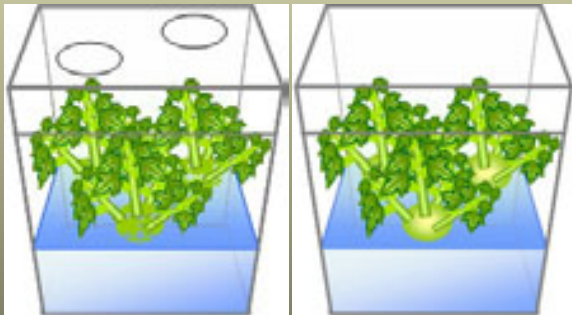


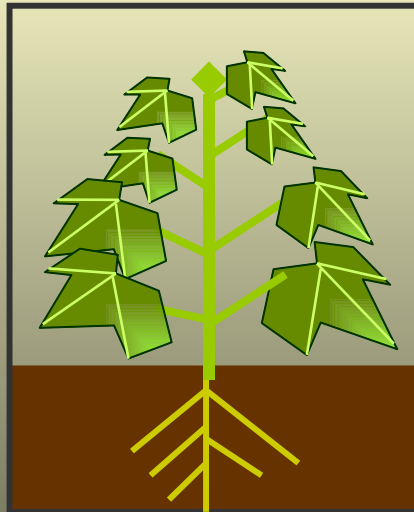
Alongamento/Enraizamento

Condição Fotoautotrófica

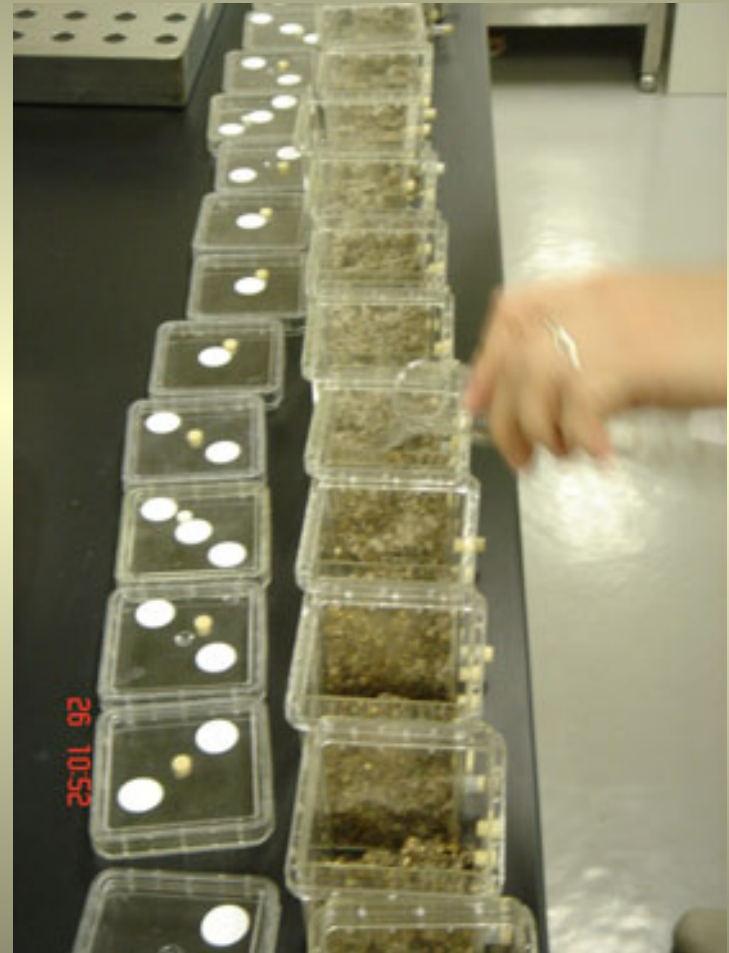


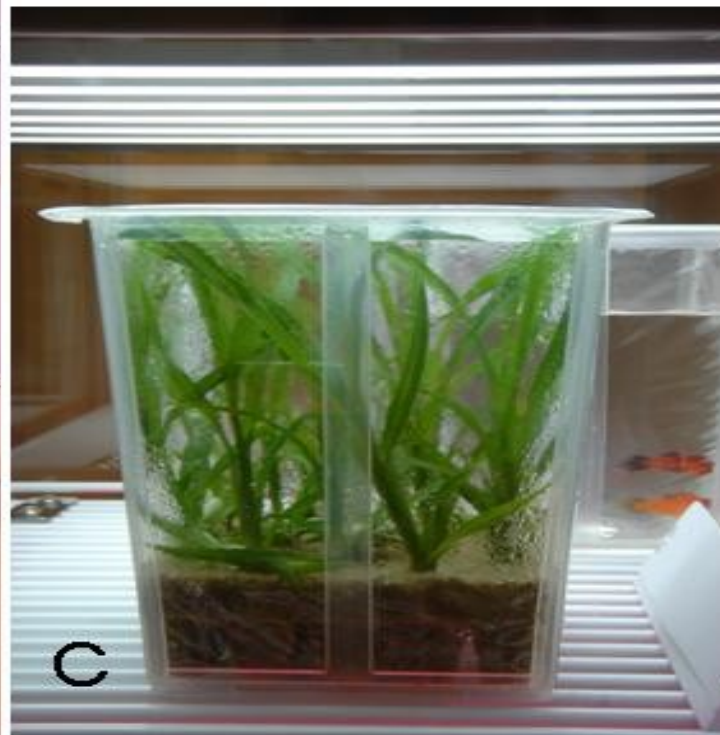
- 'Sugar-free'
- Alta [CO₂]
- Alta DFF
- Florialite





Substrato Florialite®





Câmara de crescimento Biotron (Nippon Medical & Chemical Instruments, Japão)

Crescimento Fotoautotrófico de Eucalipto



Figure 2. Photoautotrophic growth of eucalyptus (*Eucalyptus camaldulensis*) for 6 weeks (By courtesy of Kirdmanee C.). Eucalyptus plants in vitro under CO_2 non-enriched and enriched conditions, using 4 different supporting materials (A); and roots of eucalyptus plants in vitro under CO_2 enriched conditions (B). In the treatment legends, L and H at the left denote the CO_2 enriched and non-enriched conditions, respectively; A, G, L and V at the right denote agar, Gelrite, plastic net and vermiculite, respectively.

Crescimento Fotoautotrófico de Gmelina

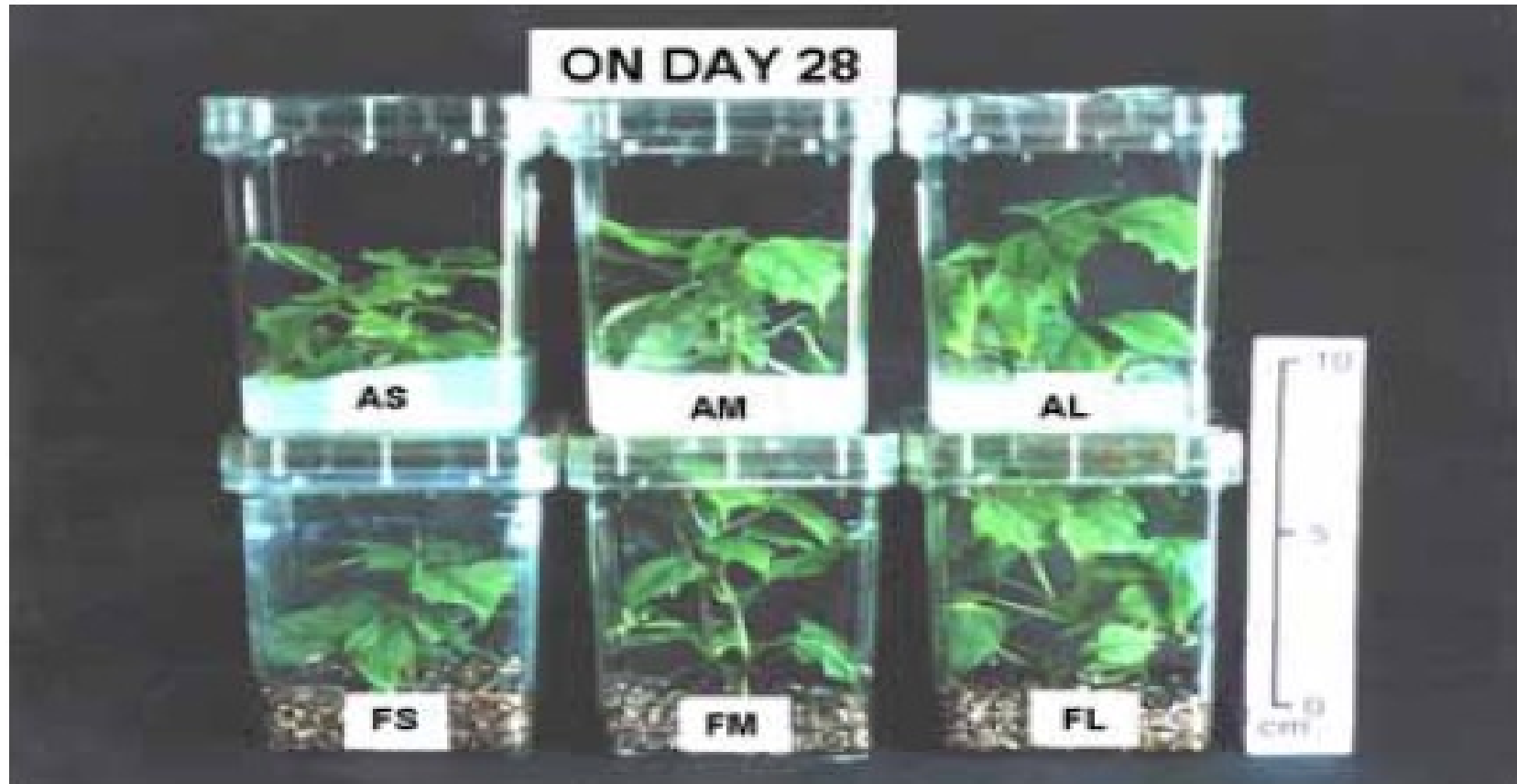


Figure 4. Photoautotrophic growth of *Gmelina arborea* Roxb. Plants in vitro as affected by number of air exchanges of vessel and supporting materials on day 28. In the treatment legends, A and F at the left denote agar and Florialite, respectively. S, M and L at the right denote the number of air exchanges of 2, 3.5 and 4.2 h^{-1} , respectively (Nguyen and Kozai, 2001).

Agradecimentos

- | | | |
|------------------------|------------------|---------|
| • Alexandre Missiaggia | Aracruz | Brasil |
| • Andreia Henrique | Aracruz | Brasil |
| • Clemencia Söndahl | Bionova | Brasil |
| • Conny de Wit | Sbw | Holanda |
| • Gabriel Dehon | Aracruz | Brasil |
| • João Teixeira | Embrapa | Brasil |
| • Jocemar Reis | Aracruz | Brasil |
| • Justo González | Bioplantas | Cuba |
| • Maro Söndahl | Bionova | Brasil |
| • Miklós Fári | Agroinvest | Hungria |
| • Reginaldo Mafia | Aracruz | Brasil |
| • Toyoki Kozai | Chiba University | Japão |
| • Vincent Chen | Exon | Taiwan |
-



National University Corporation
Chiba University
国立大学法人 千葉大学

