

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

ESTUDO DE RECIPIENTES PARA MULTIPLICAÇÃO DE MICRORGANISMOS *on farm* PARA PEQUENOS PRODUTORES

IRIS DE LIMA¹, MARCELA PAVAN BAGAGLI²

¹ Graduando em Engenharia de Biossistemas, Bolsista PIBIFSP, IFSP, Campus Avaré, lima.iris@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: Este trabalho avaliou a viabilidade de quatro tipos de recipientes para serem utilizados como reatores na multiplicação por fermentação em estado sólido (FES) de microrganismos *on farm* com foco em pequenos produtores rurais. Os reatores avaliados foram garrafas PET, sacos de polietileno (PE), sacos de polipropileno (PP) e barricas de polipropileno de alta densidade (PEAD). Os microrganismos *Beauveria bassiana* e *Bacillus thuringiensis*, dois dos principais microrganismos utilizados na agricultura, foram utilizados como modelo. Para cada tipo de recipiente, foram propostos métodos de esterilização do meio de cultivo e dos recipientes, respeitando suas características, bem como proporcionar ambiente favorável para a inoculação, de forma simples. Os dois microrganismos apresentaram desenvolvimento satisfatório nos reatores, apresentando contagens entre 10^8 e 10^9 UFC/mL do extrato, não havendo diferenças significativas entre eles com 95% de confiança. Não foram detectados contaminantes patogênicos (coliformes termotolerantes e *Salmonella* spp.) em nenhum dos reatores, indicando que os métodos propostos são uma opção para pequenos produtores rurais.

PALAVRAS-CHAVE: Bioinsumos; *Beauveria bassiana*; *Bacillus thuringiensis*; fermentação em estado sólido

Study of Containers for On-Farm Production of Bioinputs for Small and Medium Farmers

ABSTRACT: This study evaluated the feasibility of four types of containers to be used as reactors for the solid-state fermentation (SSF) of microorganisms on-farm, targeting small-scale farmers. The reactors assessed were PET bottles, polyethylene (PE) bags, polypropylene (PP) bags, and high-density polyethylene (HDPE) barrels. The microorganisms *Beauveria bassiana* and *Bacillus thuringiensis*, two of the main microorganisms used in agriculture, were employed as models. For each type of container, sterilization methods for the culture medium and containers were proposed, considering their specific characteristics and providing a favorable environment for inoculation in a simple manner. Both microorganisms showed satisfactory growth in the reactors, with counts ranging between 10^8 and 10^9 CFU/mL of the extract, with no significant differences observed among them at a 95% confidence level. No pathogenic contaminants (thermotolerant coliforms and *Salmonella* spp.) were detected in any of the reactors, indicating that the proposed methods are a viable option for small-scale farmers.

KEYWORDS: Bioinputs; *Beauveria bassiana*; *Bacillus thuringiensis*; solid-state fermentation

INTRODUÇÃO

Os bioinsumos são definidos no decreto do MAPA nº 10.375 de 2020 como todo produto, processo ou tecnologia de origem vegetal, animal ou microbiana com a finalidade de gerar uma resposta positiva na produção, armazenamento e/ou no beneficiamento de produtos agropecuários, sendo assim, podem ser bioestimulantes ou fitoprotetores.

A produção de bioinsumos para uso próprio nas propriedades agrícolas, denominada de *on farm* (Embrapa, 2020), apresenta uma forma de tornar acessível o emprego desses produtos para pequenos e médios produtores rurais com custo reduzido, já que não há necessidade de transporte e armazenamento dos produtos (Monnerat *et al.* 2020). No entanto, para que os bioinsumos *on farm* apresentem eficiência e segurança à saúde, é preciso que o processo produtivo seja controlado e siga boas práticas de fabricação, evitando a presença de contaminantes, especialmente patógenos (Valicente, 2018; Santos *et al.*, 2020; Matos; Silva, 2023; Lana *et al.*, 2022). O acesso de pequenos produtores, como produtores familiares, à produção dos bioinsumos *on farm* ainda é restrito (Moreira, 2023).

Assim, este trabalho avaliou o uso de diferentes recipientes como reatores para a multiplicação de microrganismos, os quais podem ser aplicados na obtenção *on farm* de bioinsumos de baixo custo, utilizando a fermentação em estado sólido (FES) com arroz como substrato. O fungo entomopatogênico e endofítico *Beauveria bassiana* e a bactéria *Bacillus thuringiensis* foram utilizados como microrganismos modelo, uma vez que estão entre os microrganismos amplamente utilizados como bioinsumos a base microrganismos (Kumar *et al.*, 2021).

MATERIAL E MÉTODOS

Recipientes, substrato e inóculo para a FES

Foram utilizados quatro tipos de recipientes como reatores para a FES: garrafas PET de 2 L com tampa, sacos de polietileno (PE), sacos de polipropileno (PP) com filtro 0,2 µm e barricas de 5 L de polietileno de alta densidade (PEAD). O substrato utilizado foi arroz parboilizado, adquirido em comércio local.

O fungo *Beauveria bassiana* e a bactéria *Bacillus thuringiensis* foram adquiridos comercialmente da empresa AGRINOR, em formulações para aplicação no controle de pragas ou propagação *on farm*, sendo o produto comercial purificado, utilizando ágar Batata Dextrose (PDA) ou ágar nutriente (NA), respectivamente, e os microrganismos conservados a 5°C e repicados a cada 6 meses.

Fermentações

Cada recipiente foi preparado seguindo protocolo específico para garantir a ausência de contaminantes antes da inoculação dos microrganismos modelo, conforme descrito a seguir.

As garrafas PET de 2 L foram preparadas de acordo com Ferreira *et al.* (2019) com modificações. Assim, foram higienizadas com solução de hipoclorito de sódio a 200 ppm por 15 minutos. Após a higienização, aproximadamente 100 mL de água quente (acima de 60°C) foi colocada na garrafa, a qual foi agitada por 2 minutos. Em seguida, a água foi descartada, e 300 g arroz previamente cozido (1 parte de água para 2 de arroz) em panela elétrica foi inserido na garrafa. A garrafa foi tampada com uma tampa furada, previamente higienizada, e vedada com fita Micropore.

Os sacos de PE e PP foram preparados de acordo com Alves e Faria (2010). Desta forma, 300 g de arroz foi deixado de molho em água (2 partes de água para 1 de arroz cru) por 15 minutos e, em seguida, escorrido por mais 15 minutos. Em seguida, 450 g de arroz úmido foram colocados nos respectivos sacos, que foram fechados com quatro dobras e grampeados com três grampos. Os sacos foram submetidos a esterilização em panela de pressão elétrica por 30 minutos.

As barricas de 5 L de PEAD foram furadas na parte superior e os furos cobertos com filtro de 0,2 µm. Na sequência, 300 g de arroz e 150 mL de água foram colocados na barrica, a qual foi fechada com sua tampa acoplada de uma borracha de frasco de penicilina e submetida à esterilização por 15 minutos a 121°C.

A inoculação foi realizada, após os recipientes estarem em temperatura ambiente, utilizando 5 mL de suspensão de esporos de *B. bassiana* ou *B. thuringiensis* na concentração de 1×10^9 UFC/mL em cada recipiente, aplicados com uma seringa e agulha estéreis. Após a injeção do produto no reator, foram

aplicadas duas camadas de fita Micropore nos locais de aplicação para vedação, e as embalagens foram agitadas para homogeneização do substrato com o inóculo.

Os reatores foram incubados por 7 dias em ambiente mantido em aproximadamente 23°C. Após esse período, foi feita a extração dos microrganismos do arroz fermentado utilizando 500 ml de solução salina 0,85% (m:v) contendo 0,05% (m:v) de polisorbato 80. Em seguida a mistura foi agitada por 5 minutos e passada por uma gaze para reter os sólidos. As frações líquidas resultantes foram submetidas às análises de *Salmonella* spp. (Silva *et al.*, 2010), coliformes termotolerantes (Silva *et al.*, 2010), colônias típicas do microrganismo alvo (Monnerat *et al.*, 2020), pH utilizando um pHmetro de bancada e sólidos solúveis utilizando um refratômetro portátil.

Análises estatísticas

Os ensaios foram conduzidos em triplicata e 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 Figura 1 apresenta os valores médios de pH e teor de sólidos solúveis nos extratos de *B. bassiana* e *B. thuringiensis*. Observa-se que para os dois microrganismos, o pH ficou em torno de 6,0, um valor aceitável para aplicação na agricultura. O teor de sólidos solúveis também não apresentou variações entre as amostras, estando em torno de 2,0 °Brix.

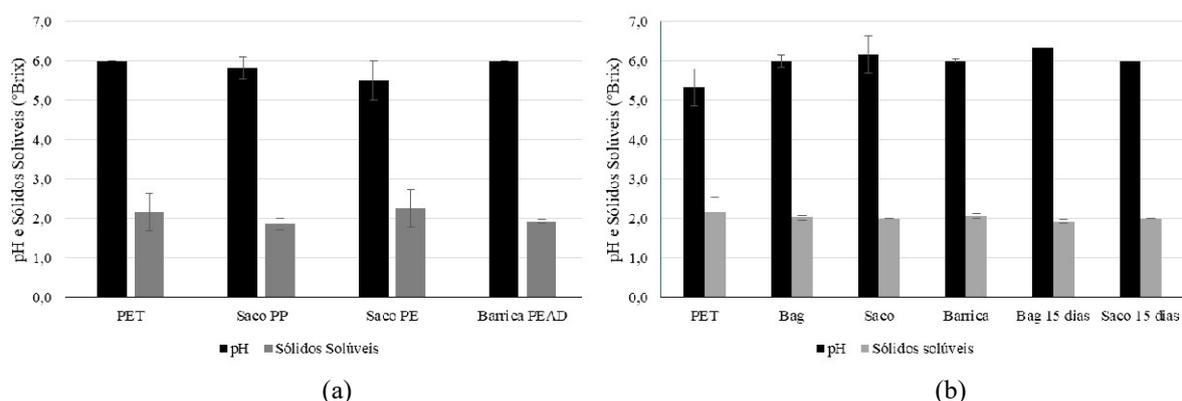


FIGURA 1. Teor de sólidos solúveis e pH nos extratos dos diferentes reatores utilizados no cultivo de (a) *B. bassiana* e (b) *B. thuringiensis*.

A Figura 2 apresenta as contagens de unidades formadoras de colônias típicas de *B. bassiana* e *B. thuringiensis* presentes nos extratos de cada reator avaliado, em escala logarítmica.

As contagens dos microrganismos alvos atingiram valores, em média, entre 10^8 e 10^9 UFC/mL, valores satisfatórios do ponto de vista da aplicação dos bioinsumos a base de *B. bassiana* (Brasil, 2019) e rozoável para *B. thuringiensis* (Monnerat *et al.*, 2020). A análise estatística dos resultados indicou que não houve diferença significativa entre os extratos dos diferentes reatores para cada microrganismo, com 95% de confiança pelo teste Tukey.

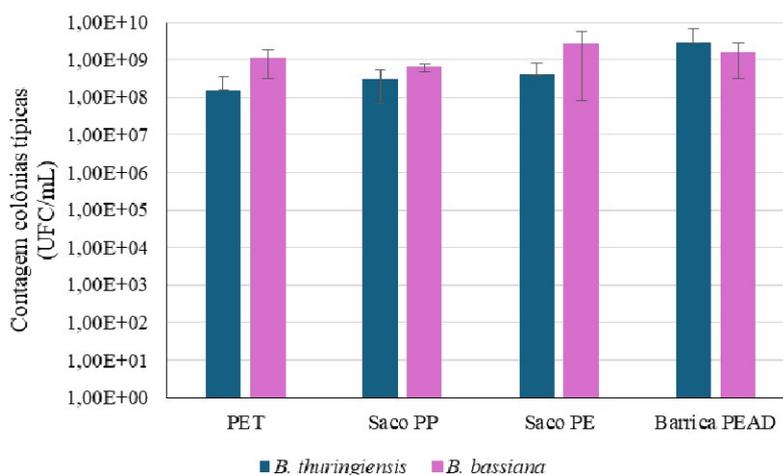


FIGURA 2. Contagem de colônias típicas (UFC/mL) de *B. bassiana* e *B. thuringiensis* nos extratos dos reatores em PET, Sacos PP, Sacos PE e Barrica PEAD, em escala logarítmica (base 10).

Em termos de contaminações, nenhum reator apresentou presença de *Salmonella* spp. e coliformes termotolerantes (consequentemente *E. coli*) indicando que os procedimentos adotados foram capazes de evitar contaminações durante a sua manipulação. Nos extratos de *B. thuringiensis* não foram detectadas colônias atípicas, no entanto, para *B. bassiana*, foram detectadas em algumas réplicas dos reatores PET, saco PP e barrica de PEAD, como pode ser observado na Figura 3.

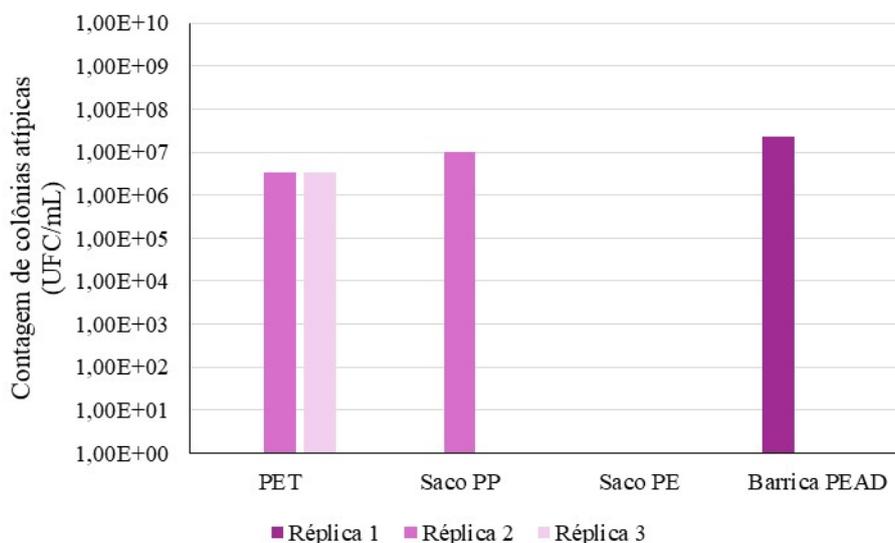


FIGURA 3. Contagem de colônias atípicas (UFC/mL) de *B. bassiana* nos extratos dos reatores em PET, Sacos PP, Sacos PE e Barrica PEAD, em escala logarítmica (base 10), para cada réplica.

Embora as contagens de *B. bassiana* tenha atingido valores consideráveis, a presença de contaminantes, principalmente nas garrafas PET, podem ser aprimorados, evitando queda da eficiência dos bioinsumos produzidos por esta metodologia. É importante reforçar que os microrganismos patogênicos *E. coli* e *Salmonella* spp., não foram encontrados nos produtos.

Santos *et al.* (2020) avaliaram multiplicados *on farm* no Vale do São Francisco, obtidos por fermentação submersa, e evidenciaram contaminação em todas as amostras, sendo que em 70% delas foram detectados coliformes termotolerantes e *Salmonella* spp. De forma similar, Lana *et al.* (2019) analisaram amostras de multiplicados *on farm* de *Bacillus thuringiensis*, de diferentes da região de Jataí, observando que todas as amostras estavam contaminadas por patógenos.

CONCLUSÕES

Os procedimentos propostos para os quatro reatores (garrafas PET, sacos PE, sacos PP e barricas PEAD) foram capazes de sustentar o cultivo dos microrganismos *Beauveria bassiana* e *Bacillus thuringiensis*, apresentando contagens dos microrganismos de interesse na faixa de 10^8 e 10^9 UFC/mL. A contaminação por microrganismos patogênicos não foi evidenciada, porém a presença de colônias atípicas em algumas análises de *B. bassiana* devem ser investigadas para aprimoramento dos procedimentos. De forma geral, os métodos apresentados constituem uma opção simples, de baixo custo e com mínimo de segurança para a produção *on farm* dos microrganismos avaliados.

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

Iris de Lima 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 pela estrutura e à Raiar Orgânicos pelo auxílio financeiro.

REFERÊNCIAS

ALVES, R. T.; FARIA, M. R. de. **Pequeno manual sobre fungos entomopatogênicos**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2010. 50p.

ARRUDA, R. O. M.; ROBERG, R.A.P.; GONZALEZ, C.; LARENTIS, A.L.; SILVEIRA, M.M.; BENINTENDE, G.B.; CAPALBO, D.M.F.; MORAES, I.O.; MORAES, R.O. Cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* em meio sólido. **Arq. Inst. Biol., São Paulo**, v. 70, n. suplemento 3, p. 133-136, 2003.

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.

FERREIRA, J. M. S.; SANTOS, F.J.; PIMENTA, L.R.; SANTANA, A.V.; SANTOS, A.J.; TALAMINI, V. **Técnicas para produção artesanal e utilização do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* no campo**. Aracajú – CE: EMBRAPA, 2019.

KUMAR, Deepak *et al.* **Multifunctional growth-promoting microbial consortium-based biofertilizers and their techno-commercial feasibility for sustainable agriculture**. In: Rhizobiome. Academic Press, 2023. p. 167-208.

LANA, U. G. P.; TAVARES, A.N.G.; AGUIAR, F.M.; GOMES, E.A.; VALICENTE, F.H. **Avaliação da Qualidade de Biopesticidas à Base de *Bacillus thuringiensis* Produzidos em Sistema “on farm”**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2019. 23 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Boletim de pesquisa e desenvolvimento,191).

MATOS, Mateus Fernandes; SILVA, Leandro Israel da. **Produção *on farm* de *Bacillus thuringiensis*: uma alternativa para a agricultura sustentável**. Em: Congresso Nacional de Sustentabilidade Online, v. 4, n. 1,

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**. Brasília: Embrapa, 2020.

SANTOS, A., Dinnas, S., & Feitoza, A. **Qualidade microbiológica de bioprodutos comerciais multiplicados *on farm* no Vale do São Francisco: Dados preliminares**. Enciclopédia bioesfera, v. 17, n.34, 2020.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, A.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; GOMES, R.A.R.; OKAZAKI, M.M. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 4a. Edição. São Paulo: Varela. 2010. ISBN 978-85-7759-013-1.

VALICENTE, F. H.; LANA, U.G.P.; PEREIRA, A.C.P.; MARTINS, J.L.A.; TAVARES, A.N.G. **Riscos à produção de biopesticida à base de *Bacillus thuringiensis***. Circular Técnica, v. 239, p. 20, 2018.