

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO RIO GRANDE DO SUL
UNIDADE UNIVERSITÁRIA EM CACHOEIRA DO SUL
CURSO DE BACHARELADO EM AGRONOMIA**

GABRIEL DE MELLO ZANOTTO

**VIABILIDADE DA PRODUÇÃO ON FARM DE *Bacillus subtilis* EM MEIOS
ALTERNATIVOS**

**CACHOEIRA DO SUL - RS
2023**

GABRIEL DE MELLO ZANOTTO

**VIABILIDADE DA PRODUÇÃO ON FARM DE *Bacillus subtilis* EM MEIOS
ALTERNATIVOS**

Monografia apresentada como requisição parcial para obtenção do título de Engenheiro Agrônomo na Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.

Orientador: Dr. Benjamin Dias Osorio Filho

CACHOEIRA DO SUL

2023

Catálogo de Publicação na Fonte

Z33v Zanutto, Gabriel de Mello.
Viabilidade da produção on farm de bacillus subtilis em meios alternativos / Gabriel de Mello Zanutto. – Cachoeira do Sul, 2023.
30 f.

Orientador: Prof. Benjamin Dias Osório Filho.

Monografia (Graduação) – Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Curso de Graduação em Agronomia, Cachoeira do Sul, 2023.

1. Bioinsumos. 2. Controle biológico. 3. Multiplicação. I. Osório Filho, Benjamin Dias. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada por Laís Nunes da Silva CRB10/2176.

GABRIEL DE MELLO ZANOTTO

**VIABILIDADE DA PRODUÇÃO ON FARM DE *Bacillus subtilis* EM MEIOS
ALTERNATIVOS**

Monografia apresentada como requisição
parcial para obtenção do título de Bacharel
em Agronomia na Universidade Estadual
do Rio Grande do Sul.

Orientador: Dr. Benjamin Dias Osorio Filho

Aprovado em: 14/12/2023

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Benjamin Dias Osorio Filho
Universidade Estadual do Rio Grande do Sul - UERGS

Profa. Dra. Andrea Miranda Teixeira
Universidade Estadual do Rio Grande do Sul - UERGS

Profa. Dra. Bruna Roos Costa
Universidade Estadual do Rio Grande do Sul - UERGS

Dedico este trabalho a minha família, em especial aos meu falecidos pais, José e Elona, que com todo amor sempre me apoiaram e quiseram que eu me formasse no ensino superior, onde eles não poderão estar se fazendo presente nesta última caminhada, mas que com toda certeza estão comigo no meio espiritual. Quero agradecer também aos meus tios que me ajudaram durante estes últimos anos. Muito obrigada.

RESUMO

A produção *on farm* refere-se ao cultivo desse microrganismo benéfico diretamente na própria propriedade. *Bacillus subtilis* é uma bactéria do solo conhecida por controle biológico de doenças vegetais e promoção de crescimento de plantas. O processo de produção *on farm* envolve a criação de condições ideais para o crescimento e multiplicação dessa bactéria benéfica, utilizando substratos e técnicas específicas. Os agricultores podem implementar sistemas de produção *on farm* por meio de técnicas como a multiplicação em pequena escala, o uso de substratos orgânicos e a aplicação direta na lavoura. Este trabalho teve como finalidade avaliar o crescimento de *B. subtilis* e a presença de contaminantes, em recipientes plásticos de 5 litros, com entrada forçada de ar, simulando uma produção *on farm* desta bactéria, com meios de crescimento alternativos. Para isso, foi realizado um experimento em laboratório, contendo três tratamentos, que consistiram em meios de crescimento alternativos e duas repetições. Os tratamentos foram (a) produto comercial à base de farinha de soja, (b) meio a base de leite integral e (c) meio a base de ovos de galinha. Foram realizadas coletas para avaliação do crescimento em diferentes tempos de incubação assim averiguou que houve a propagação da bactéria nas múltiplas situações, mas alguns tratamentos e horas de coleta tiveram maior êxito para a produção do *B. subtilis*. Teve-se duas repetições em cada tratamento, duas vezes com o produto “a”, duas vezes com o produto “b” e duas vezes utilizando o produto “c”. Houve a propagação da bactéria nas múltiplas situações, mas alguns tratamentos e as coletas das amostras realizadas em diferentes tempos de multiplicação após inoculação (12, 24 e 36h) tiveram maior êxito para a produção do *B. subtilis*.

Palavras-chave: Bioinsumos, controle biológico, multiplicação

ABSTRACT

On farm production refers to the cultivation of this beneficial microorganism directly on the property itself. *Bacillus subtilis* is a soil bacterium known for biological control of plant diseases and promotion of plant growth. The on farm production process involves creating ideal conditions for the growth and multiplication of this beneficial bacteria, using specific substrates and techniques. Farmers can implement on-farm production systems through techniques such as small-scale fermentation, the use of organic substrates and direct application to crops. This work aimed to evaluate the growth of *B. subtilis* and the presence of contaminants, in 5-liter plastic containers, with forced air entry, simulating on-farm production of this bacteria, with alternative growth media. For this, an experiment was carried out in the laboratory, containing three treatments, which consisted of alternative growth media and two replications. The treatments were (a) commercial product based on soybean meal, (b) medium based on whole milk and (c) medium based on chicken eggs. Collections were carried out to evaluate growth at different incubation times, thus determining that the bacteria spread in multiple situations, but some treatments and collection times were more successful for the production of *B. subtilis*. There were two repetitions in each treatment, twice with product "a", twice with product "b" and twice using product "c". The bacteria spread in multiple situations, but some treatments and sample collections carried out at different fermentation times after inoculation (12, 24 and 36h) were more successful in producing Bacillus.

Keywords: Bioinputs, biological control, multiplication

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - PROCESSO FERMENTATIVO E OXIDATIVO DE BACTÉRIAS.	16
FIGURA 2 (A E B) - FICHA NUTRICIONAL DO LEITE DE VACA E DO OVO DE GALINHA	21
FIGURA 3 - BIOFERMENTADORES E TUBULAÇÃO DE OXIGENAÇÃO.	21
FIGURA 4 (A E B) - ESTERILIZAÇÃO UTILIZANDO FOGO, E INOCULAÇÃO DOS FERMENTADORES.	22
FIGURA 5 – DILUIÇÃO EM TUBOS DE ENSAIO.	23
FIGURA 6 - MULTIPLICAÇÃO EM 36H DA INOCULAÇÃO COM MEIO A BASE DE OVO E NA 4º DILUIÇÃO.	24
FIGURA 7 (A E B) - MULTIPLICAÇÃO EM MEIO A BASE DE LEITE E NO MOMENTO DE 24H FIGURA "A", NA PRIMEIRA DILUIÇÃO E 36H FIGURA "B" NA QUINTA DILUIÇÃO.	25
FIGURA 8 - MULTIPLICAÇÃO COM MEIO COMERCIAL COM 36H E NA 3º DILUIÇÃO.	26
FIGURA 9 - CRESCIMENTO DE BACILLUS SUBTILIS EM TRÊS DIFERENTES MEIOS DE CULTURA DURANTE 36 HORAS DE INOCULAÇÃO.	27

LISTA DE TABELAS:

TABELA 1. NÚMERO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS (UFC) DE BACILLUS SUBTILIS EM FUNÇÃO DE DIFERENTES MEIOS DE CRESCIMENTO EM 36 HORAS DE INCUBAÇÃO.....	24
--	-----------

Sumário

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	13
2.1. OBJETIVO GERAL.....	13
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3. REFERENCIAL TEÓRICO	14
3.1. CARACTERÍSTICA DE <i>Bacillus subtilis</i>	14
3.2. MULTIPLICAÇÃO DE <i>Bacillus subtilis</i>	15
4. MATERIAL E MÉTODOS	20
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
6. CONCLUSÕES	28
REFERÊNCIAS	29

1. INTRODUÇÃO

Os métodos de fabricação *on farm* estão crescendo muito em todo o mundo e no Brasil não é diferente, produtores buscando técnicas, manejos e métodos de produção de insumos e cultivos para possibilitar a diminuição dos custos de suas produções para assim atingir a maior rendimento e consecutivamente lucratividade.

A produção *on farm* de *Bacillus subtilis* é uma estratégia promissora, alinhada aos princípios da sustentabilidade e eficiência agrícola. *B. subtilis*, uma bactéria reconhecida por suas propriedades benéficas, é muito utilizada para controle biológico de patógenos e, como promotora de crescimento vegetal. Neste sentido, pode-se alcançar, a autossuficiência agrícola, uma vez que os agricultores podem produzir *B. subtilis* diretamente em suas propriedades. Isso reduz a dependência de fornecedores externos e proporciona maior controle sobre o processo de produção, contribuindo para a sustentabilidade econômica da agricultura. Ao empregar resíduos agrícolas ou subprodutos da indústria alimentícia como meios de crescimento, a prática se traduz em uma significativa economia de recursos, uma vez que os agricultores podem aproveitar fontes locais e facilmente acessíveis, reduzindo a dependência de insumos externos.

Um dos principais riscos associados à produção *on farm* de *B. subtilis* é a possibilidade de contaminação com outras espécies microbianas. A presença de diversas variedades de *Bacillus* no ambiente agrícola pode levar à competição entre essas cepas, alterando a eficácia da bactéria benéfica desejada. Isso pode resultar em uma diminuição dos benefícios esperados para as plantas, comprometendo a eficácia do controle biológico e do estímulo ao crescimento vegetal.

Além disso, a produção *on farm* envolve desafios relacionados à manutenção de condições assépticas durante o processo de cultivo de *B. subtilis*. A contaminação do meio de cultivo ou dos equipamentos utilizados pode introduzir elementos indesejados, prejudicando a pureza da cultura e afetando a qualidade do produto final. Isso pode resultar em uma aplicação menos eficaz no campo e até mesmo em possíveis efeitos adversos sobre as plantas.

Para mitigar esses riscos, é imperativo adotar práticas de biossegurança e controle de qualidade durante todo o processo de produção. Isso envolve a implementação de medidas rigorosas de higiene, monitoramento constante da pureza da cultura, e testes regulares para verificar a eficácia do *B. subtilis* produzido. Portanto, a produção *on farm* de *B. subtilis* apresenta benefícios consideráveis para a agricultura, mas não está isenta de desafios, especialmente relacionados aos riscos de contaminação.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo avaliar o crescimento de *Bacillus subtilis* e a presença de contaminantes, em recipientes plásticos com entrada forçada de ar, simulando uma produção *on farm* desta bactéria, com meios de crescimento alternativos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar a presença de microrganismos contaminantes nos bioprodutos a base de *Bacillus subtilis* gerados a partir de produção *on farm*.
- Determinar a quantidade de unidades formadoras de colônias por volume de produto a base de *B. subtilis* gerados a partir de produção *on farm*.
- Avaliar a viabilidade da produção *on farm* de *B. subtilis* com meios alternativos.
- Comparação dos diferentes meios de multiplicação de bactéria.
- Análise dos 3 tempos (12, 24, 36h) de multiplicação de *B. subtilis*.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Característica de *Bacillus subtilis*

A utilização da bactéria *Bacillus subtilis* auxilia as plantas na retenção de nutrientes, via raízes e ajuda a planta a se proteger contra bactérias patogênicas. Pesquisas mostram que as cultivares de milho têm grande aumento na sua área da massa foliar.

Bacillus subtilis é uma bactéria móvel que forma esporos centrais com formato cilíndrico ou elipsoidal. As colônias podem ter diferentes colorações, variando do esbranquiçado ao preto, mas a mais comum é a branca, a depender do meio de cultura empregado. *B. subtilis* é encontrada principalmente no solo e na rizosfera, o que proporciona proteção contra vários agentes causadores de doenças em plantas. O grande interesse nessa espécie bacteriana consiste nos inúmeros metabólitos secundários que ela produz, podendo ser utilizada no âmbito agrícola e medicinal. Além disso, essa bactéria é capaz de produzir biofilmes que proporcionam uma colonização preventiva e benéfica para as raízes de inúmeras plantas, auxiliando no controle de nematoides, onde as plantas conseguem ser capazes de aumentar a sua área de coleta de nutrientes e ou melhorar a interação entre plantas e microrganismos benéficos que fixam nitrogênio no solo, melhorando assim o crescimento vegetativo. Utiliza-se *B. subtilis* comercialmente para o biocontrole de enfermidades de plantas, assim como para aumentar a produtividade de algumas culturas (NGUGIA et al., 2005; YAO et al., 2006).

Segundo Manjula e Podile (2005), a promoção de crescimento ocasionada por *B. subtilis* é consequência do aumento da fixação de nitrogênio, solubilização de nutrientes, síntese de fitormônios e melhoria das condições do solo. Também atribuiu benefícios indiretos pela supressão deste ambiente contra microrganismos maléficos. A associação benéfica proporciona o aumento fisiológico de metabólitos que desencadeiam a sensibilidade do sistema radicular às condições externas, proporcionando a facilitação da percepção e absorção de nutrientes. Isolados de *B. subtilis* também têm a capacidade de conduzir a regulação hormonal de plantas,

proporcionando assim, o controle do crescimento radicular pela síntese de auxina, giberelina e citocinina (TSAVKELOVA et al. 2006).

Os estudos têm mostrado o uso de *B. subtilis* como agente de biocontrole e, ou, promotor de crescimento em plantas. A capacidade de ocupar eficientemente nichos distintos e apresentar uma notória versatilidade fisiológica, faz bactéria ímpar para estudos futuros. Atualmente os bioprodutos a base de *B. subtilis* mostram-se efetivos na redução de enfermidades no campo, além de menos agressivos ao meio ambiente (LANNA FILHO, ROBERTO; FERRO, HENRIQUE MONTEIRO et al. 2010).

3.2. Multiplicação de *Bacillus subtilis*

Os microrganismos necessitam de uma variedade de substâncias nutritivas capazes de promover o seu crescimento, estes nutrientes serão a base do seu crescimento e da energia para a multiplicação, podendo assim, gerar várias colônias.

Os microrganismos necessitam de fontes de energia, fontes de carbono, fontes de nitrogênio, sais minerais, água, fatores de crescimento (vitaminas e outras substâncias). Estas substâncias são fornecidas a partir de fontes orgânicas e/ou inorgânicas. segundo: Nascimento, José Soares. Introdução à Microbiologia, (2010)

Os fatores físicos necessários ao crescimento microbiano incluem luz, temperatura, aeração, pH etc. Os microrganismos são classificados em diferentes categorias conforme estes fatores.

Os meios de cultivo para o gênero Bacilos possuem uma fonte de nitrogênio, outra de carbono e as vezes sais minerais. Algumas vezes se adicionam ao meio alguns tampões e antiespumantes a fim de facilitar o processo. A fonte de carbono, além de fornecer matéria prima para muitos compostos celulares, serve como fonte de energia. O nitrogênio é requerido principalmente para síntese de proteínas e ácidos nucléicos.

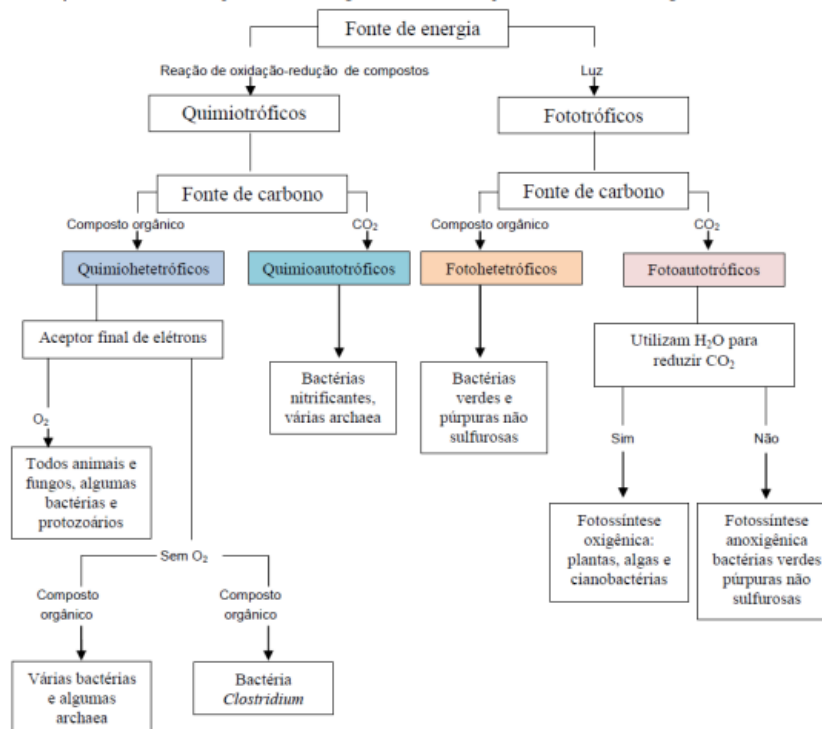
Para suprir esta necessidade nutricional foi utilizado açúcar cristal como fonte de carbono e de energia e farinha de soja como fonte de proteína.

A utilização como meio energético foi os carboidratos cristalizados (açúcar), conforme a indicação já que a escolha da matéria-prima para o meio de cultura merece atenção especial, já que compreende cerca de 30 a 40% do custo total da produção, onde a escolha deve proporcionar alta produção com menor custo possível (MONTIEL et al., 2001).

Nesta figura abaixo temos um esquema de consumo de energia e decarbono em dois métodos de propagação de béc., a linha deste trabalho será a primeira demonstrado nesta mesma figura, onde os processos de oxidação e multiplicação acontecerão sobre o meio utilizado para gerar fonte nutricional para a propagação e multiplicação da béc.

Figura 1 - Processo fermentativo e oxidativo de bactérias.

Esquema 1: Classificação dos microrganismos em relação às fontes de energia e de carbono.



Fonte: NASCIMENTO, J.S. (2012)

No parágrafo a seguir, apresenta-se uma descrição sobre a batelada dos meios de cultura utilizados no projeto e como as bactérias alvos se comportam durante a multiplicação, atentando ao cuidado da elaboração e dos nutrientes utilizados.

A fermentação em batelada consiste na disponibilização inicial de um meio de cultura para que o microrganismo aumente em número de forma exponencial até que se esgotem os nutrientes e o substrato torna-se limitante ao crescimento. Durante o processo, pode-se acrescentar algum nutriente específico ou o meio de cultivo completo, ao que se denomina de batelada alimentada. Ambas as formas de fermentação são conduzidas em biorreatores ou fermentadores que, além de permitir o cultivo da estirpe do microrganismo selecionado, possibilitam o controle da espuma, pH, temperatura, agitação e saturação de oxigênio (SOARES, 2006).

A quantidade de oxigênio dissolvido no meio de cultura é dependente de diversos fatores como osmolaridade do meio, taxa de aeração e agitação (COUCH, 2000), mas que pesquisas mais recentes retratam que o oxigênio dissolvido no meio e no ambiente de fermentação não é tão necessário.

Em bioprocessos aeróbicos o transporte de oxigênio é o mais importante processo de transferência de massa gás-líquido a ser considerado no projeto de bioprocessos, podendo afetar o crescimento celular e a formação do produto. Segundo (Picão, 2010).

O processo de multiplicação bacteriana sempre se inicia em laboratório com a produção do pré-inóculo, a partir de uma estirpe comprovadamente pura, geralmente em recipientes do tipo Kitazato ou Erlenmeyer, que é transferido para o pré-fermentador, cujo volume útil varia de 2 a 10% do volume do cultivo final. A principal finalidade do pré-inóculo no processo fermentativo é reduzir o período de adaptação do microrganismo ao meio de cultivo adotado, diminuindo o tempo total de fermentação (COUCH, 2000). No processo de isolamento da bactéria, esta passa por um processo de aquecimento em banho maria a 80°Celsius, para poder eliminar outras bactérias invasoras da solução assim servindo como insumo (BETTIOL, W.,1995).

Em relação ao oxigênio dissolvido, este não deve chegar a valores inferiores a 20% devendo ser mantido em torno de 40%, isso porque à medida em que se avança com o processo fermentativo, as bactérias exigirão mais oxigênio e o seu fornecimento deve ser progressivo atendendo às exigências de cada microrganismo. Iniciado o processo de multiplicação, este deverá ser conduzido até a total esporulação da bactéria o mais próximo de 100% possível. Com o exaurimento das fontes nutritivas do meio de cultura o microrganismo entra em uma fase estacionária

onde não justifica continuar o processo. Nesse ponto chega-se ao término da Multiplicação.¹

Conforme dados utilizados internacionalmente e adotado por muitos laboratórios nacionais, todos equipamentos, insumos e pessoas responsáveis devem ter um percentual mínimo de higiene dentro dos laboratórios, para assim ter o menor índice de contaminação do experimento ou à saúde dos envolvidos.

Em um laboratório de microbiologia as condições de higiene e limpeza devem ser rigorosas, para evitar possíveis fontes de contaminações, que constituam um risco em potencial para todos os envolvidos no trabalho e manuseio. Todo e qualquer trabalho a ser desenvolvido dentro de um laboratório apresenta riscos físico, químico, mecânico e biológico, que podem resultar em danos materiais ou acidentes pessoais. O laboratório de microbiologia é, com frequência, um ambiente singular de trabalho que pode expor as pessoas próximas a ele, ou que nele trabalham, a riscos de doenças infecciosas identificáveis. (FEITOSA, LARISSA et. al., 2014, pág. 3).

O meio de cultura é um insumo de grande importância no processo fermentativo, pois, caso não tenha boa qualidade poderá comprometer a qualidade do produto ou até mesmo inviabilizar todo o processo produtivo. Este deve fornecer todos os nutrientes necessários para multiplicação do microrganismo de interesse, assim como, dar suporte para que este produza com qualidade o seu produto final (metabólitos, cristais proteicos, esporos etc.). O próximo passo consiste em esterilizar o biorreator, de preferência por autoclavagem, ou de acordo com o método recomendado pelo fabricante do biorreator. Finalizada a esterilização, caso tenha sido realizada por autoclavagem, o biorreator deverá ser resfriado até que se alcance a temperatura de trabalho de 30 ± 2 ° C. As soluções de ácido, base e antiespumante deverão ser conectadas ao biorreator a fim de que estejam disponíveis para serem utilizadas quando requeridas durante o processo.

A escolha dos componentes do meio de cultura é estratégica para uma produção economicamente viável do bioinseticida e não deve ultrapassar 30% do custo total de produção. Monnerat, (2018).

¹ Rose Monnerat... [et al.]. 2020.

O meio de cultura é um insumo de grande importância no processo fermentativo, pois, caso não tenha boa qualidade poderá comprometer a qualidade do produto ou até mesmo inviabilizar todo o processo produtivo (item 4.2). Este deve fornecer todos os nutrientes necessários para multiplicação do microrganismo de interesse, assim como, dar suporte para que este produza com qualidade o seu produto final (metabólitos, cristais proteicos, esporos etc.). (Monnerat, 2020).

Com um meio de cultura de qualidade em mãos, este deve ser colocado no biorreator e diluído de acordo com as instruções do fabricante do meio de cultura. Durante o processo fermentativo é necessário a retirada de amostras para se avaliar a qualidade da fermentação. Essa amostragem deve ser realizada através do registro de amostras, normalmente localizada ao lado do vaso do biorreator ou uma pipeta e colocada em placa de petri.

O controle de qualidade dos fermentados é uma etapa fundamental do processo de produção da bactéria, seja em laboratórios, biofábricas “*on farm*” ou nas empresas de grande porte. O controle de qualidade visa avaliar as características do bioinseticida e alguns bioinsumos, sob diferentes aspectos, de forma a garantir a sua qualidade, segurança e eficácia (YOUSTEN, 1984; ALVES; MORAES, 1998; OECD, 2013).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Para realização deste estudo, foi montado um experimento no laboratório de ensino da UERGS em Cachoeira do Sul. Foram utilizados três tratamentos e duas repetições. Cada unidade experimental consistiu em recipientes plásticos de 5 litros reutilizados, e desinfetados com Hipoclorito de Sódio e álcool etílico 90% (figura 1). Em cada unidade experimental utilizou-se um aerador de aquário (Air Pump Aquarim® modelo AP-3500). Os tratamentos foram: (a) produto comercial à base de farinha de soja, (b) meio a base de leite integral e (c) meio a base de ovos de galinha. As dosagens de cada tratamento seguiram como base a receita inicial do produto comercial (Multibacter) e destes tratamentos foram realizadas coletas de avaliação para analisar o crescimento em diferentes tempos de incubação e com os diferentes tratamentos.

Conforme dados tabelados da MULTIBACTER a recomendação para a multiplicação de bactéria com o insumo comercial a base de farinha de soja, e calculado para uma menor escala, já que o experimento foi realizado na proporção de 6 litros de meio por tratamento. Teve-se então as quantidades de cada tratamento calculado seguindo a tabela nutricional de cada meio, para que ambos estejam uniformes e que a quantidade do meio não altere a multiplicação da bactéria.

A produção dos meios de cultura utilizados nos fermentadores foram todos realizados no laboratório da UERGS, os equipamentos utilizados para a elaboração deste foram todos autoclavados incluindo os próprios meios. O meio comercial foi a base de farinha de soja. Para elaboração deste meio, foram utilizados 90 gramas de açúcar cristal (recomendação do vendedor) como fonte de energia para as bactérias, 60 gramas de farinha de soja e água destilada até completar 6 litros de meio. O meio a base de leite integral foi elaborado, utilizando-se 3 litros de leite e 3 litros de água destilada. Para elaboração do meio a base de ovos de galinha foram utilizados 13 ovos e 86,1 grama de açúcar cristal homogêneo em liquidificador. Após foi acrescentado mais água destilada até atingir a quantidade de 6 litros.

Figura 2 (A e B) - Ficha nutricional do leite de vaca e do ovo de galinha

INFORMAÇÃO NUTRICIONAL		
Porção de 200ml (1 copo)		
Quantidade por porção		%VD*
Valor Energético	78Kcal = 328kJ	4%
Carboidratos	9,0g	3%
Proteínas	6,0g	8%
Gorduras Totais	2,0g	4%
Gorduras Saturadas	1,2g	5%
Gorduras <i>Trans</i>	0g	(**)
Fibra Alimentar	0g	0%
Sódio	150mg	5%
Cálcio	210mg	21%

(*) % Valores Diários de referência com base em uma dieta de 2.000 Kcal ou 8.400 kJ. Seus valores podem ser maiores ou menores dependendo de suas necessidades energéticas. (**) Valor diário não estabelecido

Informação Nutricional		
Porção 50g (1 unidade)		
Quantidade por porção		%VD*
VALOR ENERGÉTICO	74kcal = 311kJ	4%
CARBOIDRATOS	0,6g	0%
PROTEÍNAS	6,3g	8%
GORDURAS TOTAIS	5g	9%
GORDURAS TRANS	1,6g	7%
GORDURAS SATURADAS	0g	-
FIBRA ALIMENTAR	0g	0%
SÓDIO	63mg	3%

* % Valores Diários de referência com base em uma dieta de 2000 kcal ou 8400 kJ. Seus valores diários podem ser maiores ou menores dependendo de suas necessidades energéticas. ** VD estabelecido.

Acervo do autor.

Como meios fermentativos o Leite de vaca e o ovo de galinha pode não ser tão baratos como a farinha de soja, mas pela facilidade de acesso das fazendas do meio rural pode ser considerado como um meio diferente de produção. Muitas fazendas possuem vacas de leite e/ou galinhas que produzem ovos, então a facilidade/vantagem de acesso a esta matéria pode ser uma opção mais viável, já que nem todos os agricultores produzem soja.

Figura 3 - Biofermentadores e tubulação de oxigenação.



Acervo do autor.

Após a limpeza dos recipientes, foi limpo o material de oxigenação do meio de propagação. Feita toda a limpeza, foi realizada a coleta e pesagem do material que foi utilizado. O inóculo utilizado nas seis unidades experimentais foi uma alíquota de

9 ml do produto comercial Bio-imune® por unidade (figura 2 (A e B)). Segundo o rótulo do produto, a concentração mínima é de 3×10^9 UFC/mL de *B. subtilis*. O frasco do produto foi aberto em câmara de fluxo laminar, e a inoculação se deu com pipetas de vidro graduadas previamente esterilizadas em autoclave.

Figura 4 (A e B) - Esterilização utilizando fogo, e inoculação dos fermentadores.



Acervo do Autor.

A incubação do inóculo nas unidades experimentais teve duração de 72 horas. Após 12, 24 e 36 horas de incubação foi coletado 1 ml de cada meio de crescimento. De cada amostragem foram realizadas diluições seriadas, a partir das quais se deu o plaqueamento. Para a diluição (figura 3), utilizou-se uma série de 10 tubos de ensaio, contendo 10 ml de água destilada e esterilizada, cada um. Na sequência, o primeiro tubo recebeu 1 ml do meio de crescimento, sendo agitado em vórtex, do qual era retirada uma alíquota de 1 ml para a realização da diluição seguinte. Além disso, de cada tubo da série, se retirou 1 ml da diluição para plaqueamento. As placas de petri utilizadas foram previamente preparadas com meio Luria Betani (LB) para contagem de UFC e avaliação de ocorrência de contaminates. Utilizou-se pipetas autoclavadas e, a alíquota de meio foi distribuída na placa com auxílio de alça de Drigalski.

Após o plaqueamento, as placas foram incubadas a 28°C em câmara de crescimento microbiológico por 12 horas. Após esse período, foram contadas as unidades formadoras de colônia (UFC), quando possível, e avaliada a presença de contaminação.

Figura 5 – Diluição em tubos de ensaio.



Acervo do autor.

Depois das 3 coletas e realizada as placas de aferição das colônias onde todas as coletas passaram por incubação a 28°C e por 12 horas na câmara. Após esse período, foram contadas as unidades formadoras de colônia (UFC), e contabilizadas em tabelas com descrição de: número de colônias, se teve infecção, qual amostra, de qual tratamento e o tempo de fermentação até a coleta, posteriormente foi avaliado que não houve a presença de contaminação em nenhuma placa.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na coleta realizada após as primeiras 12 horas de incubação, observou-se crescimento de colônias bacterianas superior a 3×10^8 UFC/ml em todos os meios de testados (tabela 1). Transcorridas as 24 horas de incubação, o crescimento bacteriano aumentou no tratamento com o meio comercial.

Tabela 1. Número de unidades formadoras de colônias (UFC) de *Bacillus subtilis* em função de diferentes meios de crescimento em 36 horas de incubação.

Tratamentos	Tempo de incubação (horas)			
	0	12	24	36
	----- UFC ml ⁻¹ -----			
Meio comercial	0	3×10^8	4×10^{11}	4×10^{09}
Meio à base de leite	0	2×10^{12}	2×10^{12}	4×10^{08}
Meio à base de ovos	0	1×10^{13}	5×10^{12}	1×10^{13}

Os meios alternativos, a base de leite e ovos proporcionaram maior multiplicação de *Bacillus subtilis* em relação ao meio comercial utilizado (figura 7).

O meio a base de ovo proporcionou crescimento excessivo nas placas, comparando com as placas do meio comercial, mesmo nas maiores diluições conforme visto na (tabela 1) e na (figura 4), este grande aumento da multiplicação ocorrida no meio com ovo provou que este meio trás grande vantagem na produção de bactérias e que trouxe grande vantagem sobre os outros tratamentos, como visto neta figura a baixo onde o meio estava no período de 36 h após a inoculação e na 4° diluição e apresentou uma massa grande de colônias bacterianas que nem foi possível contabilizar.

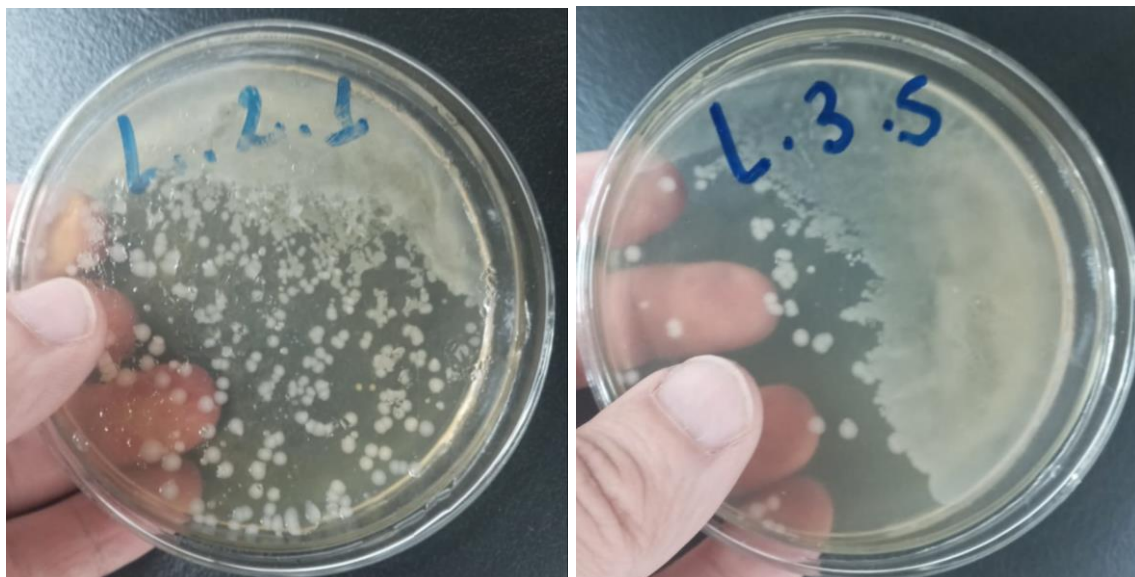
Figura 6 - Multiplicação em 36h da inoculação com meio a base de ovo e na 4° diluição.



Acervo do autor.

O teste mostrou que o maior crescimento de *Bacillus*, no meio à base de leite ocorre entre as 12 e 24 horas de incubação, onde que neste período ainda se tem o controle da bactéria no meio e que acima deste período a um crescimento excessivo, onde na (figura 5 (A)) podemos notar a grande quantidade de colônias e o começo da união delas pela falta de espaço na placa petri, já na (figura 5 (B)) se tem a produção em excesso da bactéria pelo fato de já ter passado 36h da inoculação, e que na 5° diluição ainda se tem uma vasta quantidade de colônias unidas;

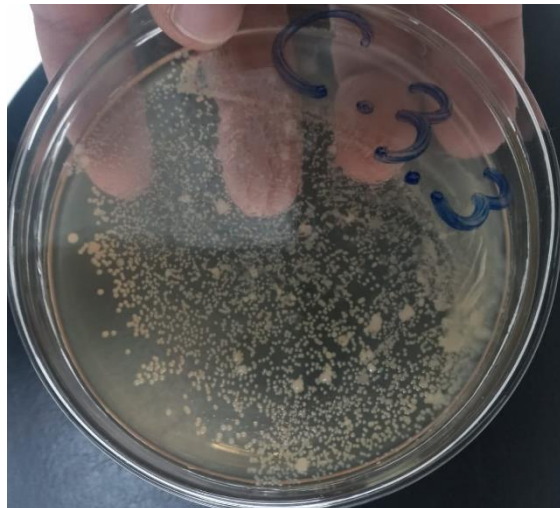
Figura 7 (A e B) - Multiplicação em meio a base de leite e no momento de 24h figura "A", na primeira diluição e 36h figura "B" na quinta diluição.



Acervo do autor.

O teste realizado com um protótipo de biofábrica não apresentou problemas de contaminação levando em conta apenas o visual das placas, teve grande crescimento de bactérias com coloração brancas e de formato arredondadas, como não foi realizado mais testes a nível de grau bacteriológicos, se concluiu que não houve contaminação. Tendo uma grande multiplicação de *B. subtilis* nos diferentes tratamentos, na (figura 6) temos como exemplo a grande formação de colônias de bactérias utilizando o meio comercial, no período de 36h e na 3ª diluição, mostrando que o experimento foi um sucesso, já que não houve a contaminação de nenhuma placa petri ou de nenhum biorreator.

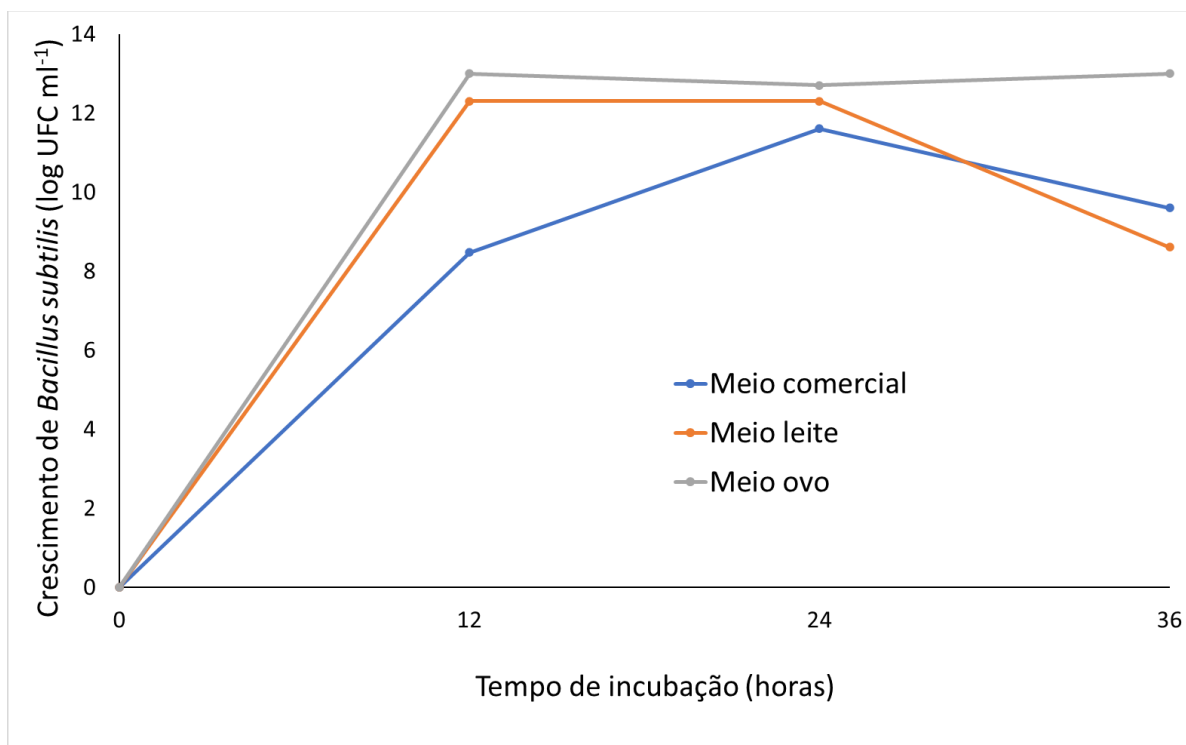
Figura 8 - Multiplicação com meio comercial com 36h e na 3ª diluição.



Acervo do Autor.

A figura acima teve uma grande quantidade de bactérias formadoras de colônias, onde cada pontinho consiste em uma colônia e nestes pontos maiores temos a associação de mais de uma colônia.

Figura 9 - Crescimento de *Bacillus subtilis* em três diferentes meios de cultura durante 36 horas de inoculação.



Na figura 7, observa-se o crescimento da bactéria com os três diferentes meios de multiplicação durante o período de 36 horas de inoculação do produto “Bio Imune”. Neste gráfico temos o meio comercial em azul, com um crescimento relevante até 24h, em laranja tem o crescimento utilizado com meio de leite que mostrou resultados mais significativos de 12 à 24h após a inoculação, sendo os valores encontrados melhores que os do meio comercial. A produção com meio a base de ovos mostrou o melhor resultado, tendo a maior concentração de bactérias desde 12h, 24h e 36h, onde as colônias foram maiores e possibilitou um crescimento bem mais uniforme superiores durante as diluições.

Assim os resultados da produção on farm com meios alternativos teve um grande sucesso e mostrou que não há apenas um método de multiplicação viável e que traz resultados significativos para a produção de bactérias do gênero *Bacillus subtilis* spp.

6. CONCLUSÕES

- Os meios alternativos, a base de leite e ovos proporcionaram maior multiplicação de *Bacillus subtilis* em relação ao meio comercial utilizado.
- O meio a base de ovo proporcionou crescimento excessivo nas placas, mesmo nas maiores diluições;
- O período de maior crescimento de *B. subtilis* no meio à base de leite ocorre entre as 12 e 24 horas de incubação;
- O protótipo de biofábrica utilizado não apresentou problemas de contaminação ao ser utilizado para multiplicação de *B. subtilis*;
- Apontou que a produção on farm com meio a base de ovo de galinha e leite de vaca é viável para a multiplicação de bactérias;

REFERÊNCIAS

ALVES, S. B.; MORAES, S. A. Quantificação de inoculo de patógenos de insetos. In: ALVES, S. B. Controle microbiano de insetos. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 765-777. (Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz de Queiroz, 4).

BETTIOL, W. Isolamento seletivo de *Bacillus*. In: MELO, I.S. & SANHUEZA, R.M.V., coords. Métodos de seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos. Jaguariúna, Embrapa-CNPMA, 1995. p.35-36. (Manual Técnico).

COUCH, T. L. Industrial fermentation and formulation of entomopathogenic bacteria. In: CHARLES, J. F. (Org.). Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field applications. New York: Kluwer Academic Publishers, p. 297-316, 2000.

FEITOSA, LARISSA FARIAS; FREITAS, WILMA C DE; BARBOSA, POLYANA; Manual de Segurança do Laboratório de Microbiologia, João Pessoa (PB), Versão N 01/2014 – Revisão em 05/11/2014.

LANNA FILHO, R.; FERRO, H. M.; DE PINHO, R. S. C. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas, v. 4, n. 2, p. 12–20, 2010.

MANJULA, K.; PODILE, A.R. Increase in seedling emergence and dry weight of pigeon pea in the field with chitin-supplemented formulations of *Bacillus subtilis* AF 1. World Journal of Microbiology & Biotechnology, v.21, p.1057–1062, 2005.

MONTIEL, M. I. T.; TYAGI, R. D.; VALERO, J. R. Wastewater treatment sludge as a raw material for the production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. Water Research, New York, v. 35, p. 3807-3816, 2001.

NGUGIA, H.K.; DEDEJB, S.; DELAPLANEB, K.S.; SAVELLEA, A.T.; SCHERMA, H. Effect of flower-applied Serenade biofungicide (*Bacillus subtilis*) on pollination-related variables in rabbiteye blueberry. *Biological Control*, v.33, p.32-38, 2005.

OECD. Test 122: Determination of pH, acidity and alkalinity. OECD Guidelines for the testing of chemicals, Section 1. Paris-Fr: OECD Publishing, 2013. 6 p.

PICÃO, B. W. Estudo da velocidade de agitação na produção de Riboflavina por *Bacillus subtilis* em biorreator mecanicamente agitado e aerado. 2021. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2021. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/213514>. Acesso em 22 Abr. 2022.

ROSE MONNERAT... [ET AL.]. Produção e controle de qualidade de produtos biológicos à base de *Bacillus thuringiensis* para uso na agricultura, EMBRAPA, ISSN 0102-0110, 10/2018.

ROSE MONNERAT... [ET AL.]. Produção e controle de qualidade de produtos biológicos à base de bactérias do gênero *Bacillus* para uso na agricultura – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2020. 46 p. - (Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 369).

SOARES, C. M. S. Produção, formulação e aplicação de bactérias. In: OLIVEIRA-FILHO, E. C.; MONNERAT, R. G. (Eds.) Fundamentos para a regulação de semioquímicos, inimigos naturais e agentes microbiológicos de controle de pragas. Brasília-DF: Embrapa Cerrados, 2006. p. 219-238.

TSAVKELOVA, E.A.; KLIMOVA, S. Y.; CHERDYNTSEVA, T. A.; NETRUSOV, A. I. Microbial Producers of Plant Growth Stimulators and Their Practical Use: A Review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, v.42, p.117–126, 2006.

YOUSTEN, A. A. *Bacillus sphaericus*: Microbiological factors related to its potential as a mosquito larvicide. *Advances in Biotechnology Processes*, v. 3, p.315-343, 1984.