

# Efeito da Variação da Composição do Substrato, Umidade e Inóculo na Produção de *Bacillus thuringiensis* em Fermentação Semi-sólida

Ana I. Catalán<sup>1</sup>; Gisele Y. Miyashira<sup>2</sup>; Ricardo Wagner<sup>3</sup>; Graciela Benintende<sup>4</sup>; Regina O. M. Arruda<sup>5</sup>; Iracema O. Moraes<sup>5</sup>; Deise M. F. Capalbo<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable / Uruguay; <sup>2</sup> Universidade de São Paulo/SP; <sup>3</sup> Universidade Federal do Paraná/PR; <sup>4</sup> IMYZA-INTA/Argentina; <sup>5</sup> Universidade de Guarulhos- Lab. Bioprocessos – Praça Teresa Cristina, 01 – Guarulhos – SP - CEP 07023-070- [reginaarruda@hotmail.com](mailto:reginaarruda@hotmail.com) ; <sup>6</sup> Embrapa Meio Ambiente/SP

## RESUMO

*O controle microbiano é um dos processos de controle de pragas mais estudados, e visa a formulação de inseticidas à base de entomopatógenos. Bacillus thuringiensis (Bt) é um biopesticida de ampla aplicação. Trata-se de uma bactéria aeróbica, que durante a esporulação apresenta um corpo cristalino contendo endotoxinas ativas para certos tipos de larvas de insetos. A produção deste bioinseticida pode ser realizada por fermentação aproveitando resíduos agroindustriais como substrato. Recentemente a fermentação semi-sólida (FSS) tem recebido atenção por apresentar menor produção de resíduos líquidos e obtenção de produto mais concentrado. Durante o III Curso “Fermentação Semi-sólida na obtenção de Bioprodutos”/2002, foi proposto o estudo da produção de esporos de Bt por FSS sob diferentes condições de processo: composição do substrato; umidade e volume de inóculo; tipo de tratamento térmico. As avaliações realizadas indicaram a possibilidade de uso de tratamento térmico não convencional, como opção de processamento de alguns substratos*

## INTRODUÇÃO

A utilização indiscriminada de inseticidas para controle de pragas desperta o interesse de pesquisadores para o desenvolvimento de métodos alternativos não poluentes. O controle microbiano é um dos mais estudados visando a formulação de inseticidas a base de entomopatógenos para utilização em programas de manejo integrado de pragas (MIP), Arruda,1999. O *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) é um pesticida microbiano muito estudado e de ampla aplicação. O *Bt* é uma bactéria aeróbica, gram-positiva, formadora de esporos, que produz um corpo cristalino contendo um ou mais polipeptídeos (endotoxinas) muito tóxicos para certos tipos de larvas de insetos.

A produção destes bioinseticidas pode ser realizada por fermentação aproveitando resíduos agroindustriais de baixo valor comercial como substrato. A fermentação submersa vem sendo amplamente utilizada para a produção de inseticidas em larga escala a base de *Bt* assim como enzimas e antibióticos. Recentemente a fermentação semi-sólida, muito utilizada no oriente para a produção de alimentos, tem recebido atenção por apresentar vantagens como menor produção de resíduos líquidos a serem tratados no final do processo, obtenção de produtos mais concentrados e, que muitas vezes estão prontos para o uso, etc, conforme Del Bianchi, et al., 2001. Hongzhang et al., 2002, também comentam as vantagens do processo e apresentam

um novo tipo de reator cilíndrico, em escala industrial (70 m<sup>3</sup>) em cujo interior podem ser colocadas bandejas horizontais ou verticais. É dotado de dispositivos para a circulação de ar, que promove a transferência de calor e de massa, sendo o substrato usado para a fermentação em estado sólido de *Bacillus thuringiensis* CM-1, composto de farelo de trigo e bolo de feijão (seco e em pó), na relação 7/3 (peso/peso). Adams et al., 2002, estudaram a utilização de cama de frangos, como substrato fermentativo, analisando o potencial de diversos microrganismos, incluindo o *Bacillus thuringiensis* var. *japonensis*, através da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) e contagem de esporos, os quais atingiram respectivamente 3.10<sup>9</sup> e 1. 10<sup>9</sup> UFC/g.L.

Define-se fermentação semi-sólida (FSS) o processo em que há o crescimento microbiano, e conseqüente transformação do substrato, constituído de materiais sólido umedecidos, na ausência de água livre. A utilização do material sólido pelos microorganismos pode acontecer de duas formas: quando este serve como principal fonte de nutrientes ou quando este é apenas um suporte sólido entre o microrganismo e a fonte de nutrientes<sup>1</sup>. A atividade de água do substrato é importante em FSS porque uma pequena quantidade de umidade pode limitar o crescimento e o metabolismo do microrganismo, Pelizer, 1995.

Neste trabalho estudou-se o efeito da umidade, diferentes proporções de quirera de milho e bagaço de cana como substrato e volume de inóculo para a produção de *Bt* var. *israelensis* por fermentação semi-sólida. Avaliou-se também a importância do tratamento térmico no processamento do substrato.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### - Microrganismos e condições de crescimento

Linhagem de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* - HD 567 (*Bti*), provenientes do United States Department Agriculture (USDA) que estão liofilizadas no laboratório de Formulação e Fermentações do CNPMA/EMBRAPA (Jaguariúna, SP).

O *Bti* foi re-hidratado, inoculado em tubos de ensaio com meio ágar estéril, levados à estufa por 24 h a 30 °C para desenvolvimento.

Para a pré-fermentação em meio líquido, foram usados frascos Erlenmeyer de 250 mL com 100 mL de caldo nutriente, cuja composição é: extrato de carne 3g/L; peptona 8 g/L; Cloreto de Sódio 8 g/L.

A inoculação foi feita colocando-se asépticamente uma pequena quantidade de microrganismo-estoque ao meio.

A pré-fermentação ocorreu à temperatura ambiente (27 a 30 °C) a 150 rpm, por 24 horas.

### - Preparação dos reatores

Como reatores foram utilizadas embalagens de polipropileno de alta densidade, estéreis, de 26,0 cm x 22,5 cm, com bocal hermético de 5,5 cm de diâmetro e capacidade total de um litro (EMBAQUIM Com. Ind. Ltda.)

Aos reatores foram adicionados 100 g de substrato composto por: milho (tipo quirera, adquirida da empresa Yoki Ind. e Com. Ltda.) e bagaço de cana (proveniente da Usina Ester, Limeira, SP), em diferentes proporções. Foram adicionados também 10 mL de água destilada.

O reator, com a tampa semi-aberta, contendo o substrato foi submetido a um tratamento térmico, em forno de microondas, em potência alta (frequência de microondas de 2.450 MHz), por 2 minutos. Esperou-se 2 minutos para fechamento da tampa do reator.

- Condições operacionais do processo fermentativo

Cada reator foi inoculado com diferentes quantidades do cultivo pré-fermentado, com adição de água destilada estéril para o ajuste de umidade.

Ainda na câmara de fluxo laminar, será permitida a entrada de ar dentro da embalagem plástica, possibilitando que fique uma camada de até 10 cm de altura de ar. Os reatores foram colocados em estufa a 30 °C. A cada 24 horas os reatores foram agitados manualmente e aerados.

- Acompanhamento do processo

Dos reatores 1, 8, 15 e 18 foram retirados cerca de 2 g a cada 24 horas para a determinação de UFC/g e pH. Ao final da fermentação foram retirados 2 g de todos os reatores para as mesmas medidas. Para contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) as amostras coletadas foram tratadas com ultra-som (20 minutos), diluídas, submetidas a choque térmico (10 minutos a 80 °C seguido por banho de gelo) (MORAES, R., 1993). O plaqueamento foi realizado em meio sólido e incubados a 30 °C por 24 h.

A análise do pH foi feita utilizando-se, aproximadamente, 0,5 g do meio fermentado, diluído em 9,0 mL de água destilada em tubos de ensaio. Os tubos foram tratados com ultra-som por 20 minutos e mediu-se o pH. Ao final da fermentação, as embalagens foram abertas e secas a 50°C por 24 horas.

- Planejamento experimental

Para verificar a influência das variáveis (composição do substrato, umidade do meio e quantidade de inóculo) fez-se um planejamento fatorial  $2^3$  + configuração estrela, conforme Tabela 1.

**Tabela 1:**Planejamento fatorial tipo estrela

ENSAIO	MILHO		UMIDADE		INÓCULO		ÁGUA
1	+1	77,5	+1	26	+1	12,5	3,5
2	+1	77,5	+1	26	-1	7,5	8,5
3	+1	77,5	-1	24	+1	12,5	1,5
4	+1	77,5	-1	24	-1	7,5	6,5
5	-1	72,5	+1	26	+1	12,5	3,5
6	-1	72,5	+1	26	-1	7,5	8,5
7	-1	72,5	-1	24	+1	12,5	1,5
8	-1	72,5	-1	24	-1	7,5	6,5
9	-1,6	71	0	25	0	10	5
10	+1,6	79	0	25	0	10	5
11	0	75	-1,7	23,3	0	10	3,3
12	0	75	+1,7	26,7	0	10	6,7
13	0	75	0	25	-1,6	6	9,2
14	0	75	0	25	+1,6	14	1,0
15	0	75	0	25	0	10	5
16	0	75	0	25	0	10	5
17	0	75	0	25	0	10	5

Para a análise dos resultados, utilizou-se o programa STATISTICA.

Foram feitos também 2 ensaios (18 e 19) para verificar a influência do tratamento térmico, as condições foram iguais às do ponto central (ensaio 15), exceto pelo tratamento térmico que não foi realizado.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

A Tabela 2 apresenta os resultados em UFC/g após 72 h de fermentação.

**Tabela 2:** Unidades formadoras de colônia final para cada ensaio.

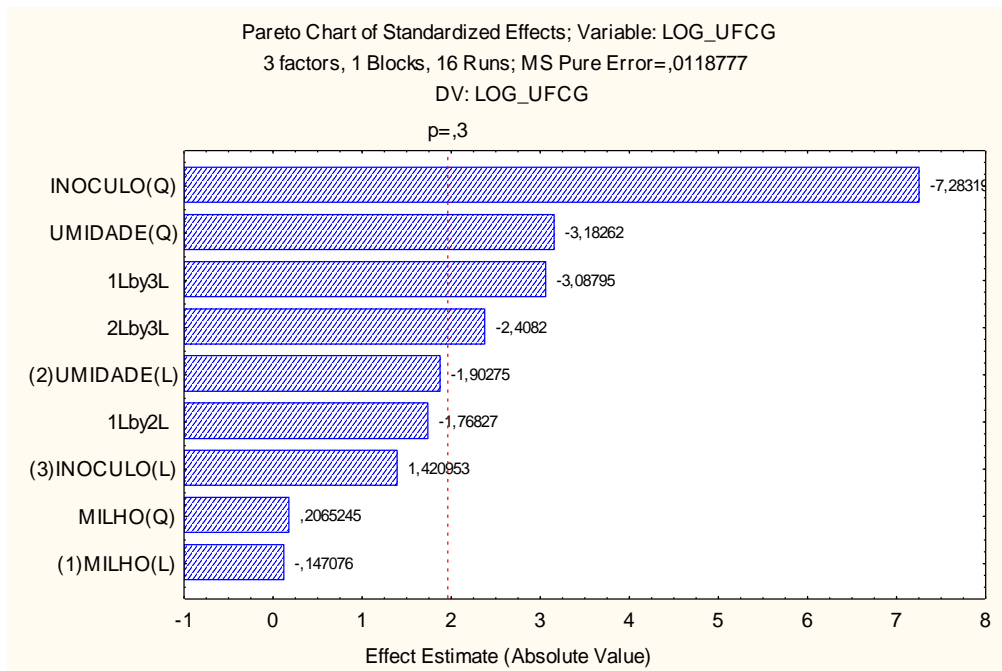
ENSAIO	UFC/g	Log UFC/g
1	1,26E+09	9,10
2	3,94E+09	9,60
3	4,52E+09	9,66
4	4,13E+09	9,62
5	3,18E+09	9,50
6	2,28E+09	9,36
7	4,18E+09	9,62
8	1,86E+09	9,27
9	1,15E+10	10,06
10	7,76E+09	9,89
11	4,76E+09	9,68
12	3,82E+09	9,58
13	1,20E+09	9,08
14	2,54E+09	9,40
15	8,77E+09	9,94
16	6,15E+09	9,79
17	5,23E+08	8,72
18	1,43E+07	7,16
19	1,92E+06	6,28

Para a análise estatística não foram considerados os ensaios 17, devido a problemas experimentais que resultaram em baixo valor de UFC/g, 18 e 19, que não estavam incluídos no planejamento inicial e foram realizados simplesmente para verificar a influência do tratamento térmico. O tratamento estatístico dos dados resultou no seguinte modelo empírico (equação 1), para um limite de confiança de 70% ( $\alpha = 0,3$ ):

$$\log UFC/g = 9,89 - 0,11Umidade^2 - 0,28Inóculo^2 - 0,12Milho*Inóculo - 0,09Umidade*Inóculo \quad (1)$$

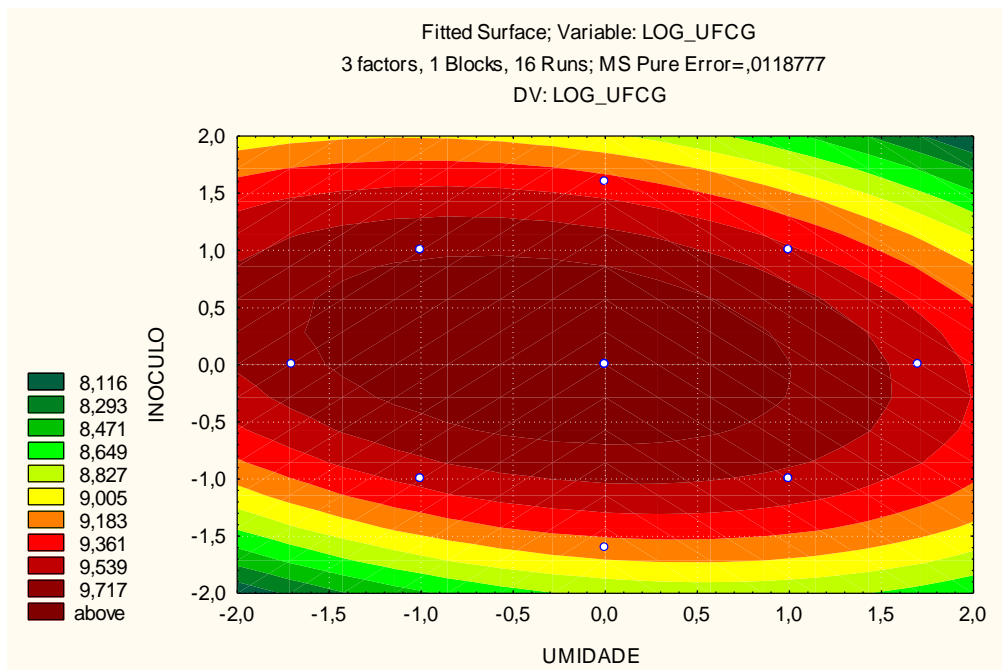
Observa-se que os resultados obtidos para *Bacillus thuringiensis israelensis*, em UFC são melhores que os obtidos por Adams et al., 2002, para *Bacillus thuringiensis var. japonensis*.

A influência das diferentes variáveis pode ser vista na Figura 1. Verifica-se que o volume de inóculo, seguido da umidade inicial do meio apresentam maior influência no processo. Analisando-se essas variáveis isoladamente, observa-se que quanto maior o valor destas, menor o valor de UFC/g ao final da fermentação. Ao relacionar as variáveis quantidade de milho no meio e volume de inóculo, observa-se que deve-se utilizar maior quantidade de milho com menor volume de inóculo ou vice-versa, para se obter melhores resultados. O mesmo pode se dizer com a relação existente entre umidade inicial do meio e volume de inóculo.



**Figura 1:** Efeito das variáveis no valor de UFC/g ao final da fermentação.

Não se observam diferenças estatisticamente significativas com relação às quantidades de milho testadas. Isso é importante porque o milho, apesar de ser a fonte de nutrientes, pode ser utilizado em menores proporções, reduzindo o custo do substrato.



**Figura 2:** Análise do efeito da umidade inicial e do volume de inóculo no valor de log UFC/g.

Analisando-se a Figura 2, observa-se que o ponto central adotado no experimento (ensaios 15 e 16) estava próximo à condição ótima que corresponde a valores de umidade inicial do meio entre 24,5 e 25 % e de volume de inóculo entre 10 e 11,7 mL.

Os valores de pH variaram entre 5,5 e 6,0 sendo que o pH da água utilizada para as diluições das amostras foi de 6,2. Esta variação é muito pequena se comparada a observada na fermentação submersa em que o pH no final do processo atinge valores superiores a 10. O método empregado pode não ser o adequado para a análise de pH em substrato semi-sólido.

Observou-se que o maior crescimento ocorreu no ensaio 15 (ponto central), o qual resultou em  $8,77 \times 10^9$  UFC/g Este resultado está de acordo com a melhor condição de cultivo observada no tratamento estatístico.

Verifica-se que o ensaio 18, realizado sem tratamento térmico do substrato não apresentou crescimento. Isto indica que o tratamento térmico aplicado pode promover a gelatinização do substrato, tornando os nutrientes mais acessíveis ao microrganismo .

## CONCLUSÕES

Para as condições de cultivo estudadas, utilizando-se como reator o saco plástico de volume 1 litro, e como microrganismo o *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* e 100g de meio de cultivo, conclui-se que:

- o ponto central adotado no experimento estava próximo à condição ótima para esse processo o que corresponde a valores de umidade inicial do meio entre 24,5 e 25 % e de volume de inóculo entre 10 e 11,7 mL
- o volume de inóculo, seguido da umidade inicial do meio apresentaram maior influência no processo e analisando-se essas variáveis isoladamente, observou-se que quanto maior o valor destas, menor o valor de UFC/g ao final da fermentação.

- ao relacionar as variáveis quantidade de milho no meio e volume de inóculo, deve-se utilizar maior quantidade de milho com menor volume de inóculo ou vice-versa, para se obter melhores resultados.
- há necessidade do tratamento térmico do substrato para que este possa ser utilizado pelo microrganismo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, T.T., Eiteman, M. A., Hanel, B.M. (2002) Solid state fermentation of broiler litter for production of biocontrol agents. *Bioresource Technology* 82 (1): 33 – 41.

Arruda, R. O. M. (1999) Estudo da fermentação semi-sólida para produção de *Bacillus thuringiensis*, *Tese de Doutorado*. Universidade de São Paulo/FCF, 92 p.

Del Bianchi, V. L., Moraes, I.O., Capalbo, D.M.F. (2001) Fermentação em estado sólido. In: Schmidell et al. *Biotecnologia industrial* Ed. Edgard Blücher S. Paulo, v 2: 247 - 276.

Hongzhang, C., Fujian, X., Zhonghou, T., Zuohu, L. (). A novel industrial-level reactor with two dynamic changes of air for solid-state fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 93 (2): 211 – 214

Pelizer, L. H. (1995) Estudo de fermentação semi-sólida utilizando-se resíduos agroindustriais, *Dissertação de Mestrado*. Universidade de São Paulo.