



## MEIO AMBIENTE

# MULTIPLICAÇÃO DE *Bacillus subtilis* ATCC-6051 POR MEIO DA VINHAÇA DE SOJA: ALTERNATIVA DE MEIO DE CULTURA LIQUÍDO

João Guilherme Buzetto Tsuchiya <sup>1</sup>; Paulo Agenor Alves Bueno <sup>2</sup>; Adriele Rodrigues dos Santos <sup>3</sup>; Isadora Maria Lopes Trombini, <sup>4</sup>; Beatriz Leão Ferraz Alves <sup>5</sup>

<sup>1</sup> Graduando, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, jtsuchiya@alunos.utfpr.edu.br.

<sup>2</sup> Professor, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, pauloabueno@gmail.com.

<sup>3</sup> Técnica, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, adrielesantos@utfpr.edu.br.

<sup>4</sup> Graduando, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, trombini@alunos.utfpr.edu.br.

<sup>5</sup> Graduando, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, beatrizleaoalves@alunos.utfpr.edu.br.

### RESUMO

*Devido ao aumento da demanda por alimentos, aumenta-se assim o uso de agrotóxicos. Além desse fator, a facilidade e certeza de uso faz com que esses produtos químicos sejam cada vez mais usados. No entanto trazem com seu alto consumo problemas ambientais e de saúde humana. Buscando alternativas mais sustentáveis, a utilização de fungos e bactérias ganha destaque, porém os custos em relação à meio de cultura podem ser um entrave. Buscando solucionar esse problema estudos testando diversos resíduos da indústria, como meio de cultura base é realizado. Dessa forma o objetivo desse estudo foi testar a vinhaça de soja como meio de cultura líquido para crescimento de *Bacillus subtilis*. Para alcançar a resposta a esse objetivo, testes em incubadora shaker, biorreator de bancada atrelado à técnica de diluição seriada, foram usados no estudo. Em incubadora shaker a vinhaça concentrada se mostrou promissora, não havendo diferença significativa em relação aos tratamentos junto ao controle. Já a vinhaça in natura testada em biorreator de bancada, para o microrganismo *B. subtilis*, não mostrou bons resultados apresentando decaimento. Assim conclui-se que a vinhaça de soja é um resíduo agroindustrial promissor para meio de cultura, e acredita-se que seja necessário um estudo aprofundado em relação a sua aplicabilidade para *B. subtilis* e outros microrganismos, variando as condições físicas.*

**Palavras-chave:** fungos 1, bactérias 2; resíduo agroindustrial 3; biorreator 4.

### INTRODUÇÃO



Embora o uso de agrotóxicos sejam frequentemente usados devido sua facilidade e assertividade, a relação com os problemas ambientais, e na saúde humana (TAVARES *et al.*, 2020), faz com que o estudo sobre alternativas mais sustentáveis surja. Um exemplo disso é a utilização do manejo biológico a partir de fungos e bactérias, pois apresentam benefícios para a planta e para o solo (LOPES *et al.*, 2021).

Além dos custos envolvidos no meio de cultura, as pesquisas visam aperfeiçoar os processos, através de novas tecnologias que auxiliam nas medições de parâmetros importantes para a produção de um produto biológico (CAPALBO *et al.*, 1991). Um dos principais micro-organismos que são estudados envolvendo essas temáticas é o *Bacillus subtilis*, pois além de ser um dos mais usados na agricultura é bastante usado em teste de crescimento em meio de culturas alternativo, como resíduos de produção industrial. O *B. subtilis* também aparece em estudos de otimização em biorreatores, isso devido suas características de crescimento, ligados a parâmetros como oxigenação, pH e tempo de fermentação (PICÃO, 2020).

A vinhaça de soja (resíduo agroindustrial) possui características químicas e físicas que caso seja descartada, haveria a necessidade de tratamento preliminar. No entanto similar à vinhaça de cana-de-açúcar, essa vinhaça pode vir a apresentar em sua composição suporte nutricional para micro-organismos, assim a aplicação desse resíduo resultaria em uma diminuição com custos de tratamento, além da diminuição de custos na produção de micro-organismo ligada à agricultura.

Dessa forma, alinhando a problemática envolvida com o uso dos agrotóxicos, junto a uma solução acessível que é o uso de produtos biológicos à base de fungos e bactérias, *B. subtilis*, considerou-se a utilização da vinhaça de soja como meio de cultura líquido, buscando o crescimento deste micro-organismo.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

A vinhaça de soja concentrada e *in natura* foi disponibilizada pela Empresa Agrocells Biotecnologia localizada no município de Campo Mourão. A empresa também disponibilizou a cepa de *Bacillus subtilis* ATCC 6051. A vinhaça disponibilizada foi enviada para empresa especializada da cidade para análise química.

### ***Avaliação da viabilidade de aplicação da vinhaça de soja como meio de cultura e suas concentrações***



As concentrações foram 100%, 70% e 40% de vinhaça concentrada, conforme Shi e Zhu (2007), além do controle em caldo BHI, utilizado para crescimento microbiano em geral, utilizando erlenmeyers com volume total de 250 mL, tendo como volume útil 100 mL.

Foi utilizado uma proporção de 1:10 de inóculo e vinhaça, ou seja, 90 mL de meio de cultura para 10 mL de inóculo inicial. O processo de multiplicação ocorreu em incubadora *shaker* com a rotação de 100 RPM e a temperatura controlada para 35 °C. As análises foram realizadas em triplicata.

Os dados para análise de crescimento foram coletados em três amostras T1, T2 e T3. Assim os resultados foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA) com 5% de significância e usando o teste de Tukey para as comparações entre os tratamentos utilizando o software BioEstat 5.0.

Para avaliação de crescimento celular dos micro-organismos foi utilizada a técnica de diluição seriada descrita por Tortora (p. 166-169, 2017) com modificações na escala, sendo utilizada na diluição 0,1 mL de amostra para 0,9 mL de solução salina 0,85%.

### ***Crescimento de B. subtilis em biorreator de bancada***

Para a otimização em biorreator, foi utilizado a melhor concentração de vinhaça em testes na incubadora *shaker* com a multiplicação do *B. subtilis*, passando a ser usada a vinhaça *in natura*.

Para o teste em biorreator foi utilizados o modelo híbrido composto por aeração e coluna de bolhas. Os reatores são compostos pelos seguintes medidores de parâmetro: sonda de pH, sensor de nível, sensor de temperatura acoplado a banho termostaticado, além de bombas peristálticas e compressor.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Foi observada pelo resultado da composição das vinhaças de soja, a presença das principais fontes de nutrientes que dão suporte ao crescimento dos

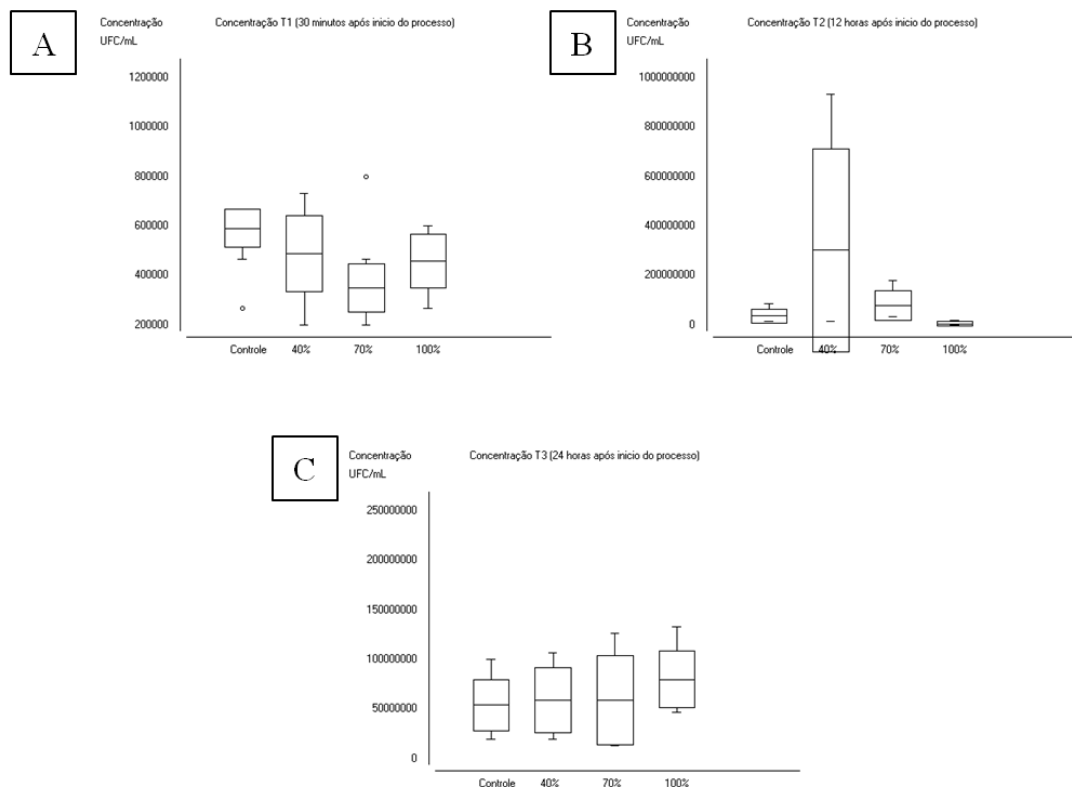


micro-organismos em geral, como os nitrogênios, os carbonos e açúcares, além de sais inorgânicos, demonstrando assim a possibilidade como meio de cultura líquido.

**Tabela 1.** Comparação da composição da vinhaça de soja concentrada, vinhaça de soja *in natura* e vinhaça de cana-de-açúcar. Fonte: Autoria própria (2022).

Parâmetro	Vinhaça de soja concentrada (g/L)	Vinhaça de soja <i>in natura</i> (g/L)	Vinhaça de cana-de-açúcar(g/kg)
Cinza (máx)	31,6 (%)	0,07	-
Cálcio	5,67	2,12	3,3
Fósforo	8,9	1,05	0,5
Magnésio	4,48	0,20	3,3
Potássio	69,52	2,08	15,1
Enxofre	5,13	0,33	5,8
Nitrogênio	32,76	0,53	9,2
Ferro	0,2988	0,0277	0,147
Manganês	0,00964	0,00145	0,019
Cobre	0,06483	0,0076	-
Zinco	0,20307	0,0076	0,007
Boro	0,04111	0,055	-
Açúcares totais (%)	3,87	1,47	-
Carbono orgânico (%)	39,77	58,10	-
Matéria orgânica (%)	68,4	99,93	-

Além disso, a composição química da vinhaça de soja é de certa forma similar à vinhaça de cana de açúcar, que já é utilizada em fermentações utilizando micro-organismos de interesse agrícola (VITTI, 2019).



**Figura 1:** A) Concentração bacteriana UFC/mL em T1; A) Concentração bacteriana UFC/mL em T2 e C) Concentração bacteriana UFC/mL em T3. Fonte: Autoria própria (2022).

Os resultados iniciais das multiplicações não demonstraram uma diferença significativa, onde  $p=0,16$ , sendo, portanto maior que  $0,05$ , dessa forma sabe-se que ao início os tratamentos equivalem ao controle. Seguindo o teste para T2, é possível observar um aumento significativo do tratamento com 40%, pois esse é o único que em comparação ao controle obteve um  $p < 0,05$ . Já em T3, os tratamentos se equivalem novamente ao controle, obtendo-se um  $p = 0,39$ , sendo que o tratamento 100% chega a uma média maior (Figura 1).

Resultados semelhantes foram encontrados por Cardozo (2011) que utilizou a vinhaça de cana de açúcar para o crescimento de *B. subtilis* em incubadora *shaker*, com tempo de processo de 168 horas, sem controle da temperatura (temperatura ambiente).



Os resultados obtidos a partir da multiplicação em biorreator não foram satisfatórios, apresentando decaimento na concentração do micro-organismo (Tabela 2).

**Tabela 2:** Resultado da multiplicação do *B. subtilis* em biorreator de bancada com a utilização da vinhaça in natura 100%. Fonte: Autoria própria (2022).

TEMPO	1ª Replicata CONCENTRAÇÃO (UFC/mL)	2ª Replicata CONCENTRAÇÃO (UFC/mL)	3ª Relicata CONCENTRAÇÃO (UFC/mL)
T1	0	$2,10 \times 10^6$	$1,00 \times 10^4$
T2	0	$1,30 \times 10^5$	$5,00 \times 10^3$
T3	0	$1,03 \times 10^4$	$1,02 \times 10^3$

Em relação à primeira replicata, os valores de crescimento 0, se refere a problemas com a sonda de pH do biorreator, fez a medição errada ao iniciar o teste de fermentação, o que culminou em um aumento excessivo do pH, o que pode ter causado a mortandade do micro-organismo.

Este resultado corrobora com o fato de que a multiplicação de *B. subtilis*, ocorre em faixas de pH entre 4,5 a 7,5, dependendo das condições de oxigenação e composição do meio de cultura (VOSS, 2013).

A vinhaça *in natura* se apresenta rica em fontes orgânicas de carbono e contém um nível de relação carbono x nitrogênio de 1092/1, o que pode indicar que a falta de nitrogênio no meio esteja influenciando o ciclo de Krebs, visto que a quantidade de nitrogênio no meio está relacionada ao crescimento microbiano (JOHK *et al.*, 2014). Além da possibilidade de submeter o microrganismo a sistemas anaeróbios, devido às altas concentrações de carboidratos e açúcares, forçando a bactéria entrar no processo de fermentação.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo foi possível observar que a vinhaça de soja, similar a vinhaça de cana de açúcar apresentou bons resultados quando aplicado em micro-organismos como *B. subtilis*, dependendo das condições físicas de processo. Onde em sistema sem aeração houve crescimento de 2 logs, e com aeração houve decaimento indicando não ser aplicável a este tipo de sistema.



Isso demonstra a versatilidade de alguns micro-organismos, sendo o estudo de extrema importância, pois dá suporte para uma transição de manejo tradicional para o manejo sustentável, indicando assim uma nova alternativa de meio de cultura. Além de propor uma solução de uso para este resíduo, fazendo assim desnecessário custo envolvendo o descarte no meio ambiente.

Dessa forma para estudos futuros, temos alguns caminhos, como: verificar a aplicabilidade numa gama maior de microrganismos de interesse agrícola, variando as condições físicas, verificar a eficiência desses micro-organismos após sua multiplicação em vinhaça de soja.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a empresa Agrocells Biotecnologia pela parceria, e também ao professor orientador, técnicos e estagiários da COEXP.

## REFERÊNCIAS

CARDOZO, R. B.; ARAÚJO, F. F. Multiplicação de *Bacillus subtilis* em vinhaça e viabilidade no controle da meloidoginose, em cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 15, n. 12, p. 1283-1288, Dez. 2011. DOI 10.1590/S1415-43662011001200010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1415-43662011001200010>.

Acesso em: 11 Out. 2021.

CAPALBO, D. M. F.; MORAES, I.O.; SOBRINHO, M. R.; CONTI, H. H. Obtenção de bioinseticida a base de *Bacillus thuringiensis* em novos meios de cultura. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 1, n. 1, p. 13-19, Nov. 1991. DOI 10.5380/pes.v1i0.39534.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5380/pes.v1i0.39534>. Acesso em: 10 Out. 2021.

JÖNK, M. W.; TODESCATO, D.; MAASS, D.; OLIVEIRA, D.; ULSON DE SOUZA, A. A.; GUELLI U. SOUZA, S. M. A. Estudo de meio de cultura para *Bacillus Subtilis* CCT516 utilizando técnica de planejamento experimental. **XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, Out. 2014, Florianópolis. Disponível em: <http://pdf.blucher.com.br.s3-sa-east-1.amazonaws.com/chemicalengineeringproceedings/cobeq2014/1501-18977-143693.pdf>.

Acesso em: 20 Mar. 2022.

LOPES, M. J. S.; SANTIAGO, B. S.; SILVA, I. N. B.; GURGEL, E. S. Microbial biotechnology: inoculation, mechanisms of action and benefits to plants. **Research, Society and Development**, v.



10, n. 12, Set. 2021. DOI 10.33448/rsd-v10i12.20585. Disponível em: <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i12.20585>. Acesso em 03 Abr. 2022.

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.

SHI, F.; ZHU, Y. Application of statistically-based experimental designs in médium optimization for spore production of *Bacillus subtilis* from distillery effluente. **BioControl**. n. 52, p. 845-853, Jan. 2007. DOI: 10.1007/s10526-006-9055-z. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10526-006-9055-z>. Acesso em: 08 Nov. 2021.

TAVARES, D. C. G.; SHINODA, D. T.; MOREIRA, S. S. da C.; FERNANDES, A. C. Utilização de agrotóxicos no Brasil e sua correlação com intoxicações. **Sistemas &**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 1, p. 2–10, Abr. 2020. DOI 10.20985/1980-5160.2020.v15n1.1532. Disponível em: <https://doi.org/10.20985/1980-5160.2020.v15n1.1532>. Acesso em: 22 Nov. 2021.

TORTORA, G. J. Microbiologia. IN: TORTORA, G. J. **Crescimento microbiano: medida direta do crescimento microbiano.** 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017, p. 166-169. Disponível em: <https://edisciplinas.usp.br/mod/resource/view.php?id=3118898&forceview=1>. Acesso em: 08 Nov. 2021.

VOSS, G. B. **Produção de *Bacillus subtilis* em biorreatores airlift e sua aplicação no controle de nematoide de galhas do tomateiro.** 2013. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/106979>. Acesso em 20 Abr. 2022

VITTI, N. V. P. **Viabilização do uso da vinhaça concentrada com fertilizantes nitrogenados: aspectos agronômicos e ambientais.** 2019. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2019. DOI: <https://doi.org/10.11606/T.64.2020.tde-29012020-111418>. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/64/64135/tde-29012020-111418/en.php>. Acesso em: 22 Nov. 2021.