



SEI-SICITE 2021

Pesquisa e Extensão para um mundo em transformação

XI Seminário de Extensão e Inovação
XXVI Seminário de Iniciação Científica e Tecnológica
08 a 12 de Novembro - Guarapuava/PR



Otimização da fermentação de *Bacillus subtilis* para aplicação “on farm”

OPTIMIZATION OF *Bacillus subtilis* FERMENTATION FOR “ON FARM” APPLICATION

João Guilherme Buzetto Tsuchiya (orientado)*, Paulo Agenor Alves Bueno (orientador)†, Yumi Munetiko‡, Leonardo Borges Coletto Correia§, Adriele Rodrigues dos Santos¶
Cristian Coelho Silval

RESUMO

Com a crescente demanda por alimentos a via tradicional de cultivo com o uso de agroquímicos se tornou constante e abundante. No entanto, devido ao surgimento de diversos problemas, deu se inicio a busca por outras fontes de insumos mais sustentáveis. Assim, os bioinsumos, em especial aos formulados a partir do microrganismo *Bacillus subtilis*, que possui grande destaque por sua produção de lipopeptídeos, com propriedades biossurfactantes e antimicrobianas, se tornam uma viável alternativa. O presente estudo foca na otimização do meio de crescimento do *B. subtilis*, visando acelerar o tempo de fermentação, dispensar equipamentos sofisticados e diminuir o custo de produção. Foram utilizados 5 meios de cultura base: Comum, já utilizado pela empresa Celf; modificado; alternativos 1 e 2 e Junção. Devido as características dos meios Alternativos e Junção, foi possível alcançar altas taxas de crescimento, com maior controle do pH de fermentação, e ainda tornando o meio mais barato.

Palavras-chave: *Bacillus subtilis*, inoculantes biológicos, biotecnologia do solo.

ABSTRACT

With the growing demand for food, the traditional way of cultivation with the use of agrochemicals has become constant and abundant. However, due to the emergence of several problems, the search for other more sustainable sources of inputs began. Thus, bioinputs, especially those formulated from the microorganism *Bacillus subtilis*, which has great prominence for its production of lipopeptides, with biosurfactant and antimicrobial properties, become a viable alternative. The present study focuses on optimizing the *B. subtilis* growth medium, aiming to accelerate fermentation time, dispense with sophisticated equipment and reduce production cost. Five base culture media were used: Common, already used by the company Celf; modified; alternatives 1 and 2 and Junction. Due to the characteristics.

Keywords: *Bacillus subtilis*, biological inoculants, soil biotechnology.

* Engenharia Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil; jtsuchiya@alunos.utfpr.edu.br

† Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Campo Mourão; pabueno@utfpr.edu.br

‡ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil; yumimunetiko@alunos.utfpr.edu.br

§ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil; leonardoborges@alunos.utfpr.edu.br

¶ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil; adrielesantos@utfpr.edu.br

l CELF – Energia Renováveis e Bioenergia, Campo Mourão, Paraná, Brasil; cristian_coelho@yahoo.com.br



1 INTRODUÇÃO

A crescente expansão agrícola torneada pela demanda por alimentos elevou o uso de agrotóxicos. No início considerados uma modernização na agricultura, tendo o intuito de aumentar a produtividade e garantir segurança às plantas, fazendo com que grande parte dos agricultores passasse a utilizá-los (REZENDE et al., 2021).

Dessa forma, os bioinsumos agrícolas, produtos de origem microbiana com função de promover o crescimento e nutrição das plantas, bem como o controle de pragas, se destacam como uma das estratégias com maior viabilidade para substituição dos agrotóxicos. Uma vez que são produtos naturais, não tóxicos, não seletivos, possuem alta eficácia e o seu custo de produção é menor que o de um agroquímico (BENETTI, 2017; MONNERAT, 2020). Nesse sentido, as bactérias do gênero *Bacillus spp.* são comumente usadas e, dentro desse gênero, uma das bactérias com maior destaque é o *Bacillus subtilis*. Esta bactéria é naturalmente encontrada no solo junto à rizobactérias promotora do crescimento em plantas, destaca-se pela produção de lipopeptídeos, com propriedades biossurfactantes e antimicrobianas (CAMPOS, 2008; MAZZUCHELLI; SOSSAI; ARAUJO, 2014).

A produção em larga escala de produtos a base de microrganismo, carrega certos fatores que podem influenciar no tempo, na viabilidade e na eficácia dos mesmos. Fatores como o tempo de fermentação, composição do meio de cultura, pH e temperatura de fermentação, bem como todo o controle de segurança e avaliação de crescimento, devem ser considerados (OLIVEIRA, 2006; GOMES et al., 2016).

Para realização do estudo foi utilizado uma cepa comercial (*Bacillus subtilis* - ATCC 6051) adquirido pela empresa em parceria com a Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR – Campo Mourão). A partir deste microrganismo foram realizados testes de fermentação, visando à aplicação “On Farm”, no qual o objetivo foi testar diferentes meio de cultura para otimizar o processo de fermentação, uma vez que, a partir o meio de cultura pode se conseguir diminuição da concentração de contaminantes, otimização do tempo de fermentação, economia com equipamentos sofisticados como sondas de pH, e uma melhor aplicabilidade em relação as estruturas “On Farm”. Por tanto será possível otimizar o processo de fermentação do *Bacillus subtilis* a partir do meio de cultura?

2 MÉTODO

2.1 Culturas bacterianas e condições de crescimento

O trabalho foi conduzido no laboratório da empresa CELF – Energias Renováveis e Bioenergias. Para o estudo foi utilizada a bactéria *Bacillus subtilis* ATCC 6051 obtida do laboratório da empresa CELF em parceria com o Laboratório de Biologia Molecular da UTFPR – Campo Mourão, e estocados em caldo Infusão Cérebro Coração (BHI) com 20% de glicerol a -20 °C. Para o preparo do inóculo a ser utilizado nos reatores cerca de 5 colônias isoladas e características de *B. subtilis* em agar MYP foram passadas para 200 mL de caldo TSB em frasco reagente. Após a inoculação, os frascos reagentes seguiram para mesa shaker, a uma velocidade de 100 RPM a 35 °C por 24 horas.



2.2 Estudo da otimização do meio de cultura

O estudo da otimização do meio de cultura para produção de bioinsumos seguiu a partir da comparação de cinco meios de cultivo denominados: Meio Comum (Padrão utilizado pela empresa CELF), Meio modificado (meio comum com as concentrações dos componentes modificadas), Meio Alternativo 1 (CARVALHO, 2005), Meio Alternativo 2 (OLIVEIRA, 2006) e Meio Junção. O Quadro 1 abaixo mostra a composição de cada meio de cultivo utilizado.

Quadro 1. Meio de cultura e suas composições.

Componentes	Meio comum (g/L)	Meio modificado (g/L)	Meio alternativo 1 (g/L)	Meio alternativo 2 (g/L)	Meio Junção (g/L)
Azul de bromotimol	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009
Cloreto de sódio (NaCl)	7,500	6,400	-	-	-
Dextrose	-	-	-	20,000	-
Extrato de levedura	1,000	0,850	-	0,500	0,500
Fosfato monopotássico (KH ₂ PO ₄)	1,000	0,850	4,000	-	4,000
Fosfato de potássio bibásico (K ₂ HPO ₄)	-	-	13,600	10,500	13,600
Fosfato de sódio (Na ₂ HPO ₄)	-	-	-	1,730	-
Glicerina	40,000	30,000	20,000	-	20,00
Nitrato de Sódio (NaNO ₃)	-	-	2,000	-	-
Sulfato de Amônia ((NH ₄) ₂ SO ₄)	-	-	2,000	11,450	6,000
Sulfato de Magnésio Hephidratado (MgSO ₄ .7H ₂ O)	0,500	0,430	0,200	0,040	0,200
Triptona	5,000	3,250	-	-	-

Fonte. Autoria própria (2021).

Para os testes de fermentação foi usado um biorreator de coluna de bolhas de 500 mL composto por: uma entrada de ar comprimido, uma canaleta para inserção de ar comprimido que ao final continha uma pedra porosa, uma canaleta para coleta, um coletor de amostra e um air lock, que era ligado a um recipiente que estava preenchido de ácido peracético.

O frasco foi preenchido com 360 mL do meio de cultivo e 40 mL do inóculo de *B. subtilis* (90% de meio de cultura e 10% de inóculo), ao início de processo foi adicionado 0,16 mL de antiespumante. Os reatores foram então colocados em câmara BOD a 38 °C (± 2 °C) por 10 horas. Durante todo o processo 1 vvm de ar comprimido era inserido aos frascos (CARVALHO, 2005; OLIVEIRA, 2006).

Teste 1: O teste foi realizado a fim de avaliar se, caso houvesse alteração na concentração dos componentes do Meio Comum, haveria alteração no crescimento da bactéria, bem como se haveria maior queda de pH; Teste 2: O teste foi realizado para avaliar diferentes concentrações de sais de tamponamento, e diferentes fontes de nitrogênio; Teste 3: O teste avaliou diferentes concentrações de sais de tamponamento, e diferentes fontes de nitrogênio; Teste 4: O teste foi realizado alterando-se a fonte de



carboidrato (Glicerina ou Dextrose), para se analisar em relação ao crescimento se haveria expressiva diferença; Teste 5: O teste foi realizado para se analisar sua de efetividade, comparado ao meio comumente usado no laboratório. Para avaliar o crescimento as amostras foram diluídas em solução salina 0,85% e cada diluição semeada por gotas em ágar Triptona de soja (TSA)

Outro valor analisado foi o pH, a cada coleta foi medido em pHmetro digital e, durante todo o teste, acompanhado por meio de observação visual da mudança de coloração do meio de cultivo. Isto foi possível devido à presença do indicador de pH Azul de Bromotimol em sua composição.

3 RESULTADOS

Os testes foram realizados com intervalos de coleta: 30 minutos para a primeira, 3 horas para a segunda e a terceira e 4 horas para quarta coleta.

Quadro 2. Resultados do crescimento e valor de pH para todos os testes avaliados.

Teste 1				
Tempo de coleta	Meio comum		Meio modificado	
	Concentração média (UFC/mL)	pH médio	Concentração média (UFC/mL)	pH médio
30 min	$2,60 \times 10^7$	7,13	$2,495 \times 10^7$	7,15
10 horas	$5,5 \times 10^8$	5,68	$1,31 \times 10^9$	5,26
Teste 2				
Tempo de coleta	Meio comum		Meio alternativo 1	
	Concentração média (UFC/mL)	pH médio	Concentração média (UFC/mL)	pH médio
30 min	$6,22 \times 10^7$	6,87	$5,55 \times 10^7$	7,05
10 horas	$5,70 \times 10^9$	5,46	$4,49 \times 10^9$	6,53
Teste 3				
Tempo de coleta	Meio modificado		Meio alternativo 2	
	Concentração média (UFC/mL)	pH médio	Concentração média (UFC/mL)	pH médio
30 min	$1,10 \times 10^8$	6,83	$3,83 \times 10^7$	7,64
10 horas	$1,27 \times 10^9$	5,14	$4,68 \times 10^9$	6,82
Teste 4				
Tempo de coleta	Meio alternativo 2 (Glicerol)		Meio alternativo 2 (Dextrose)	
	Concentração média (UFC/mL)	pH médio	Concentração média (UFC/mL)	pH médio
30 min	$7,32 \times 10^7$	7,40	$7,52 \times 10^7$	7,31
10 horas	$8,08 \times 10^9$	5,91	$8,33 \times 10^9$	6,95
Teste 5				
Tempo de	Meio comum		Meio junção	



coleta	Concentração média (UFC/mL)	pH médio	Concentração média (UFC/mL)	pH médio
30 min	$4,14 \times 10^8$	6,82	$2,88 \times 10^8$	7,35
10 horas	$7,07 \times 10^8$	5,39	$8,50 \times 10^9$	6,05

Fonte. Autoria própria (2021).

Com base nos resultados mostrados no Quadro 2, é possível afirmar que os meios propostos por Carvalho (2005) e Oliveira (2006), possui características que otimizam o processo de fermentação. Dessa forma a formulação do Meio Junção, também foi satisfatória, pois apresenta alta taxa de crescimento e um bom controle de pH. Ainda em relação ao controle de pH, em todos os meios foi usado um indicador o Azul de Bromotimol, que geralmente não é encontrado nos meios de cultura do *Bacillus subtilis*, esse reagente possibilita acompanhamento de pH e estimativas de forma visual.

4 CONCLUSÃO

Foi possível alcançar um ótimo meio de cultura para produção de *Bacillus subtilis*, a partir das condições apresentadas por Carvalho (2005) e Oliveira (2006), nos parâmetros de temperatura e de pH. Também foi possível otimizar o meio a partir dos meios utilizados pelos autores, obtendo assim um meio com fontes de carboidratos e nitrogênio de fácil assimilação, proporcionando um alto crescimento em 10 horas de processo, reduzindo, do processo tradicional usado na empresa, 14 horas de fermentação. Além das concentrações de sais de tamponamento, este tempo de fermentação, possibilita menos controle de pH, visto que ao fim das 10 horas de processo, a concentração do Meio junção, está em $8,50 \times 10^9$ UFC/mL, e o pH em 6,05, isso sem haver necessidade de correções de pH. Fonte: Autoria própria (2021).

AGRADECIMENTOS

Agradeço a empresa CELF pela parceria e viabilização do projeto, a Fundação Araucária pelo provimento da bolsa de iniciação científica PIBIT-FA, UTFPR pelo edital e possibilidade de realização de parcerias, projetos de interesse científico social e com inovações tecnológicas. Agradeço a Andressa, Lucas, Pedro e Julio pelo apoio de sempre.

REFERÊNCIAS

- BENETTI, Ricardo. **Utilização de rizobactérias promotoras de crescimento em plantas em co-inoculação e na parte aérea da soja (*Glycine max*)**. 2017. Monografia (Graduação em Agronomia) – Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, Ijuí, 2017. Disponível em: <https://bibliodigital.unijui.edu.br:8443/xmlui/handle/123456789/4542>. Acesso em: 01 de set. 2021.
- CAMPOS SILVA, J. R.; SOUZA, R. M.; ZACARONE, A. B.; SILVA, L. H. C. P.; CASTRO, A. M. S. BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS NO CONTROLE E INIBIÇÃO IN VITRO DE



Pseudomonas syringae pv. *tomato*, AGENTE DA PINTA BACTERIANA DO TOMATEIRO.

Ciência e Agrotecnologia, Lavras, v. 32, n. 4, p. 1062-1072, ago. 2008.

Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/250050370_Bacterias_endofiticas_no_controle_e_inibicao_in_vitro_de_Pseudomonas_syringae_pv_tomato_agente_da_pinta_bacteriana_do_tomateiro.

Acesso em: 25 de ago. de 2021.

CARVALHO, André Lacerda Ulysses de. **FISIOLOGIA DE *Bacillus subtilis* R14: SOB CONDIÇÕES RESTRITA E IRRESTRITA DE OXIGÊNIO: PRODUÇÃO DE**

COMPOSTOS IOATIVOS E ESPORULAÇÃO. 2005. Dissertação (Mestrado em

Biotecnologia). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2005. Disponível em:

<https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/1534>. Acesso em: 01 de set. 2021.

GOMES, E. A.; SILVA, U. C.; PAIVA, C. A. O; LANA, U. G. P; MARRIEL, I. E.; SANTOS,

V. L. **Microrganismos Promotores do Crescimento de Plantas**. ed. 21. Sete Lagoas: Embrapa

Milho e Sorgo, 2016. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1063799/microrganismos-promotores-do-crescimento-de-plantas>.

Acesso em: 27 de ago. de 2021.

MAZZUCHELLI, R. C. L; SOSSAI, B. F.; ARAUJO, F. F. INOCULAÇÃO DE *Bacillus*

subtilis E *Azospirillum brasilense* NA CULTURA DO MILHO. **Colloquium Agrariae**, 2014. v.

10, n. 2, p. 40-47. Disponível em: <https://revistas.unoeste.br/index.php/ca/article/view/1151>.

Acesso em: 02 de set. de 2021.

MONNERAT, R.; MONTALVÃO, S. C. L.; MARTINS, E. S.; QUEIROZ, P. R.; SILVA, E. Y.

Y. da; GARCIA, A. R. M.; CASTRO, M. T. de; ROCHA, G. T.; FERREIRA, A. D. C. de L.;

GOMES, A. C. M. M. **Manual de produção e controle de qualidade de produtos biológicos à**

base de bactérias do gênero *Bacillus* para uso na agricultura. 1. ed. Brasília: Embrapa

Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2020. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1122563/manual-de-producao-e-controle-de-qualidade-de-produtos-biologicos-a-base-de-bacterias-do-genero-bacillus-para-uso-na-agricultura>.

Acesso em: 27 de ago. de 2021.

OLIVEIRA, Fábio Henrique Portella Corrêa de.

FISIOLOGIA DE *Bacillus subtilis* R14: CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE LIPOPEPTÍDEOS EM CULTIVOS DESCONTÍNUOS. 2006. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) –

Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006. Disponível em:

<https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/1720>. Acesso em: 01 de set. 2021.

REZENDE, C. C.; SILVA, M. A.; FRASCA, L. L. de M.; FARIA, D. R.; FILIPPI, M. C. C.;

LANNA, A. C.; NASCENTE, A. S. Multifunctional microorganisms: use in agriculture.

Research, Society and Development, [S. l.], v. 10, n. 2, p. e50810212725, 2021. DOI:

10.33448/rsd-v10i2.12725. Disponível em:

<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/12725>.

Acesso em: 26 ago. 2021.