

## ROTEIRO PARA MULTIPLICAÇÃO DE MICRORGANISMOS DE INTERESSE NA AGRICULTURA COM FOCO EM PEQUENOS PRODUTORES FAMILIARES DE ALIMENTOS ORGÂNICOS.

Marcela Pavan Bagagli<sup>1</sup> (marcela.bagagli@ifsp.edu.br)

Jéssica Carolina Dissibio Vidotto<sup>2</sup>

Anna Beatriz de Queiroz Aguiar<sup>3</sup>

Vinícius Augusto Ribeiro Moreira<sup>3</sup>

Eduarda Leite Correia<sup>3</sup>

Gleidson Luquezi Maciel<sup>3</sup>

Marcos Vilas Boas Filho<sup>3</sup>

Maurílio Antonio de Melo Souza<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Docente de Engenharia de Biosistemas – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia – Campus Avaré

<sup>2</sup>Mestranda em Engenharia Agrícola – Faculdade de Ciências Agrônômicas da Unesp – Campus Botucatu

<sup>3</sup>Estudante de Engenharia de Biosistemas – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia – Campus Avaré

### Resumo

Este pequeno manual apresenta, de forma sucinta, como utilizar o método de multiplicação de microrganismos de interesse na agricultura com foco em pequenos produtores familiares de alimentos orgânicos desenvolvido em projetos de pesquisa e extensão do IFSP, Campus Avaré. A redação deste texto teve como objetivo melhorar o acesso à tecnologia dos bioinsumos para agricultores familiares, sem, no entanto, exigir investimentos elevados ou capacitação intensa em métodos de multiplicação de microrganismo, podendo os produtores direcionarem sua atenção na aplicação adequada dos produtos e no cultivo de alimentos saudáveis. A proposta utiliza a técnica da fermentação em estado sólido, utilizando arroz como substrato para o crescimento dos microrganismos, sendo a inoculação feita de forma controlada pelo construtivo do reator, orientações de higiene e uso de chama.

**Palavras-chave:** Bioinsumos; Agricultura familiar; microrganismos.

### Introdução

Este procedimento descreve um método de multiplicação e extração de microrganismos de forma simples, prática e segura do ponto de vista de contaminações, com aplicação para a obtenção de bioinsumos *on farm* (para uso próprio) para produtores familiares de alimentos orgânicos.

O procedimento foi idealizado pela professora Marcela Pavan Bagagli e desenvolvido em conjunto com alunos envolvidos em projetos de pesquisa e extensão do Instituto Federal de São Paulo, Campus Avaré, coordenados pela mesma.

Alguns trabalhos descritos na literatura para propagação de microrganismos por fermentação em estado sólido foram utilizados como referência para o trabalho, norteando a escolha do substrato e o desenho do reator (Arruda et al., 2003; Alves; Faria, 2010; Ferreira et al., 2019).

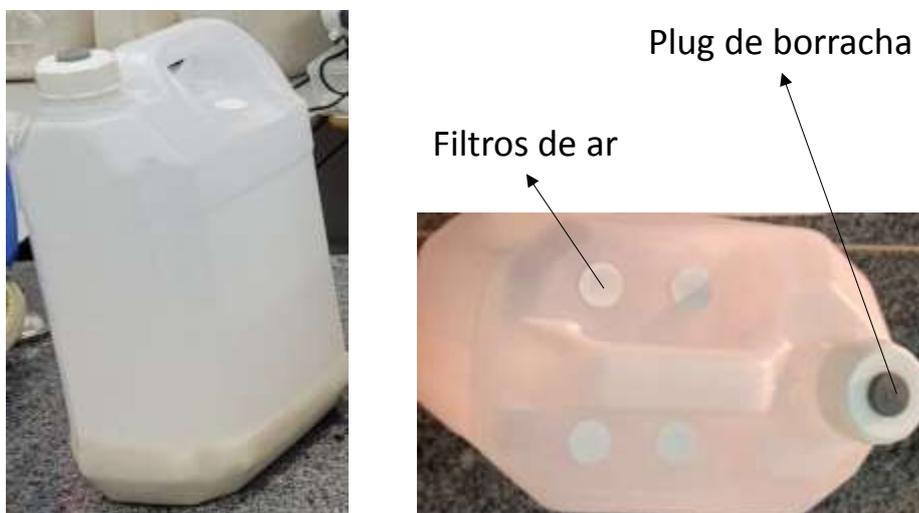
A aplicação do método proposto contou com a colaboração da empresa RAIAR ORGÂNICOS, sendo parte do trabalho realizado por estagiários da empresa, de produtores de alimentos orgânicos associados à Orgânicos Avaré, em especial Rodolfo Jubran Chapchap e Sidnei Aparecido Fratte, além das alunas Maria Clara Rodrigues, Vanessa Gabriella Brito, Anna Beatriz de Queiroz Aguiar, Eduarda Leite Correia, Iris de Lima e Huany de Oliveira Ribeiro.

## **DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE PROPAGAÇÃO DE MICRORGANISMOS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO**

### **O reator**

O reator nada mais é do que o recipiente preparado onde ocorrerá a multiplicação dos microrganismos. Será constituído por uma “Barrica” de plástica (PEAD ou PP) de 5 L, contendo em sua tampa um “plug” de borracha (tipo borracha para frasco de penicilina) fixado e na região abaixo da alça, quatro furos recobertos por filtros adesivos (PTFE ou duplo curativo poroso de rayon, tipo curativo Micropore).

**Figura 1: Reator (a) em vista lateral e (b) em vista superior.**



### **Preparação do reator**

Para realizar a propagação dos microrganismos, o reator deve ser preparado com o substrato e esterilizado em autoclave. O substrato é o material que servirá de alimento para o microrganismo. Neste caso, será utilizado arroz.

Para tanto, deve-se adicionar na barrica 300 g de arroz branco tipo 1 e 350 mL de água, fechar parcialmente com a tampa plástica e autoclavar a 121° C por 15 minutos.

Após resfriamento parcial da barrica, a tampa deve ser completamente fechada e feita agitação para soltar os possíveis grumos de arroz formados.

Esse material autoclavado deve ser reservado em local fresco até o momento de uso. Não se recomenda utilização após 15 dias do processo devido ao ressecamento do substrato.

## Inoculação do reator

A inoculação é o processo de introdução de microrganismos no reator.



**ATENÇÃO:** PARA ESTA PROPOSTA FUNCIONAR ADEQUADAMENTE NÃO SE DEVE ABRIR A TAMPA PARA INOCULAÇÃO.

A inoculação deve ser feita a partir de uma solução do microrganismo de interesse armazenada em seringa de plástico, preparada em condições de esterilidade e a partir de microrganismos puros.



**ATENÇÃO:** ANTES DE INICIAR, LIMPAR A REGIÃO DE TRABALHO COM ÁLCOOL 70%, LAVAR MUITO BEM AS MÃOS E PASSAR ÁLCOOL 70%.

Os próximos passos devem ser realizados próximos à chama, com a barrica posicionada adequadamente, conforme figura 2:

- 1 - Limpa-se o “plug” de borracha com papel embebido em álcool 70% (cuidado com a proximidade da chama, o álcool pega fogo facilmente);
- 2 - Faz-se o acoplamento de uma agulha (25 X 7, 22g hipodérmica) estéril na seringa;
- 3 - Faz-se a introdução da seringa na região central do “plug” de borracha e dispensa o volume de microrganismo desejado;
- 4 - Coloca-se novamente a proteção na agulha e descarta-se adequadamente a seringa e agulha em uma caixa de papelão recoberta por sacola plástica;
- 5 - Agita-se bem a barrica para espalhar o microrganismo no substrato. É importante agitar em mais de uma direção, por cerca de 1 minuto;
- 6 - Identifica-se a barrica com o microrganismo inoculado, a data de inoculação e a previsão de extração.

**OBSERVAÇÃO:** Sugere-se a inoculação de 5 mL de soluções de microrganismos que tenham contagem aproximada de  $10^9$  UFC/mL para bactérias e de  $10^8$  UFC/mL para fungos.

**Figura 2: Inoculação do reator utilizando seringa.**



Caso não se tenha acesso ao microrganismo desta forma, é possível preparar a seringa com um produto comercial de qualidade, que não foi aberto ainda, transferindo para uma seringa estéril. Esse procedimento deve ser realizado próximo à chama e após higienização das mãos e área de trabalho com álcool 70%.

### **Incubação**

A incubação é o período de tempo que o microrganismo necessita para se multiplicar e atingir a quantidade desejada.

As barricas são incubadas de 7 a 9 dias, a depender da temperatura e do microrganismo em questão. Dias mais quentes aceleram o crescimento, dias menos quentes retardam.

Durante este período, as barricas devem permanecer deitadas, com a maior face apoiada na superfície, conforme observa-se na figura 3. O AMBIENTE DEVE SER AMENO, COBERTO, SEM INCIDÊNCIA DIRETA DE LUZ SOLAR E PROTEGIDO DE CHUVAS.

**Figura 3: Disposição das barricas para incubação.**



**ATENÇÃO:** É IMPORTANTE FAZER O ESPALHAMENTO DO ARROZ POR TODA A FACE DA BARRICA QUE FICARÁ APOIADA (CONFORME FIGURA 4), PARA ISTO, BASTA AGITAR SUAVEMENTE O REATOR.

**Figura 4: Espalhamento do arroz na maior face da barrica.**



## **DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DOS MICRORGANISMOS**

Após o tempo de incubação, os microrganismos devem ser extraídos do substrato para serem aplicados.



**SEMPRE USE EPI**



(luvas, máscara e óculos)

Para tanto, deve-se:

- 1 – Observar as barricas, buscando crescimento característico do microrganismo em questão. Caso haja comportamento atípico, não deve-se realizar o procedimento de extração e a barrica deve ser separada;
- 2 – Não havendo comportamento atípico, deve-se introduzir de 500 a 800 mL (dependendo do microrganismo) de solução extratora (contendo 0,85% de sal e 0,05% de Tween 80) preferencialmente estéril (pode ser pasteurizada) na barrica;
- 3 – Agitar vigorosamente por 5 minutos, em diversas direções, quebrando os blocos de arroz;
- 4 – Deixar em repouso por mais 5 minutos;
- 5 – Recolher o líquido, passando por uma peneira limpa e higienizada com cloro, em um recipiente também limpo e higienizado com cloro previamente. Recomenda-se uso de baldes plásticos alimentícios de 2 L. O uso de uma colher pode ajudar o processo;
- 6 - Aplicar imediatamente o produto.

**Figura 5. Extração dos microrganismos. (a) Período de contato com a solução extratora; (b) armazenamento em recipiente higienizado e escuro, identificado.**



(a)



(b)



**ATENÇÃO:** NÃO SE RECOMENDA ESTOCAR O PRODUTO. CASO NECESSÁRIO POR ALGUNS DIAS, COLOCAR EM RECIPIENTE ESCURO

HIGIENIZADO PREVIAMENTE COM CLORO E MANTER EM GELADEIRA . A ESTOCAGEM PROLONGADA IRÁ REDUZIR A EFICIÊNCIA DO PRODUTO E PODE HAVER DESENVOLVIMENTO DE OUTROS MICRORGANISMOS.



**ATENÇÃO: O MATERIAL REMANESCENTE NÃO DEVE FICAR EM LOCAL DE ACESSO A ANIMAIS E CRIANÇAS**

## **DESCARTE E DESCONTAMINAÇÃO DO MATERIAL EXTRAÍDO**

Após a extração, o arroz remanescente nas barricas pode ser colocado em pilhas de compostagem ou pode ser armazenado em sacolas plásticas e cozidos em banho-maria por 30 minutos, sendo descartados na sequência.

**OBSERVAÇÃO:** O ARROZ REMANESCENTE PODE TAMBÉM SER TRITURADO E APLICADO DIRETAMENTE NO SOLO, QUANDO O TIPO DE MICRORGANISMO FOR EFETIVO NESTE TIPO DE APLICAÇÃO. NESTE CASO A APLICAÇÃO DEVE SER IMEDIATA.

Os utensílios utilizados na extração devem ser imediatamente imersos em solução clorada para descontaminação, sendo a solução preparada com 5 colheres de água sanitária para cada 1 L de água. O material deve permanecer por no mínimo 15 minutos na solução. Após este período, deve-se lavar o material com água e detergente/sabão. A solução de descontaminação pode ser descartada junto com as águas cinzas.

O local onde o procedimento foi realizado também deve ser higienizado, utilizando álcool 70% em abundância, o qual deve ser deixado secar naturalmente.



**ATENÇÃO:** NÃO DEIXAR RESTOS DE ARROZ CONTAMINADO NO LOCAL. RECOLHER JUNTO AO MATERIAL DE DESCARTE E LIMPAR MUITO BEM A ÁREA DE TRABALHO.



**O MATERIAL REMANESCENTE NÃO DEVE FICAR EM LOCAL DE ACESSO A ANIMAIS E CRIANÇAS**

As barricas devem ser lavadas com água clorada (1 colher de sopa para cada 1 L de água) e enxaguadas por 3 vezes, sendo deixadas secar abertas. As tampas devem passar pelo mesmo processo. AS BARRICAS PODEM SER REUTILIZADAS POR ATÉ 3 VEZES.

## **PROCEDIMENTOS COMPLEMENTARES E OUTRAS INFORMAÇÕES**

### **HIGIENIZAÇÃO COM CLORO**

Deve ser aplicada em todos os utensílios que forem utilizados no processo de extração (recipientes, colheres, peneiras).

Para tanto, preparar a solução clorada de forma que, para cada 1 L de água, deve-se adicionar uma colher de sopa cheia de água sanitária. Preparar em quantidade suficiente para COBRIR COMPLETAMENTE TODOS OS MATERIAIS.

Os materiais devem ficar imersos por no mínimo 15 minutos na solução clorada. Após este tempo, retirar o material e deixar secar naturalmente.

### **PREPARO DA SOLUÇÃO EXTRATORA**

Para o preparo da solução extratora dever ser feito adicionando-se para cada 1 L de água, 8,5g de sal de cozinha e 0,5 mL de Tween 80.

O Tween 80 é de difícil manipulação. Recomenda-se o uso de um conta gotas com marcação de volume, tipo pipeta Pasteur de plástico (vide lista de materiais para realização do método).

A quantidade de solução extratora pode variar de um microrganismo para outro. Em geral, pode-se fazer uso das seguintes quantidades:

**Tabela 1. Quantidade de solução extratora para cada tipo de microrganismo multiplicado em barrica de 5 L, preparada conforme o procedimento.**

<b>Microrganismo</b>	<b>Volume de solução extratora por barrica (mL)</b>
<i>Beuveria bassiana</i>	500
<i>Bacillus thuringiensis</i> e <i>Bacillus subtilis</i>	500
<i>Metarhizium anisopliae</i>	600 – 800
<i>Trichoderma sp.</i>	600 – 800

### **PADRÕES DE CRESCIMENTO DOS MICRORGANISMOS**

Ao seguir o procedimento descrito para a multiplicação dos microrganismos, espera-se que a aparência dos cultivos seja a descrita na tabela 1.

Tabela 2. Quantidade de solução extratora para cada tipo de microrganismo multiplicado em barrica de 5 L preparada conforme o procedimento.

Microrganismo	Características do crescimento em Arroz
<i>Beuveria bassiana</i>	<b>Massa branca que agrega os grãos de arroz em um bloco.</b> Não deve apresentar coloração escura (verde, cinza, preto, laranja forte). Pode eventualmente apresentar uma coloração avermelhada (cor de amora) em alguns pontos.
<i>Bacillus thuringiensis</i> e <i>Bacillus subtilis</i>	Arroz solto, com coloração creme amarronzado. Não deve apresentar coloração escura (verde, cinza, preto, laranja forte). O <b>CHEIRO CARACTERÍSTICO É O DE “ROUPA SECA NA SOMBRA”</b>
<i>Metarhizium anisopliae</i>	<b>Massa branca no fundo com pontos verdes. Superfície do arroz esverdeada, em tom verde OLIVA.</b> Não deve apresentar coloração cinza, preto, laranja forte. <b>ATENÇÃO:</b> ESPOROS SE DESPRENDEM FACILMENTE, NÃO AGITAR ANTES DE ABRIR A BARRICA, NÃO CHEIRAR
<i>Trichoderma sp.</i>	<b>Massa branca no fundo com pontos verdes. Superfície do arroz esverdeada, em tom verde PETRÓLEO.</b> <b>ATENÇÃO:</b> ESPOROS SE DESPRENDEM FACILMENTE, NÃO AGITAR ANTES DE ABRIR A BARRICA, NÃO CHEIRAR

Para diferenciação da coloração normal dos fungos *Metarhizium anisopliae* e *Trichoderma sp.*, pode-se utilizar como referência os tons da figura 6.

Figura 6. Tons dos esporos dos fungos (a) *Metarhizium anisopliae*; (b) *Trichoderma sp.*, cultivados em arroz.



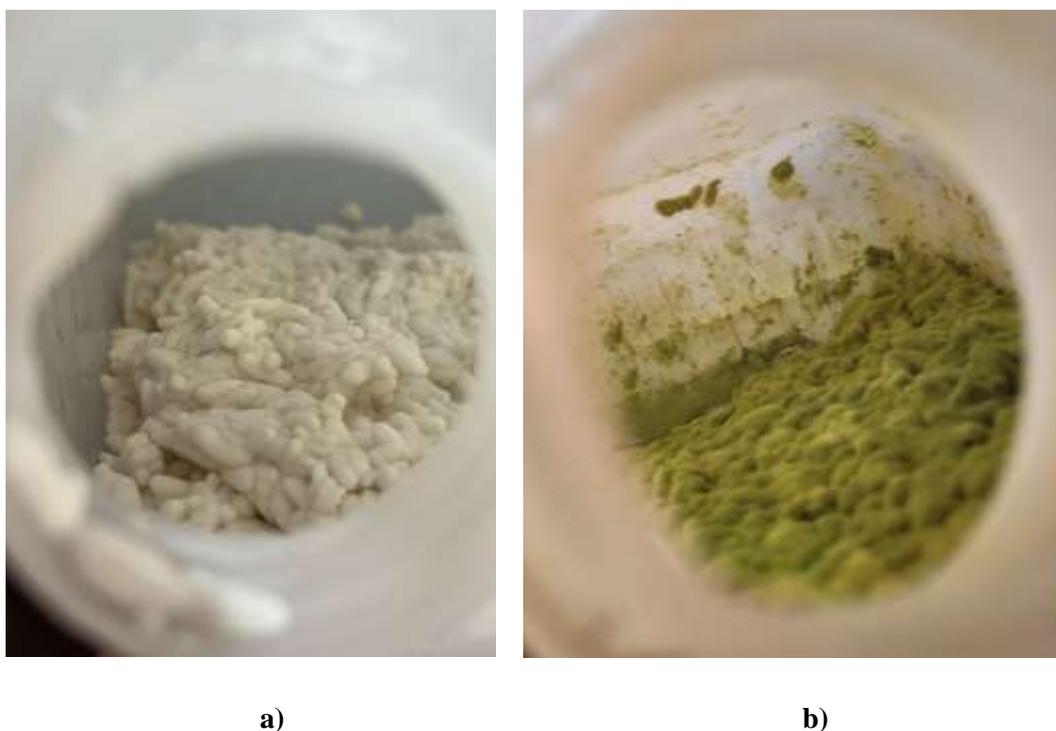
(a)



(b)

A figura 7 traz uma visualização interna do cultivo de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* no sistema proposto.

**Figura 7. Aparência interna das barricas para alguns microrganismos. (a) *Beauveria bassiana*; (b) *Metarhizium anisopliae*. Fotos de autoria de Anna Beatriz de Queiroz Aguiar e Gleidson Luquezi Maciel, respectivamente.**



### RENDIMENTO

O método quando executado como descrito, em condições ambientais adequadas de incubação (temperaturas superiores a 20 °C e inferiores a 35 °C), irá gerar produtos com as concentrações médias apresentadas na tabela 3.

**Tabela 3. Quantidade de solução extratora para cada tipo de microrganismo multiplicado em barrica de 5 L preparada conforme o procedimento.**

Microrganismo	Volume de solução extratora por barrica (mL)	Concentração aproximada de microrganismos (UFC/mL)
<i>Beuveria bassiana</i>	500	1 x 10 <sup>8</sup>
<i>Bacillus thuringiensis e Bacillus subtilis</i>	500	5 x 10 <sup>9</sup>
<i>Metarhizium anisopliae</i>	600 – 800	1 x 10 <sup>8</sup>
<i>Trichoderma sp.</i>	600 – 800	1 x 10 <sup>8</sup>

## LISTA DE MATERIAIS

Tabela 4. Lista de materiais necessários para a execução do método

Material	Qtd	Imagem
<b>Kit Barrica com substrato estéril, seringa de microrganismo e solução de extração estéril</b>	1 por microrganismo	
<b>Balde de 20L (plástico) – utilizar na etapa de higienização e descontaminação de peças</b>	2	
<b>Copo de medida de 500 mL ou mais – para medir a quantidade de solução extratora</b>	1	
<b>Copo de medida de 100 mL – para fazer a dosagem dos produtos na aplicação</b>	2	
<b>Baldes plásticos de 2L ou Jarras plásticas de 2 L – para coletar o material extraído das barricas</b>	1 por microrganismo	
<b>Peneiras de inox que encaixem na jarra plástica – para separar o arroz do extrato contendo o microrganismo</b>	1 por microrganismo	

<p><b>Colheres de sopa em inox</b> – para ajudar na extração do extrato contendo o microrganismo</p>	<p>1 por microrganismo</p>	
<p><b>Frasco escuro com tampa de rosca (plástico ou vidro)</b> – sugerido volume mínimo de 500 mL e máximo de 1000 mL</p>	<p>1 por microrganismo</p>	
<p><b>Conta gotas plástico tipo pipeta Pasteur</b> – para preparar a solução extratora</p>	<p>1</p>	
<p><b>Lamparina de álcool</b> – para realizar a inoculação</p>	<p>1</p>	
<p><b>Papel toalha</b> – para limpeza da área de trabalho</p>	<p>-</p>	
<p><b>Borrifador de álcool</b> – para limpeza da área de trabalho e mãos</p>	<p>1</p>	
<p><b>Álcool 92,8°</b> - para acender a lamparina</p>	<p>-</p>	

<p><b>Álcool 70%</b> - para higienização da área de trabalho e mãos</p>	<p>-</p>	
<p><b>Água sanitária (2 a 2,5% de cloro ativo)</b> - para higienização e descontaminação</p>	<p>-</p>	
<p><b>Etiqueta adesiva</b> - para identificação das barricas e dos recipientes de armazenamento. Sugestão 10 x 7 cm</p>	<p>1 bloco</p>	
<p><b>Caneta permanente</b> - identificação dos materiais</p>	<p>1</p>	
<p><b>Luvas nitrílicas descartáveis</b> - para realizar a extração das barricas (tamanho de acordo com manipulador)</p>	<p>-</p>	
<p><b>Máscara facial descartável</b> - para realizar a extração das barricas</p>	<p>-</p>	
<p><b>Óculos de proteção</b> - para realizar a extração das barricas</p>	<p>1</p>	

<p><b>Sacos de lixo de 50 L ou mais</b> – para coleta de descartes contaminados e restos do arroz</p>	<p>-</p>	
<p><b>Caixa de papelão</b> – para descarte da agulha</p>	<p>2</p>	

**RESUMO VISUAL**

**Kit de produção de microrganismos em meio sólido**



**REATOR barrica**

- Galão plástico de 5L
- Arroz semi-cozido
- Material estéril
- Procedimento para higienização pós uso

**MICROORGANISMO inoculo**

- Seringa contendo o microrganismos de interesse (puro)
- Dosagem sob demanda
- Embalado, descartável
- Caixa para descarte



**LAMPARINA controle da contaminação**

- Lamparina de álcool ou a gás
- Permitir um ambiente livre de microrganismos durante a manipulação



**FLTRO facilitar a aplicação**

- Embalados higienizados
- Reter partículas que possam prejudicar o aplicador
- Saco de voal ou peneira
- Procedimento para higienização



**SOLUÇÃO EXTRATORA**

- Mistura de água e detergente
- Estéril



**Cultivo dos Microrganismos**



**HIGIENIZAR uma mão lava a outra**

- Lave muito bem as mãos e punhos
- Passe álcool em gel e espere secar

**INOCULAR e lá vão os microrganismos**

- Passe álcool em gel no ponto de aplicação e espere secar
- Abra a seringa próximo à chama e insira a agulha no ponto de aplicação
- retire a seringa e descarte corretamente
- Agite muito bem por 2 min.



**INCUBAÇÃO agora é só esperar**

- Coloque a barrica deitada sobre uma superfície plana
- O local deve ser arejado e sem incidência de sol direta
- Aguarde de 5 a 7 dias



**EXTRACÃO pronto!**

- Adicione a solução extratora
- Agite intensamente por 5 min.
- Deixe em repouso por 5 min.
- Filtre
- Aplique seguindo a diluição indicada



**INSTITUTO FEDERAL**  
DE SÃO CARLOS  
Lavras, 2014

**ENGENHARIA DE**  
**BIOSISTEMAS**  
18 - LAVRAS

**Referências:**

ALVES, Roberto Teixeira; FARIA, Marcos. **Pequeno manual sobre fungos entomopatogênicos**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2010. 50 p.

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 estado sólido. Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.70, suplemento 3, p.133-136, 2003.

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. Comunicado técnico 225. Aracaju:Embrapa tabuleiros Costeiros, 2019, 13p.

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

QUIROZ, R.C.; RIYSSISM S.; HERNÁNDEZ, D.; RODRÍGUEZ, R.; CASTILLO, F.; AGUILAR, C.N. Challanges and opportunities of the bio-pesticides production by solid-state fermentation: filamentous fungi as a model. Crit Rev Biotechnol, v. 35, n. 3, p. 326 – 333, 2015. DOI: 10.3109/07388551.2013.857292.

ZHANG, W.; QIU, L.; GONG, A; CAO, Y.; WANG, B. Solid-state fermentation of kitchen waste for production of *Bacillus thuringiensis*-based bio-pesticide. **BioResources**, v. 8, n. 1, p. 1124 – 1135, 2013.