

LODO INDUSTRIAL COMO ALTERNATIVA DE MEIO DE CULTURA PARA *Bacillus subtilis*

Fábio Fernando de Araújo, Adriana Aires, Fernanda Farina

RESUMO

O objetivo deste estudo foi demonstrar que o lodo biológico industrial classe II, originário de indústria alimentícia, pode ser usado como matéria prima de baixo custo para multiplicação de *Bacillus subtilis*. O crescimento de uma estirpe de *Bacillus subtilis* (AP-3), antagonista de fitopatógenos, foi avaliado em meio de cultura com diferentes concentrações de lodo obtido de lagoa biológica de tratamento de efluentes. O lodo apresentou 76,5 % de material orgânico o que favoreceu o desenvolvimento e manutenção das bactérias. A concentração de lodo avaliada (20% p/v) foi considerada como satisfatória para a multiplicação de *B. subtilis*. O enriquecimento do lodo com outros nutrientes não proporcionou incrementos no desenvolvimento de *B. subtilis*. O lodo industrial avaliado apresentou-se como de grande potencial para multiplicação de *B. subtilis* em larga escala.

Palavras chaves: Biopesticidas, reciclagem, resíduos.

Industrial Sludge as a Alternative of Culture Media for *Bacillus subtilis*

ABSTRACT

The objective of this study was to demonstrate that industrial wastewater sludge, class II, originary of alimenticeous industry, could be used as a sole raw material to sustain growth of *Bacillus subtilis*. The growth of one strain of *Bacillus subtilis* (AP-3), antagonist of phytopathogens, was evaluated in culture media based in dilutions with differents concentrations of sludge obtained in biologicals treatments of wastewater. The sludge showed concentration of organic components in 76,5% that contributed for growth and survival of *B. subtilis*. The dose of sludge (20% p/v) evaluated was satisfactory para growth of bacteria. Nutrient enrichment did not increased growth of *B. subtilis* in media with sludge. Culture media based in industrial sludge evaluated would be indicated with of big potential for use large scale.

Key words: Biopesticides, recycling, residues.

INTRODUÇÃO

Os esgotos gerados pela atividade industrial constituem um problema ambiental, devido ao volume produzido e a necessidade de tratamento adequado antes da disposição final. As formas de destinação mais utilizadas tem sido os aterros sanitários, corpos d'água e a agricultura, o que tem ocasionado, com freqüência impactos ambientais significativos. Figueiredo (1995), relata que, quanto ao segmento industrial, a geração de resíduos decorrente dos processos atuais é responsável pela maior parcela dos impactos ambientais da atualidade, com agravante de estarem, os grandes parques industriais, localizados nas proximidades dos grandes aglomerados urbanos. Neste contexto a pesquisa tem buscado novas alternativas para reciclagem destes resíduos reduzindo este impacto.

Com o desenvolvimento de produtos baseados em microrganismos, principalmente para o uso na agricultura como biopesticidas, tem-se a necessidade da descoberta de materiais mais baratos para desenvolvimento de meios de cultura industriais. Sobre esta afirmação Dulmage (1981) relatou que apesar das muitas vantagens da aplicação de *Bacillus thuringiensis* como biopesticida, seu uso é limitado devido ao alto custo de produção. O custo da matéria prima para produção de biopesticidas depende de vários fatores; contudo a matéria prima pode compreender de 30-40 % do custo total do produto (LISANSKY et al., 1993). Neste contexto tem-se buscado a utilização de matérias primas alternativas para viabilizar a utilização destes produtos biológicos. O lodo obtido no tratamento de efluentes pode ser uma boa fonte de carbono, nitrogênio, fósforo e outros nutrientes para muitos processos microbianos agregando valor ao

produto final (MONTIEL et al. 2001). Salientado-se, neste trabalho, que apenas os resíduos industriais que tenha os padrões mínimos de segurança ambiental, classificados como não perigosos, podem ser utilizado como matéria prima para produção de biopesticidas.

Produtos formulados a partir de *Bacillus subtilis* vem sendo utilizados, desde 1983, nos EUA para o tratamento de sementes de amendoim, entre outras culturas, contra vários fitopatógenos (WELLER, 1988). A resistência dos metabólitos produzidos e a formação de endosporos resistentes ao calor são características excelentes para o desenvolvimento comercial de formulações desta bactéria (LAZZARETTI; BETTIOL, 1997). Neste sentido este trabalho teve como objetivo caracterizar e avaliar lodo industrial classe II como meio de cultura para produção de células de *Bacillus subtilis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos nos laboratórios de análise de solo e microbiologia da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP. O lodo utilizado foi proveniente de lagoa biológica da estação de tratamento de efluentes da empresa Danisco ingredientes Ltda, Pirapozinho, SP . O lodo foi classificado, previamente, de acordo com a norma NBR 10004, como resíduo classe II, não perigoso. A composição química do resíduo foi fornecida pela empresa (Tabela 1), estão expressos com base na matéria seca a 110° C.

Tabela 1 Composição química parcial do lodo de ETE da Danisco

Parâmetros	Mat. orgânica	N	P	K	Ca	Mg	S	Relação C/N
Lodo	710,5	6,9	13,8	0,4	91,8	5,7	2,4	56/1

Após a caracterização do lodo foram conduzidos ensaios em laboratório avaliando-se diferentes concentrações de lodo para composição do meio de cultura líquido. No primeiro ensaio foram estabelecido os seguintes tratamentos: controle (meio de cultura tradicional, caldo nutriente, composto de 5g de levedura e 3g de peptona por litro), 5% , 10%, 20% e 40% de lodo seco diluído em água destilada. O lodo foi secado previamente em estufa (105^o C por 24 horas) e depois peneirado (< 2mm) para diluição em 50 mL de água destilada, acondicionada em erlenmeyer. O pH do meio foi corrigido para 7,0 com utilização de soluções de ácido clorídrico 1M e Hidróxido de sódio 1N. Após a esterilização do material, em autoclave, foi realizada a inoculação da bactéria *Bacillus subtilis* (AP3) estirpe já descrita como de grande potencial antagonista a fungos fitopatogênicos (ARAUJO et al., 2005). A inoculação foi efetivada, com auxílio de alça de platina, através da transferência de massa de células multiplicada em meio agar nutriente acondicionado em tubos de ensaio. Os frascos foram deixados sob agitação durante sete dias sob temperatura de 28^o C. Após este período foi realizado a contagem de bactéria no meio utilizando-se a técnica de diluições sucessivas e semeadura em placa com meio de cultura agar nutriente. O material foi incubado por cinco dias em estufa bacteriológica. Após este período foi feita a contagem das bactérias. Posteriormente foi realizado um segundo ensaio com associação do lodo seco com outros nutrientes, sendo definidos os seguintes tratamentos: Controle (meio de cultura tradicional), 5% de lodo seco, 5% de lodo

seco+ 0,2% de levedura, 5% de lodo seco + 0,2% de peptona. A inoculação, incubação e avaliação foi semelhante ao primeiro ensaio.

Os ensaios foram conduzidos em quatro repetições. Os resultados obtidos foram submetidos a análise estatística utilizando-se o programa SISVAR, sendo utilizado o teste de Tukey (p< 0,05) para comparação das médias obtidas em cada tratamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No ensaio onde se utilizou doses crescentes de lodo (Tabela 2) foi encontrado o melhor desenvolvimento de bactérias na concentração de 20% de lodo industrial, comparando-se com o meio padrão (caldo nutriente). Montiel et al (2001) avaliando o cultivo de *Bacillus thuringiensis*, utilizando lodo biológico como matéria prima, afirmaram que o rendimento foi similar a vários meios complexos testados preliminarmente. O lodo apresenta concentração considerável de material orgânico o que favorece o desenvolvimento das bactérias, porém a quantidade de nitrogênio e fósforo pode ser limitante para crescimento expressivo das bactérias (Tabela 1). No experimento com enriquecimento do meio com lodo e levedura e peptona (tabela 3), não foi obtido incremento do desenvolvimento de bactérias comparando-se com o tratamento apenas com o lodo. Isto pode ser um indicativo que o aumento da disponibilidade de nutrientes possa não ser o fator primordial para maiores crescimento da bactéria. Contudo o crescimento obtido em valores próximos ao meio de cultura padrão credencia o meio de cultura a base de lodo como alternativa potencial para uso industrial. Confirmando este fato Ben Rebah et al. (2002b) afirmaram que lodo de ETE industrial já foi

proposto como meio de cultura efetivo para crescimento de rizóbio.

Tabela 2 Desenvolvimento de *B. subtilis* em meio de cultura preparado como lodo industrial

Tratamento	No de bactérias por mL ($\times 10^7$)
Controle	44,0 a [†]
5% de lodo industrial	2,8 b
10% de lodo industrial	10,8 b
20% de lodo industrial	35,2 a
40% de lodo industrial	7,5 b
C.V. (%)	45,7

[†] Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo Teste de Tukey com 5% de probabilidade

Tabela 3. Desenvolvimento de *B. subtilis* em meio de cultura preparado como lodo de industrial enriquecido com levedura e peptona

Tratamento	No de bactérias por mL ($\times 10^7$)
Controle	47,2 a [†]
5% de lodo	1,2 b
5% de lodo + 2g de levedura	0,9 b
5% de lodo + 2g de peptona	1,0 b
C.V. (%)	37,8

[†] Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo Teste de Tukey com 5% de probabilidade

Os resultados encontrados revelam que o lodo avaliado na concentração de 20 % na composição do meio apresenta potencial para utilização em fermentação industrial. A maior concentração avaliada (40%) reduziu a taxa de crescimento da bactéria revelando que além dos nutrientes o lodo em maiores concentrações pode aumentar a concentração de elementos prejudiciais presentes no resíduo. O lodo avaliado poderá também ser utilizado como veículo comercial para manutenção da bactéria pois o mesmo não apresenta inibição do crescimento das bactérias e tem sua composição química caracterizado pela elevada concentração de matéria orgânica. Ben Rebah et al (2002a)

comparando a utilização de turfa e lodo como veículo de sobrevivência para rizóbio concluiu que o lodo é mais rico em nutrientes e tem desempenho equivalente na manutenção da bactéria por vários meses. Nossos estudos ficaram limitados a produção de células vivas em meio de cultura a base de lodo, sendo necessário outros ensaios para verificação se o resíduo não afetou a eficiência da bactéria para utilização como biopesticida.

CONCLUSÕES

- A concentração de 20% de lodo na composição do meio é a que proporciona melhor desenvolvimento para *B. subtilis*.
- O enriquecimento do lodo com peptona e levedura não incrementa o crescimento das bactérias no meio de cultura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAUJO, F.F.; HENNING, A.; HUNGRIA, M. Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Dordrecht, v.21, p.1639-1645, 2005.
- BEN REBAH, F.; TYAGI, R. D.; PREVOST, D. Wastewater sludge as a substrate for growth and carrier for rhizobia: the effect of storage conditions on survival of *Sinorhizobium meliloti*. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 145-151, 2002a. [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00202-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00202-4)
- BEN REBAH, F.; TYAGI, R. D.; PREVOST, D. SURAMPALLI, R. Y. Wastewater sludge as a substrate as new medium for rhizobial growth. **Water qual. res. j. Can.**, v. 37, p. 353-370, 2002b.

DULMAGE, H. T. Production of microbial insecticides by fermentation. In: BURGESS H.D. (ed.) **Microbial control of pests and Plant Disease**. London: Academic Press, 1981. 342p.

FIGUEIREDO, P. J. M. **A sociedade do lixo, os resíduos, a questão energética e a crise ambiental**. Piracicaba: Editora Unimep, 1995. 240p.

LAZARETTI, E.; BETTIOL, W. tratamento de sementes de arroz, trigo, feijão e soja com um produto formulado a base de células e de metabólitos de *Bacillus subtilis*. **Sci. agric.**, v.54, p.89-96, 1997.

LISANSKI, S.G.; QUINLAN, R.; TASSONI, G. **The *Bacillus thuringiensis* Production Handbook**, CPL Press, UK. 1993. 24p.

MONTIEL, M.L.T.; TYAGI, R.D.; VALERO, J.R. Wastewater treatment sludge as a raw material for the production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. **Wat. res.**, v.35, p. 3807-3816, 2001. [http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00103-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00103-8)

WELLER, D.M. Biological control of rhizosphere with bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v.26, p. 379-407, 1988. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.py.26.090188.002115>