

13º Congresso de Inovação, Ciência e Tecnologia do IFSP - 2022

Avaliação de meios de cultura alternativos para a obtenção de bioinsumos a base de *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus subtilis* para uso na agricultura

J. C. D. VIDOTTO¹, E. L. CORREIA², M. P. BAGAGLI³

¹ Graduando em Engenharia de Biossistemas, Estagiário RAIAR Orgânicos, jessica.vidotto@aluno.ifsp.edu.br

² Graduando em Engenharia de Biossistemas, Voluntário PIVICT, IFSP, Campus Avaré, eduarda.correia@aluno.ifsp.edu.br

³ Docente do Curso de Engenharia de Biossistemas, IFSP, Campus Avaré, marcela.bagagli@ifsp.edu.br

Área de conhecimento (Tabela CNPq): 2.12.02.02-8 Microbiologia industrial e fermentação

RESUMO: As bactérias do gênero *Bacillus* são muito aplicadas como bioinsumos agrícolas, sendo que o *Bacillus thuringiensis* (Bt) é a bactéria mais utilizada no controle de pragas e o *Bacillus subtilis* (Bs) como bioestimulante. Os meios de cultura são responsáveis por grande parte dos custos da produção de bioinsumos utilizando esses microrganismos, dessa forma, este trabalho objetivou a elaboração de meios de cultura alternativos para a fermentação submersa de ambos. Foram avaliados através da esporulação das bactérias Bt e Bs, dois meios de cultura, um composto por melaço e farelo de soja (MS) e outro por amido, farelo de soja e sacarose (AS). Ao fim dos experimentos concluiu-se que ambos os meios foram efetivos para o crescimento de Bt e Bs, visto que apresentam contagem de esporos superior a 10^6 UFC/mL e não apresentaram contaminação por bactérias Gram negativas, sendo opções para a multiplicação dos microrganismos *on farm* por utilizarem insumos de baixo custo e fácil acesso.

PALAVRAS-CHAVE: biopesticida; bioestimulante; fermentação submersa; *Bacillus thuringiensis*; *Bacillus subtilis*.

Evaluation of alternative culture media to obtain bio-inputs based on *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus subtilis* for use in agriculture

ABSTRACT: Bacteria of the genus *Bacillus* are widely applied as agricultural bio-inputs, with *Bacillus thuringiensis* (Bt) being the most used bacteria in pest control and *Bacillus subtilis* (Bs) as a biostimulant. The culture media are responsible for a large part of the costs in the production of bio-inputs using these microorganisms, thus, this work aimed to develop alternative culture media for the submerged fermentation of both. Two culture media were evaluated through the sporulation of Bt and Bs bacteria, one composed of molasses and soybean meal (MS) and another composed of starch, soybean meal and sucrose (AS). At the end of the experiments it was concluded that both media were effective for the growth of Bt and Bs, since they present spore counts higher than 10^6 CFU/mL and showed no contamination by Gram negative bacteria, being options for the multiplication of microorganisms on farm because they use low cost inputs and easy access.

KEYWORDS: biopesticide; biostimulant; submerged fermentation; *Bacillus thuringiensis*; *Bacillus subtilis*.

INTRODUÇÃO

Os bioinsumos são processos ou produtos agroindustriais de origem animal, vegetal ou microbiana, destinados a promoção de crescimento e controle biológico em atividades agropecuárias. Com a criação do Programa Nacional de Bioinsumos, em 2020, houve um estímulo à sua utilização, uma vez que além de proporcionar menor impacto ambiental e menores custos, oferecem uma

alternativa a aplicação de produtos sintéticos. (EMBRAPA, 2022; SANTOS *et al.*, 2020; BRASIL, 2020).

As bactérias do gênero *Bacillus* podem atuar como biopesticidas e bioestimulantes. O *Bacillus thuringiensis* (Bt) é a bactéria com grande aplicação no controle biológico de pragas agrícolas, sendo que produzem inclusões proteicas cristalinas que são tóxicas aos seus insetos-alvo (ordens Coleoptera, Diptera, Hymenoptera e Lepidoptera) e sendo inócuos aos mamíferos, vertebrados e plantas, além de não apresentar efeito poluente ao ambiente (BRAVO *et al.*, 2005; FONTES, VALADARES-INGLIS, 2020; MONNERAT *et al.*, 2020). O *Bacillus subtilis* (Bs) é uma rizobactéria, apresentando diversos mecanismos de ação no controle de fitopatologias, atuando no aumento na absorção de nutrientes, indução de resistência das plantas, antibiose, aumento da resistência ao estresse, promoção de crescimento radicular, biocontrolador de nematoides, sendo um dos bioestimulantes mais aplicados na agricultura (MONNERAT *et al.*, 2020; BETTIOL *et al.*, 2012).

Considerando que no cultivo de bactérias os meios de cultura correspondem a 30% dos custos dos processos fermentativos (STUMBURY *et al.*, 0995), este estudo avaliou dois meios de cultura alternativos para cultivo de Bt e Bs, o primeiro meio composto por melaço e farelo de soja (MS) e o segundo por amido, farelo de soja e sacarose (AS).

MATERIAL E MÉTODOS

As cepas de *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus subtilis* utilizadas foram isolada de produtos comercializados pela empresa de biosinsumos AGRINOR fertilizantes e mantidas no banco de microrganismos do laboratório de microbiologia do Instituto Federal de São Paulo, campus Avaré, sendo conservadas em *slants* de ágar nutriente recobertos por vaselina líquida sob refrigeração (5°C).

O meio de cultura MS foi composto por 40 g/L de melaço, 30 g/L de farelo de soja e 1 g/L de fosfato de potássio monobásico. O meio de cultura AS, foi composto por 20 g/L de amido de milho, 30 g/L de farelo de soja, 10 g/L de sacarose P.A. e 1 g/L de fosfato de potássio monobásico. Ambos os meios de cultura foram esterilizados a 121°C por 15 minutos.

Paralelamente, os pré-inóculos foram preparados, sendo realizados os cultivos de Bt e Bs em placas de Petri contendo meio sólido a base de ágar nutriente proposto pela Embrapa (MONNERAT *et al.*, 2020), e as placas foram incubadas por 48h a 28°C.

Os experimentos foram realizados em triplicatas e foram montados em 4 ensaios. No Ensaio 1, 50mL de meio de cultura MS foram inoculados com 3 alçadas de Bt retiradas do pré-inóculo. No ensaio 2, 50mL de meio de cultura MS foram inoculados com 3 alçadas de Bs retiradas do pré-inóculo. No ensaio 3, 50mL de meio de cultura AS foram inoculados com 3 alçadas de Bt retiradas do pré-inóculo. No ensaio 4, 50mL de meio de cultura AS foram inoculados com 3 alçadas de Bs retiradas do pré-inóculo. Os ensaios foram incubados em agitador orbital a 28°C e 200 rpm durante 72 horas, sendo amostrados nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas.

As amostras foram avaliadas quanto ao pH, utilizando papel indicador de pH; ao índice de refração, utilizando um refratômetro portátil; contagem de esporos, utilizando a contagem de unidades formadoras de colônias e, foram observadas no microscópio óptico lâminas com coloração Gram e coloração de esporos (AMMONS; RAMPERSAD, 2002). A contagem de esporos foi realizada de acordo com o proposto por Monnerat *et al.* (2020), com modificações, sendo que uma alíquota de 1,5 mL da amostra, sem diluição, foi transferida para um tubo *ependorff* e submetido à choque térmico em banho termostático a 80°C por 12 minutos seguido de banho de gelo por 5 minutos, a fim de eliminar células vegetativas e manter apenas os esporos. Em seguida, foram feitas diluições decimais seriadas da amostra, em tubos contendo água destilada estéril. Foram semeados 100µL da diluição desejada em 2 placas de Petri contendo meio EMBRAPA sólido. As placas foram mantidas em estufa a 28°C por 48h e então foram contadas as unidades formadoras de colônias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A variação de pH e índice de refração observados para o meio MS e AS estão dispostos na Figura 1. O resultados indicam que o pH dos ensaios com Bs se mantiveram estáveis ao longo das fermentações, enquanto que nos ensaios com Bt houve oscilação entre 4,0 e 5,0 para o meio MS e elevação para 7,0 no meio AS. Em relação ao índice de refração (IR), nos ensaios com Bt não houve variação significativa do índice para os dois meios avaliados enquanto que para nos ensaios com Bs

houve gradativo declínio ao longo das 72 horas de fermentação, indicando que houve consumo de açúcares presentes no meio de cultivo e, conseqüentemente, houve atividade microbiana no meio.

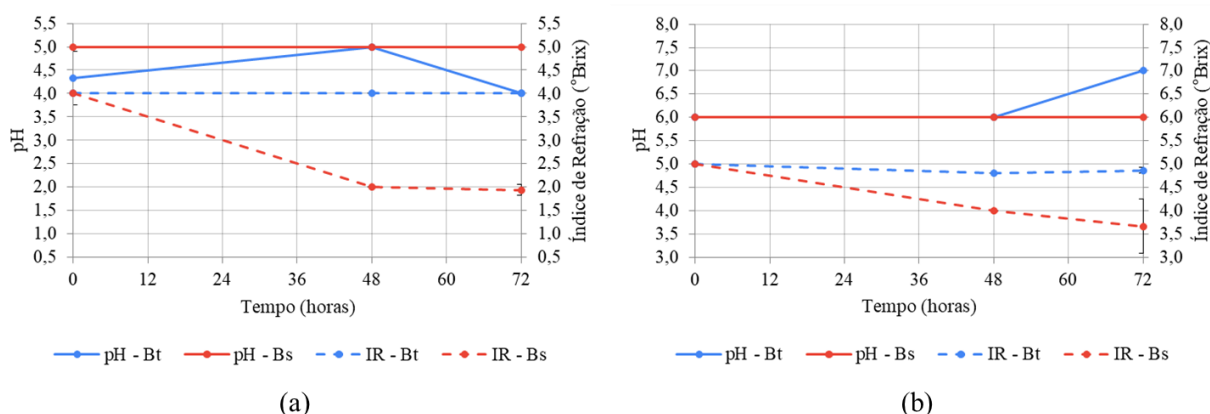


FIGURA 1. Média dos valores de pH e índice de refração ao longo das fermentações para o *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus subtilis*, incubados nos meios (a) MS e (b) AS.

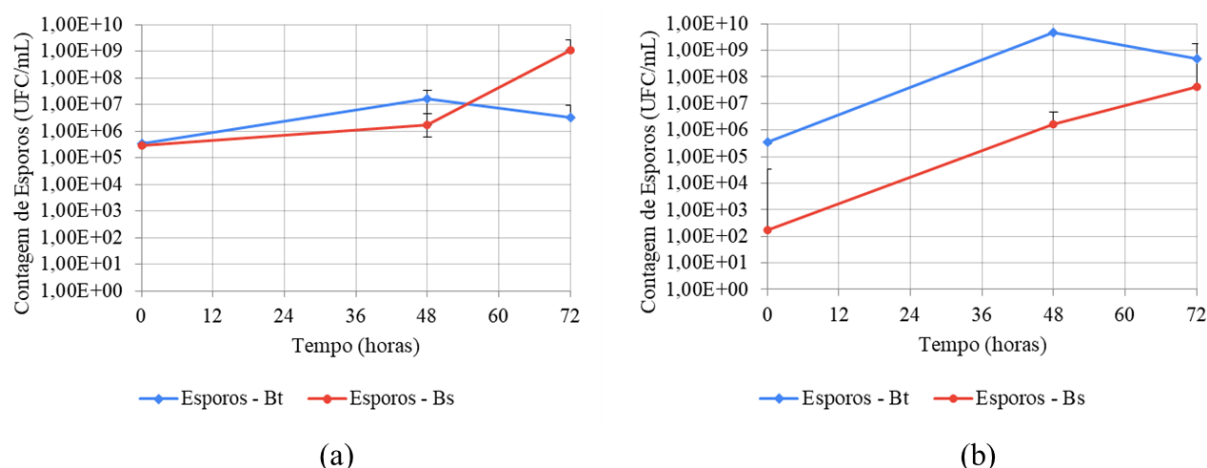


FIGURA 2. Média das contagens de esporos ao longo das fermentações para o *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus subtilis*, incubados nos meios (a) MS e (b) AS.

As contagens de esporos médias obtidas ao fim dos ensaios com meio MS para o *B. thuringiensis* e *B. subtilis* foram, respectivamente, de $3,33 \times 10^6$ e $1,08 \times 10^9$ UFC/mL. Os resultados para ambos os *Bacillus* apresentaram aumento significativo da população desses microrganismos os quais foram capazes de esporular. No entanto, é notável também, que o Bs apresentou maior adaptação e proliferação no meio do que o Bt, podendo esta diferença ser justificada pelo falta de ajuste do pH inicial do meio, sendo indicado o valor de 7,0 para o cultivo do microrganismo Embrapa (MONNERAT *et al.*, 2020).

As contagens de esporos médias observadas durante os ensaios com meio AS para o *B. thuringiensis* e *B. subtilis* foram, respectivamente, de $4,8 \times 10^8$ e $4,3 \times 10^7$ UFC/mL. Os resultados apresentaram aumento significativo da população desses microrganismo os quais foram capazes de esporular durante o ensaio. O resultado obtido para o Bt foi superior ao obtido para o Bs neste meio de cultivo, indicando que ele foi mais adequado para a proliferação e esporulação deste microrganismo em comparação com o meio MS.

As Figuras 3 e 4 disponibilizam imagens de microscopia óptica do Bt e Bs utilizando colorações de Gram e de esporos após 72 horas de cultivo em meio MS e AS, respectivamente. É possível notar pelas lâminas de coloração de Gram que não houve contaminação por bactérias Gram negativas, sendo observadas células típicas de Bt e Bs. Na lâmina com coloração de esporos, utilizando corante azul de coomassie, foi possível visualizar células esporuladas, esporos e corpos de inclusão cristalinos.

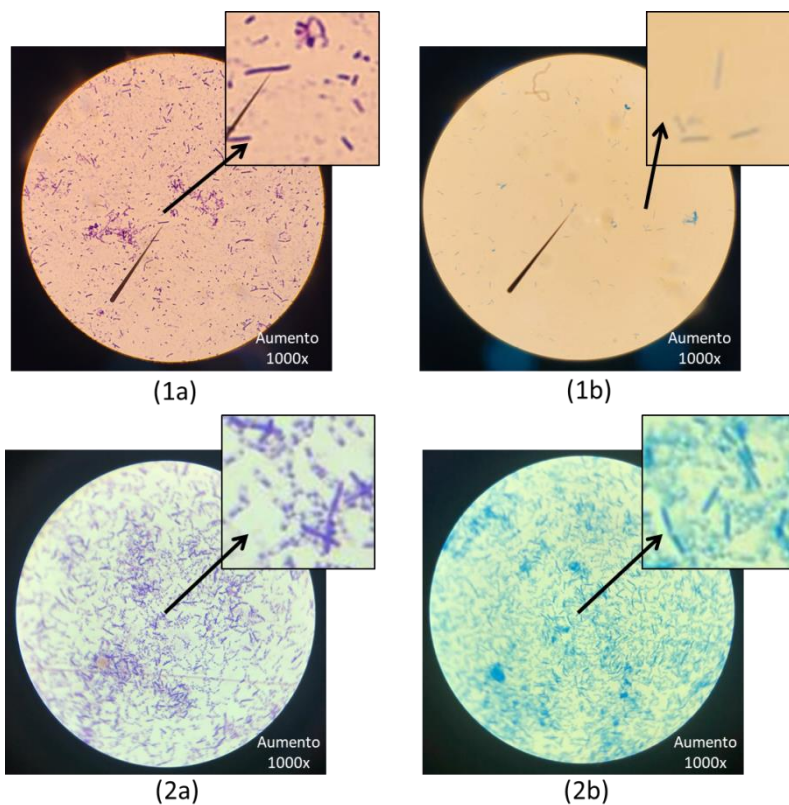


FIGURA 3. Lâminas observadas em microscópio óptico com aumento de 1000x, após 72h de inoculação de Bt em meio (1) MS e (2) AS, com coloração de (a) Gram e (b) Esporos.

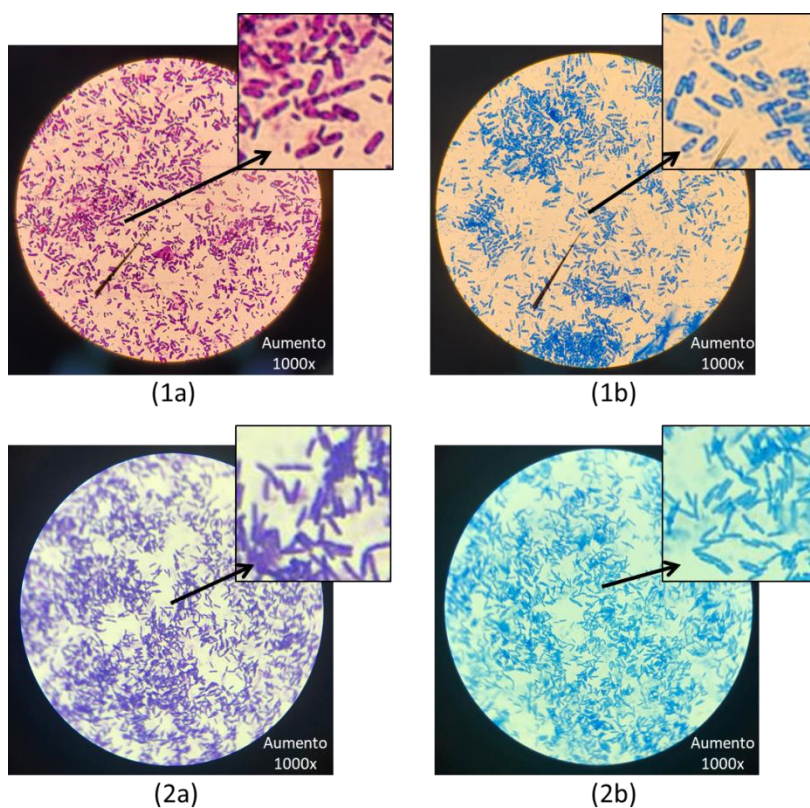


FIGURA 4. Lâminas observadas em microscópio óptico com aumento de 1000x, após 72h de inoculação de Bs em meio (1) MS e (2) AS, com coloração de (a) Gram e (b) Esporos.

CONCLUSÕES

Conclui-se que os dois meios avaliados (MS e AS) foram efetivos para o crescimento de Bt e Bs, visto que apresentaram contagens de esporos, após 72h de cultivo, superior a 10^6 UFC/mL, sendo viáveis para a utilização na obtenção de bioinsumos. Salienta-se também que no meio MS o Bs apresentou maior crescimento e no meio AS o Bt se mostrou mais adaptado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo, campus Avaré, pelo apoio estrutural e à RAIAR orgânicos pela parceria e apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B.; PINTO, Z. V.; PAULA JR, T. J.; CORREA, E. B.; MOURA, A. B.; LUCON, C. M. M.; COSTA, J. C. B.; BEZERRA, J. L. Produtos Comerciais à Base de Agentes de Biocontrole de Doenças de Plantas. **Embrapa Meio Ambiente**, Jaguariúna/SP, 155p, 2012.

BRASIL. Decreto nº 10.375, de 26 de maio de 2020. Institui o Programa Nacional de Bioinsumos e o Conselho Estratégico do Programa Nacional de Bioinsumos. **Diário Oficial da União**, ed. 100, seção 1, p. 105, 2020.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERON, M. *Bacillus thuringiensis* mechanisms and use. In: GILBERT, L. I.; IATROU, K.; GILL, S. S. (Ed.). **Comprehensive molecular insect science**. New York: Elsevier, v. 6, p. 175-206, 2005.

FONTES, E. M. G.; VALADARES-INGLIS, M. C. Controle de Pragas na Agricultura. **Embrapa**, ed.1, 510p, 2020. ISBN 978-65-86056-01-3.

MONNERAT, R.; MONTALVÃO, S.; QUEIROZ, E. M.; QUEIROZ, P. M.; SILVA, E. Y. Y.; GARCIA, A.; CASTRO, M.; ROCHA, G. T.; FERREIRA, A. D. C.; 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. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, Brasília/DF, 2020.

Portfólio: Insumos Biológicos. **Embrapa**, Brasília/DF, 2022. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/portfolio/insumos-biologicos>>. Acesso em: 04 de setembro de 2022.

Produção de microrganismos para uso próprio na agricultura (on-farm): Esclarecimentos Oficiais. **Portal Embrapa**, Brasília/DF, 2021.

SANTOS, A. F. J.; DINNAS, S. S. E.; FEITOZA, A. F. A. Qualidade microbiológica de bioprodutos comerciais multiplicados on farm no vale do São Francisco: dados preliminares. Universidade do Estado da Bahia – UNEB. **Enciclopédia biosfera**, Jandaia/GO, v.17, n.34, p. 429, 2020.

STUMBURY, P.F., WHITAKER, A., HALL, S.J. **Principles of fermentation technology**. 2ª. Edição, Butterworth Heinemann, Oxford, 1995.