

15º Congresso de Inovação, Ciência e Tecnologia do IFSP - 2024

FERMENTAÇÃO DE FARINHA DE LARVAS DE MOSCA SOLDADO NEGRO (*Hermetia illucens*) E DO RESÍDUO DE SUA CRIAÇÃO PARA OBTENÇÃO DE BIOINSUMO À BASE DE *Bacillus thuringiensis*

HUANY DE OLIVEIRA RIBEIRO¹, MARCELA PAVAN BAGAGLI²

¹ Graduando em Engenharia de Biossistemas, Bolsista PIBIFSP, IFSP, Campus Avaré, huany.o@aluno.ifsp.edu.br.

² Docente do curso de Engenharia de Biossistemas, Campus Avaré, marcela.bagagli@ifsp.edu.br.

Área de conhecimento (Tabela CNPq): 5.01.02.04-4 Microbiologia Agrícola.

Resumo: As larvas de BSF são nutricionalmente ricas, e seu resíduo possui quantidade significativa de nitrogênio, podendo constituir um bom meio de cultivo para o desenvolvimento de microrganismos e estímulo à produção de enzimas. Desta forma, o seguinte trabalho avaliou a capacidade de *Bacillus thuringiensis* se desenvolver em meio de cultivo em estado sólido, utilizando como substrato arroz, farinha integral de larvas de mosca soldado negro (*Hermetia illucens*) e frass (resíduo gerado pelo inseto), sendo avaliada a produção de esporos e de proteases, dois parâmetros importantes para produtos de controle biológico de pragas-alvo na agricultura à base deste microrganismo. A máxima esporulação foi observada após 96 h de fermentação para todos os meios, sendo que em frass a contagem média de esporos foi de $1,3 \times 10^9$ UFC/mL. Em relação à atividade proteolítica, o pico ocorreu em 48 h de fermentação, sendo que não houve diferença significativa entre os meios arroz e frass, sendo a atividade média de 105 ± 7 U/g de substrato seco.

PALAVRAS-CHAVE: Fermentação em estado sólido; resíduos de insetos; atividade proteolítica.

FERMENTATION OF BLACK SOLDIER FLY LARVAE (*Hermetia illucens*) FLOUR AND ITS RESIDUE FOR OBTAINING A *Bacillus thuringiensis*-BASED BIOINPUT

Abstract: BSF larvae are nutritionally rich, and their residue contains a significant amount of nitrogen, which can provide a good growth medium for the development of microorganisms and stimulation of enzyme production. Thus, this study evaluated the ability of *Bacillus thuringiensis* to develop in a solid-state culture medium, using rice, whole black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) flour, and frass (the insect's residue) as substrates, with the evaluation of spore and protease production, two important parameters for biological pest control products in agriculture based on this microorganism. Maximum sporulation was observed after 96 hours of fermentation for all media, with an average spore count of 1.3×10^9 CFU/mL in frass. Regarding proteolytic activity, the peak occurred at 48 hours of fermentation, with no significant difference between the rice and frass media, with an average activity of 105 ± 7 U/g of dry substrate.

KEYWORDS: Solid-state fermentation; insect residues; proteolytic activity.

INTRODUÇÃO

A inserção de insetos na alimentação humana e animal é uma alternativa que contribui para a segurança alimentar e sustentabilidade, sendo fonte de proteínas (FAO, 2015). As larvas de mosca soldado negro (*Hermetia illucens*), ou BSF, podem converter resíduos orgânicos em proteínas e lipídios, além de exúvias e frass (dejetos e ração residual), ricos em nitrogênio, fósforo e potássio, que podem ser utilizados na obtenção de bioinsumos para agricultura (Surendra *et al.*, 2020; Ravi *et al.*, 2020; Basri *et al.*, 2022, Gebiola *et al.*, 2023).

O *Bacillus thuringiensis* (Bt), uma bactéria esporulada, Gram-positiva, amplamente utilizada no controle biológico de insetos-praga, é produtor de enzimas quitinolíticas, proteolíticas e de cristais proteicos com atividade entomocida (Berbert-Molina *et al.* 2008; Fontes; Valadares-Inglis, 2020; Martínez-zavala *et al.*, 2020). A produção de bioinsumos a base de *B. thuringiensis* é realizada majoritariamente em cultivo submerso, porém a fermentação em estado sólido (FES) pode ser uma possibilidade, sendo reportado o aumento da taxa de esporulação para Bt em comparação com a fermentação submersa (Lima-Pérez *et al.*, 2019; Monnerat *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2020).

Desta forma, este trabalho objetivou cultivar Bt em arroz, frass e farinha de BSF, em estado sólido, a fim de se obter produto com elevada contagem de esporos e atividade proteolítica.

MATERIAL E MÉTODOS

O frass e larvas de BSF foram doados pela empresa AGRIN - Criação e Comércio de Insetos. Para o preparo da farinha de inseto, as larvas foram secas em estufa de circulação forçada de ar, a 60 °C e triturados em moinho multiuso. Para padronização da granulometria do frass foi utilizado o material que passou pela peneira com abertura de 600 µm. Os dois materiais foram armazenados em sacos plásticos a -18 °C até o momento de uso.

A capacidade de retenção de água do frass e da farinha integral foram avaliadas pesando, respectivamente, 2 g e 3 g do material em tubos tipo Falcon de 15 ml com pequenos furos na parte cônica, e estes foram acoplados sobre provetas de 25 mL. Em seguida, foi adicionado 10 mL de água destilada aos materiais e foi coletado o líquido nas provetas por 2 h (adaptado de Müller, 1964). A capacidade de retenção (CR) foi dada pela equação 1.

$$CR = \frac{\text{Água retida (ml)} \times 100\%}{\text{massa de material (g)}} \quad \text{Eq.[1]}$$

Para a produção de inóculos de Bt, placas de Petri contendo ágar Embrapa sólido (Monnerat *et al.*, 2020) foram recobertas com o microrganismo, para obtenção de crescimento confluyente. As placas foram incubadas a 28 °C por 48 h.

A farinha de inseto integral e o frass foram umedecidos com água destilada de acordo com o cálculo de CR de cada material e pesados 18 g em Erlenmeyer de 250 mL. Para o ensaio realizado com o arroz, foi utilizado arroz tipo 1 e água destilada na proporção de 1:1 (m:m). Os frascos foram autoclavados a 121°C por 15 min. Cada frasco Erlenmeyer foi inoculado com 3 cilindros de 0,6 cm de diâmetro recortados das placas do inóculo, sendo na sequência, incubados por 0 h, 48 h, 96 h e 144 h, a 28 °C.

Após o período de incubação foi realizada a extração do extrato fermentado bruto (EFB), adicionando 50 mL de solução salina (0,85% de NaCl, m:v) com 0,05% de polisorbato 80 (m:v) aos meios de cultivo e submetidos à agitação a 200 rpm por 40 min a 28 °C. Os EFBs foram armazenados à -18 °C até o momento da análise.

A contagem de esporos foi realizada de acordo com o proposto por Monnerat *et al.* (2020), com modificações. Sendo 1,0 mL da amostra, sem diluição, transferida para um tubo Eppendorf e submetido à choque térmico em banho maria a 80 °C por 12 min seguido de banho de gelo por 5 min. Em seguida, feitas diluições decimais seriadas da amostra, em tubos contendo solução salina estéril com 0,05% de polisorbato 80. Foram semeados 100 µL da diluição desejada em 3 placas de Petri contendo meio Embrapa sólido (0,1% extrato de levedura, 0,1% KH₂PO₄, 2% ágar nutritivo, 10mL/L de solução de sais composta por 1%CaCO₃, 1% MgSO₄.7H₂O, 0,1% FeSO₄.7H₂O, MnSO₄.7H₂O, 0,1% ZnSO₄.7H₂O). As placas foram mantidas em estufa a 28 °C por 24 h e então contadas as unidades formadoras de colônias, sendo o resultado expresso por volume de extrato (UFC/mL). O cálculo da quantidade de unidades formadoras de colônia por mL de amostra foi calculado pela equação 2.

$$\text{Esporos} \left(\frac{\text{UFC}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{número médio de colônias nas placas} \times \text{fator de diluição}}{\text{volume de amostras semeadas (ml)}} \text{ Eq.[2]}$$

A atividade de protease foi determinada utilizando como substrato da reação enzimática a azocaseína, de acordo com Charney e Tomarelli (1947), com modificações. A mistura reacional contendo 0,5 mL de azocaseína (Sigma) 0,5% (m:v), pH 7,0, e 0,5 mL de solução enzimática foram incubadas por 40 min a 50 °C, sendo preparado um branco composto por 0,5 mL de água destilada e 0,5 mL de azocaseína. A reação foi paralisada com a adição de 0,5 mL de TCA 10% (m:v) e o Eppendorfs foram centrifugados a 10.000 rpm por 15 min, 25 °C. Uma alíquota de 1,0 mL do sobrenadante foi neutralizado com 1,0 mL de KOH 5M. Foi feito um controle para cada amostra, de forma que a mistura reacional foi previamente paralisada com a adição de 0,5 mL de TCA 10% (m:v). A análise foi realizada em triplicata. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para aumentar a absorbância a 428 nm de 0,01 nas condições experimentais.

As análises estatísticas foram realizadas através da ANOVA de um fator, com auxílio do software R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) versão 4.1.0, sendo realizadas comparação de médias pelo teste Tukey com 95% de confiança.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A capacidade de retenção de água do frass foi de $226,5 \pm 23,1\%$ e da farinha integral de BSF de $44,4 \pm 15,4\%$.

Em relação ao desenvolvimento do *Bacillus thuringiensis* nos substratos avaliados, observou-se que o frass foi o que conduziu à maior contagem de esporos, seguido do arroz, conforme observado na Figura 1. Para todos os substratos, observou-se o pico de produção de esporos em 96 h de fermentação, sendo que o frass apresentou resultado 3 vezes superior ao obtido no arroz tipo 1 e 49 vezes superior à farinha de BSF integral. A contagem de esporo por volume de extrato atingiu a ordem de grandeza de 10^9 UFC, sendo um valor expressivo (Brasil, 2019).

O baixo desenvolvimento do *B. thuringiensis* no meio composto de farinha integral de BSF pode estar relacionado ao alto teor de gordura presente nas larvas, o qual pode chegar até 35% da massa seca e apresenta em sua composição ácidos graxos com propriedades antimicrobianas (Diomandé et al., 2015).

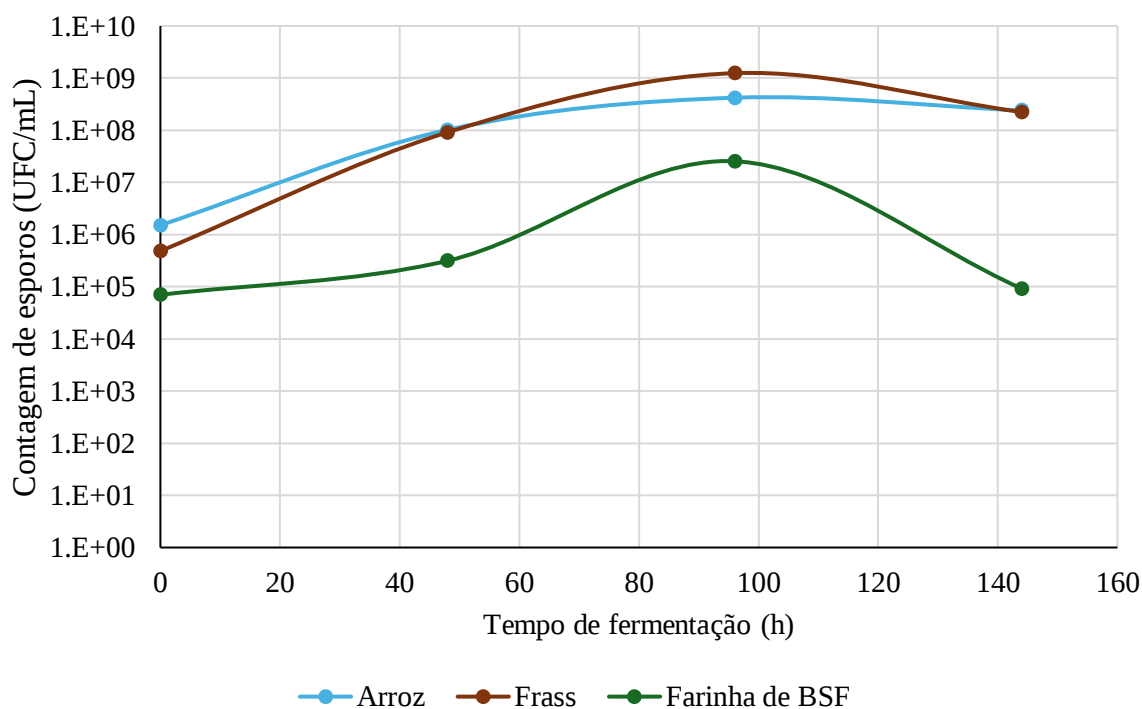


FIGURA 1. Contagem de esporos de *B. thuringiensis* ao longo do tempo de fermentação nos substratos arroz, frass e farinha integral de BSF.

Os resultados da atividade proteolítica dos EFB de arroz, frass e farinha integral de BSF podem ser observados na Figura 2.

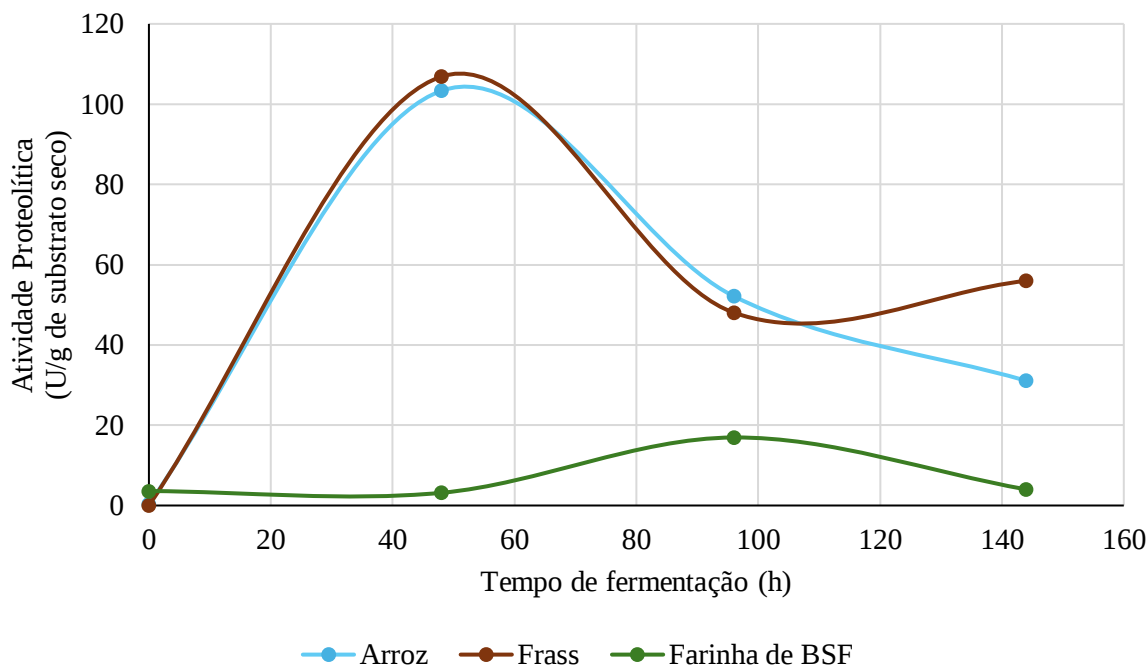


FIGURA 2. Atividade proteolítica dos extratos fermentados brutos de *B. thuringiensis* ao longo do tempo de fermentação nos substratos arroz, frass e farinha integral de BSF.

Observou-se que o pico da atividade proteolítica ocorreu após 48 h de fermentação. Os maiores valores foram encontrados para os EFB produzido em arroz e em frass, não havendo diferenças significativas entre as amostras, com 95% de confiança. A atividade proteolítica média de 105 ± 7 U/g substrato seco é um valor relevante, estando próxima ao observado na literatura para outros fermentados de insetos (Machado *et al.*, 2022; Maciel, 2023). Para a farinha integral de BSF, o pico de atividade enzimática ocorreu após 96 h de fermentação e o valor obtido ($16,9 \pm 3,4$ U/g substrato seco) foi significativamente inferior aos demais.

CONCLUSÕES

O *B. thuringiensis* foi capaz de se desenvolver em meio de cultivo composto por frass de BSF e em meio composto por arroz tipo 1. A farinha integral do inseto não se mostrou um bom substrato para a fermentação, possivelmente pelo elevado teor de gordura, o qual pode limitar o crescimento do Bt. Os valores de protease obtidos foram consideráveis, novamente não havendo diferenças significativas entre as fermentações conduzidas em arroz e em frass, indicando que esse resíduo da criação de insetos pode ser um substituto ao arroz, um substrato tradicional da fermentação em estado sólido, porém de maior custo.

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

Huany de Oliveira Ribeiro procedeu com a metodologia e experimentos. Todos os autores contribuíram com a redação e revisão do trabalho e aprovaram a versão submetida.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao IFSP pelo apoio financeiro e infraestrutura e à empresa AGRIN pela doação do frass e larvas de BSF.

REFERÊNCIAS

- BASRI, N.E.A.; AZMAN, N.A.; AHMAD, I.K.; SUJA, F.; JALIL, N.A.A.; AMRUL, N.F. Potential applications of frass derived from black soldier fly larvae treatment of food waste: a review. **Foods**, v. 11, n. 2664, 2022.
- BERBERT-MOLINA, M. A.; PRATA, A. M. R.; PESSANHA, L. G.; SILVEIRA, M. M. Kinetics of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis growth on high glucose concentrations. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p.1397–1404, 2008.
- Brasil. Instrução Normativa SDA nº 36, de 13 de dezembro de 2019. Dispõe sobre a especificação de referência para produtos fitossanitários com uso aprovado na agricultura orgânica. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 17 de dezembro de 2019.
- CHARNEY, J.; TOMARELLI, R. M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **Journal Biological Chemistry**, v. 170, p. 501-505, 1947.
- DIOMANDÉ, S.E.; MGUYEN-THE, C.; GUINEBRETIERE, M.; BROUSSOLLE, V.; BRILLARD, J. Role of fatty acids in *Bacillus* environmental adaptation. **Frontiers in microbiology**, v.6, 2015.
- FAO, 2015. A contribuição dos insetos para a segurança alimentar, subsistência e meio ambiente.
- FONTES, E.M.G.; VALADARES-INGLIS, M.C. **Controle biológico de pragas da agricultura**. Brasília, DF: Embrapa, 2020. 510p.
- GEBIOLA, M.; RODRIGUES, M. V.; GARCIA, A.; ANDREA, G.; TOMBERLIN, J.K.; HOPKINS, F.M.; MAUCK, K.E. Bokashi fermentation of brewery's spent grains positively affects larval performance of the black soldier fly *Hermetia illucens* while reducing gaseous nitrogen losses. **Waste Management**, v. 171, p. 411-420, 2023.
- LIMA-PÉREZ, J.; López-Pérez, M.; Viniegra-González, Gustavo; Loera, O. Solid-state fermentation of *Bacillus thuringiensis* var kurstaki HD-73 maintains higher biomass and spore yields as compared to submerged fermentation using the same media. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 42, p. 1527-1535, 2019.
- MACHADO, J.; PORFÍRIO, J.C.; KOIKE, M.A.; BAGAGLI M.P. **Antioxidant activity of *Gryllus assimilis* meal hydrolysed by *Aspergillus oryzae* proteases**. Journal of Insects as Food and Feed, 2022.
- MACIEL, G. L. **Fermentação de material quitinoso residual da criação de larvas de BSF (*Hermetia illucens*) para obtenção de enzimas quitinolíticas e proteolíticas**. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia de Biosistemas) – Instituto Federal de São Paulo, Avaré, São Paulo, 2023.
- MARTÍNEZ-ZAVALA, S.; BARBOZA-PÉREZ, U.E.; HERNÁNDEZ-GUZMÁN, G.; BIDESHI, D.K.; BARBOZA-CORONA, J.E. Chitinase of *Bacillus thuringiensis*: phylogeny, modular structure, and applied potentials. **Frontiers in microbiology**, v. 10, n. 3032, 2020.
- 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.

MÜLLER, L. E. **Manual de laboratorio de fisiología vegetal**. Turrialba: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), 1964. 165 p.

RAVI H.K., DEGROU A., COSTIL J., TRESPEUCH C., CHEMAT F., VIAN M.A. Larvae Mediated Valorization of Industrial, Agriculture and Food Wastes: Biorefinery Concept through Bioconversion, Processes, Procedures, and Products. **Processes**, v.8, n.7, p. 857, 2020.

SANTOS, A.; Dinnas, S.; Feitoza, A. Qualidade microbiológica de bioprodutos comerciais multiplicados on farm no vale do são francisco: dados preliminares. **Enciclopédia Biosfera** v. 17, n. 34, p.429, 2020.

SURENDRA, K.C.; TOMBERLIN, J.K.; VAN HUIS, A.; CAMMACK, J.A.; HECKMANN, L.H.L.; KHANAL, S.K. Rethinking organic wastes bioconversion: evaluation the potential of the black soldier fly (*Hermetia illucens* (L.) (Diptera: Stratiomyidae)(BSF). **Waste management**, v. 117, p. 58-80, 2020.