



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS FLORIANÓPOLIS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE AQUICULTURA
CURSO ENGENHARIA DE AQUICULTURA

Jhony Christyan Medeiros de Sousa

Efeito de *Bacillus subtilis* e *Lactobacillus plantarum* na fermentação sólida de farelo de arroz

Florianópolis

2025

Jhony Christyan Medeiros de Sousa

Efeito de *Bacillus subtilis* e *Lactobacillus plantarum* na fermentação sólida de farelo de arroz

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de engenharia de aquicultura do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Aquicultura.

Orientador(a): Prof.(a) Scheila Anelise Pereira Dutra.

Florianópolis

2025

Sousa, Jhony Christyan Medeiros de

Efeito de *Bacillus subtilis* e *Lactobacillus plantarum* na fermentação sólida de farelo de arroz / Jhony Christyan Medeiros de Sousa ; orientadora, Scheila Anelise Pereira Dutra, 2025.

30 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Graduação em Engenharia de Aquicultura, Florianópolis, 2025.

Inclui referências.

1. Engenharia de Aquicultura. 2. Fermentação sólida. 3. Nutrição animal. 4. Resíduo agrícola. I. Dutra, Scheila Anelise Pereira. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Engenharia de Aquicultura. III. Título.

Jhony Christyan Medeiros de Sousa

Efeito de *Bacillus subtilis* e *Lactobacillus plantarum* na fermentação sólida de farelo de arroz

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de bacharel e aprovado em sua forma final pelo Curso Engenharia de Aquicultura

Florianópolis, 26 de 11 de 2025.

Insira neste espaço
a assinatura

Coordenação do Curso

Banca examinadora

Insira neste espaço
a assinatura

Prof.(a) Scheila Anelise Pereira Dutra, Dr.(a)
Orientador(a)

Insira neste espaço
a assinatura

Prof.(a) Felipe Nascimento Vieira, Dr.(a)
Instituição UFSC

Insira neste espaço
a assinatura

Prof.(a) Norha Bolívar, Dr.(a)
Instituição UFSC

Florianópolis, 2025.

Dedico este trabalho à minha mãe, Ana Cristina Medeiros de Sousa, pelo incansável empenho em fazer de mim uma pessoa de sucesso.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por todas as oportunidades, pela disposição e pela coragem concedidas a mim, que me permitiram chegar até aqui.

Agradeço aos meus pais, José Domingos Silva de Sousa e Ana Cristina Medeiros de Sousa, pelo apoio incondicional que me possibilitou dedicar-me integralmente aos estudos. Ao meu pai, por trabalhar incansavelmente todos os dias para que eu tivesse sempre o melhor e pudesse focar na minha formação. À minha mãe, que, até seu último dia de vida, dedicou cada esforço para me mostrar o caminho correto e a importância dos estudos. Ela sonhou em me ver formado em Engenharia e, mesmo não estando fisicamente aqui hoje, sei que está feliz por eu ter conseguido.

Ao meu irmão Jhonata Wallysson e a minha sobrinha Ísis por sempre me apoiarem apesar da distância.

Agradeço também a toda a equipe do Laboratório de Camarões Marinhos UFSC (LCM), em especial à Norha, por ter me ensinado desde o zero todos os detalhes da fermentação sólida com bactérias e por acompanhar de perto cada atividade realizada.

Agradeço às minhas amigas Maria Helena e Beatriz pela parceria e apoio ao longo desses cinco anos de faculdade nos trabalhos, seminários, provas e, principalmente, nos momentos mais difíceis.

À minha namorada, Julia Botelho, por estar ao meu lado em todas as etapas da minha vida, por me apoiar em cada decisão e por contribuir tanto para a construção deste TCC.

Por fim, agradeço à minha querida orientadora, Scheila Anelise Pereira Dutra, deixo meu profundo agradecimento por toda a orientação, paciência e suporte em cada etapa deste trabalho, desde o primeiro dia em que aceitou o desafio de me orientar.

“Sempre faça tudo com muito amor e fé em Deus, que um dia você chega lá”

-Ayrton Senna

RESUMO

Este trabalho tem como objetivo avaliar a fermentação em estado sólido do farelo de arroz (FA) utilizando *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus subtilis* e a combinação de ambas como agentes fermentadores, sob os aspectos de crescimento microbiano (meio dependente) e de pH ao longo do processo. O experimento foi conduzido inteiramente casualizado em quadruplicada, compostos pelos seguintes grupos experimentais: Controle, *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus subtilis* e *L. plantarum* + *B. subtilis*. As fermentações foram realizadas a 30 °C durante 48 horas, com análises e amostragens em 0, 24 e 48 horas para contagem microbiana e aferição de pH. As contagens microbianas foram realizadas em Tripto Soya Agar (TSA) para bactérias heterotróficas totais e em Man, Rogosa e Sharpe (MRS) para bactérias ácido-láticas. Os resultados de crescimento microbiano em TSA e MRS mostram que independentemente dos microrganismos fermentadores do FA houve significativo incremento bacteriano ao longo das primeiras 24 horas e estabilizando nas 24 horas subsequentes. O mesmo padrão ocorreu com o pH, onde descreu significativamente nas primeiras 24h, seguido de estagnação. Ao observar o desempenho microbiano dentro dos tempos amostrais, constatou-se: a) que em TSA a fermentação do FA com *B. subtilis* isolado registrou crescimento elevado nas primeiras 24 horas com expressiva redução de pH neste período; b) que a fermentação do FA com *L. plantarum* isolada apresentou crescimento progressivo, sobretudo em meio MRS, acompanhado de redução gradual do pH, indicando boa adaptação ao substrato; c) que a fermentação do FA com a combinação das cepas revelou comportamento distinto entre os meios de cultivo: em MRS ocorreu crescimento bacteriano intermediário, enquanto em TSA o crescimento observado até 24 horas não se manteve ao final da fermentação. Paralelamente, o pH do tratamento combinado ficou intermediário em 24 horas e elevou-se em 48 horas em comparação ao FA fermentado com *L. plantarum*. Os achados indicam que a fermentação em estado sólido pode ser aplicada para enriquecer microbiologicamente o farelo de arroz, e que o *L. plantarum* isoladamente apresentou resultados mais promissores com microrganismo fermentador desse substrato.

Palavras-chave: Aquicultura; Bactérias; Nutrição animal; Resíduo agrícola

ABSTRACT

This study aims to evaluate the solid-state fermentation of rice bran (RB) using *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus subtilis*, and the combination of both as fermenting agents, focusing on microbial growth (medium-dependent) and pH throughout the process. The experiment was conducted in a completely randomized design with four replicates, composed of the following experimental groups: Control, *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus subtilis*, and *L. plantarum* + *B. subtilis*. The fermentations were carried out at 30 °C for 48 hours, with analyses and sampling at 0, 24, and 48 hours for microbial counting and pH measurement. Microbial counts were performed on Tryptic Soy Agar (TSA) for total heterotrophic bacteria and on Man, Rogosa and Sharpe (MRS) for lactic acid bacteria. The results of microbial growth in TSA and MRS show that, regardless of the fermenting microorganisms used for RB, there was a significant bacterial increase during the first 24 hours, stabilizing over the subsequent 24 hours. The same pattern occurred with pH, which decreased significantly during the first 24 hours, followed by stagnation. Observing microbial performance across sampling times, it is noted that: (a) in TSA, the fermentation of RB with isolated *B. subtilis* showed high growth in the first 24 hours, with a marked pH reduction during this period; (b) the fermentation of RB with isolated *L. plantarum* showed progressive growth, especially in MRS, accompanied by a gradual pH reduction, indicating good adaptation to the substrate; (c) the fermentation of RB with the combination of strains showed distinct behavior between the culture media: in MRS, intermediate bacterial growth occurred, whereas in TSA the growth observed up to 24 hours did not persist until the end of fermentation. Meanwhile, the pH of the combined treatment was intermediate at 24 hours and increased at 48 hours compared to RB fermented with *L. plantarum*. The findings indicate that solid-state fermentation can be applied to microbiologically enrich rice bran, and that isolated *L. plantarum* showed more promising results as a fermenting microorganism for this substrate.

Keywords: Aquaculture; Bacteria; Animal Nutrition; Agricultural Residue

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- desenho das camadas do grão de arroz	19
Figura 2- Esquema dos tratamentos utilizados no experimento	22
Figura 3 - Fotografia do acondicionamento das unidades experimentais.....	23
Figura 4 - Valores de pH.....	25
Figura 5 - Contagem de bactérias heterotróficas totais	26
Figura 6 - Contagem de bactérias ácido-láticas	27

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	16
	DESENVOLVIMENTO	19
	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	19
1	2.1.1 O FARELO DE ARROZ	19
2	2.1.2 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDA	20
2.1	2.1.3 MICRORGANISMOS UTILIZADOS NO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO SÓLIDA 21	
	METODOLOGIA	22
2.2	2.2.1 FERMENTAÇÃO.....	22
	2.2.2 ATIVAÇÃO MICROBIANA	23
	2.2.3 CONTAGEM MICROBIANA.....	24
	2.2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	24
2.3	RESULTADOS.....	24
	2.3.1 AVALIAÇÃO DO pH.....	24
2.4	2.3.2 CRESCIMENTO DAS BACTÉRIAS	25
3	DISCUSSÃO	27
4	CONCLUSÃO	30
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	30

INTRODUÇÃO

1 A aquicultura mundial tem apresentado crescimento expressivo nas últimas décadas, chegando a superar a pesca extrativa como principal fonte de organismos aquáticos destinados ao consumo humano (FAO, 2024). Paralelamente, pode ser observado também um aumento da demanda por proteína animal de origem alternativa, impulsionado pelo crescimento populacional global, o que reforça ainda mais a expansão da atividade aquícola. Com esse crescimento, a necessidade por insumos também se intensificou, sendo a ração um dos principais custos de produção. Em alguns casos chega a 60% do custo total (Appel, 2006), que são influenciados por fatores como o transporte e logística (Ferreira Brabo et al., 2013), sobretudo, quando aplicados à utilização de ingredientes de alto valor monetário e biológico, como a farinha e o óleo de peixe (Arantes et al., 2021).

A proteína é um dos componentes mais importantes na formulação de dietas para organismos aquáticos, e sua exigência varia conforme o hábito alimentar das espécies cultivadas e fase de desenvolvimento, podendo alcançar níveis elevados de inclusão (SENAR, 2019). Ademais, a disponibilidade de energia de qualidade da ração modula o desempenho zootécnico animal, graças ao denominado “efeito economizador de proteína”. Esse efeito ocorre quando uma boa fonte de energia, provenientes de carboidratos ou lipídios, supre as demandas metabólicas, permitindo que a proteína seja direcionada preferencialmente para o metabolismo relacionado ao crescimento dos animais (Carli, 2021). Nesse contexto, um dos principais desafios da indústria de alimentação aquícola é identificar ingredientes alternativos e/ou multifuncionais que sejam economicamente viáveis e nutricionalmente eficientes. Essa necessidade já foi evidenciada em estudos que avaliaram a substituição parcial de ingredientes convencionais em dietas para camarões marinhos (Ricardo Scopel et al., 2011).

O uso de ingredientes vegetais não convencionais, isto é, provenientes, de resíduos agrícolas, tem se destacado como alternativas à formulação de rações para aquicultura. O farelo de arroz (FA) tem-se demonstrado uma ótima fonte de energia a partir de seus carboidratos, podendo atuar no “efeito economizador de proteína” (NRC 2011.; *apud* Ayres, 2021). Trata-se, também, de um subproduto amplamente disponível, resultante do beneficiamento do arroz, cuja produção mundial em 2023 foi de 6,8 milhões de toneladas com o Brasil ocupando a décima segunda posição no ranking e com perspectiva de 14,7% de aumento para 2025 (FAO, 2025). Além disso,

o FA é um ingrediente de baixo custo e baixa demanda, tornando-se apto a sua utilização sem a necessidade de aumento da produção agrícola, contribuindo para a economia circular.

No entanto, a presença de fatores antinutricionais (FAN), como o alto teor de fibra (Hertrampf; Piedad-Pascual, 2000) presença de lipases, inibidores de tripsina, hemaglutinina-lectina e fitatos, limita a disponibilidade nutricional do FA, dificultando a sua assimilação *in natura* pelos organismos aquícolas cultivados e incorporações em dietas (Sharif et al., 2013).

Para contrapor essas limitações, a fermentação tem sido estudada como estratégia para melhorar o valor nutricional e microbiano de ingredientes vegetais. Esta fermentação pode ser conduzida tanto em estado sólido quanto líquido, o que diferencia é a quantidade de água na mistura. Na fermentação em estado sólido (FES), os microrganismos se desenvolvem em substratos com baixa umidade (40–80%), sem presença de água livre, condição que favorece a degradação de compostos, incluindo fatores antinutricionais, e dificulta a proliferação de microrganismos indesejados (Gervais; Marechal; Molin, 1996). Essa técnica já é amplamente utilizada em diversos setores, incluindo a aquicultura, tanto para melhorar a digestibilidade de ingredientes quanto para agregar valor aos resíduos agroindustriais (Hargreaves, 2013).

O sucesso da FES não depende somente da umidade, mas também de fatores como pH, temperatura e disponibilidade de nutrientes no substrato que influenciam diretamente a eficiência do processo na qualidade do produto fermentado (Farinas et al., 2014). Outro aspecto crucial é a seleção criteriosa dos microrganismos utilizados já que estes devem resistir e crescer com quantidade limitada de água. Embora o uso isolado de bactérias ainda seja pouco explorado, o uso de espécies como *Bacillus subtilis* e *Lactobacillus plantarum* apesar de possuírem poucos trabalhos têm mostrado resultados promissores (Vieira et al., 2025; Moon; Chang, 2021).

Bacillus subtilis é uma bactéria Gram-positiva, formadora de esporos. Sua capacidade de crescer em uma ampla variedade de substratos e condições ambientais adversas, permite a sua incorporação em processos fermentativos (Kovács, 2019), além disso a produção de metabólitos secundários ajuda no melhor aproveitamento do substrato durante a sua degradação (Embrapa, 2020).

Já *Lactobacillus plantarum* é uma bactéria ácido-lática (BAL) gram-positiva, não formadora de esporos, catalase-negativa e de metabolismo fermentativo, tendo como principal produto a produção de ácido lático. Essas características lhe conferem tolerância ao ambiente ácido e capacidade de inibir microrganismos indesejáveis, o que reforça seu potencial probiótico (Holzapfel et al., 2001 apud Axelsson et al., 1998).

Considerando a ampla disponibilidade do farelo de arroz e seu potencial como ingrediente energético na formulação de dietas aquícolas, torna-se fundamental superar as limitações associadas à presença de fatores antinutricionais, que restringem seu uso em maiores proporções. A fermentação em estado sólido desponta como uma alternativa biotecnológica capaz de melhorar a qualidade nutricional desse subproduto, agregando valor e favorecendo a economia circular.

Nesse contexto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a fermentação em estado sólido do farelo de arroz utilizando *Bacillus subtilis* e *Lactobacillus plantarum* separadamente e em conjunto como agentes fermentadores, visando enriquecimento microbiano e redução pH contribuindo para sua viabilidade como ingrediente na alimentação de organismos aquáticos. Além disso, a redução do pH pode ainda aumentar o tempo de prateleira e melhorar a digestibilidade desse ingrediente.

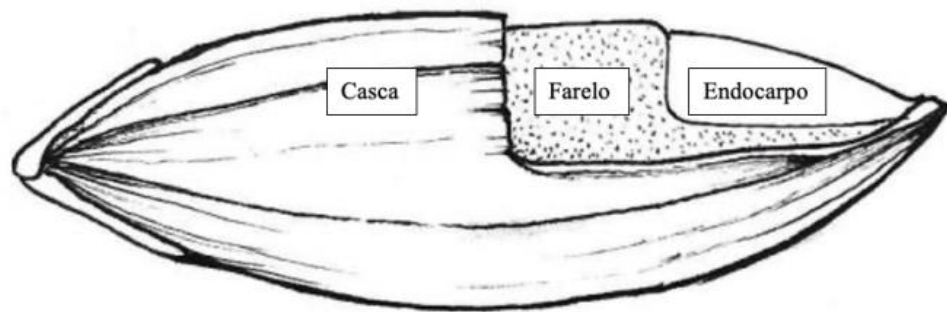
DESENVOLVIMENTO

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1.1 O FARELO DE ARROZ

O farelo de arroz (FA) tem ganhado notoriedade por ser um subproduto abundante visto que o arroz é um dos grãos mais cultivados no mundo, e o Brasil ocupa a nona posição no ranking global (Pereira et al.; 2005 *apud* Moura; Landau, 2020). O grão de arroz é composto por três camadas principais: a casca na porção externa, o farelo como camada intermediária e o endocarpo na região interna, conforme ilustrado na Figura 1. Além de sua disponibilidade, o FA apresenta diversas aplicações, incluindo seu uso em dietas para animais (Bonato et al.; 2004 *apud* Cordeiro, 2015).

Figura 1- desenho das camadas do grão de arroz



Fonte: (Ayres, 2021a)

Sobre a utilização do FA com substrato para fermentação, Huervana et al. (2024) avaliaram a inclusão do farelo de arroz fermentado pelo fungo *T. harzianum* por 96h a 30 °C na dieta do camarão *Penaeus monodon* e observaram um aumento significativo nos teores de proteína bruta (169,2%) e de lipídios (40,3%) no subproduto após a fermentação. Além disso, verificaram-se elevações nas concentrações de aminoácidos, incluindo todos os essenciais para o metabolismo do camarão, indicando uma melhora expressiva no valor nutricional do farelo de arroz fermentado.

Em termos nutricionais, o FA contém, por 100g, cerca de 15,64g de proteína, 26,67g de lipídeos e 11,61g de cinzas (Oliveira et al. 2021; Embrapa, 2004). No entanto, grande parte desses nutrientes não é totalmente assimilada pelos animais devido à presença de fatores antinutricionais (FAN). Esses fatores antinutricionais são

conhecidos por serem compostos presentes em uma ampla variedade de vegetais que ao serem consumidos geram uma série de prejuízos à saúde, em animais cultivados na aquicultura podemos citar a digestibilidade e a absorção de seus nutrientes (Griffiths et al. 1998 apud Santos 2006). Entre os principais FAN's presentes no farelo de arroz, destacam-se o alto teor de fibra (Hertrampf; Piedad-Pascual, 2000) presença de lipases, inibidores de tripsina, hemaglutinina-lectina e fitatos, limita a disponibilidade nutricional do FA, dificultando a sua assimilação pelos organismos cultivados e incorporações em dietas (Sharif et al., 2013). Diante desse cenário, a fermentação em estado sólido surge como uma estratégia promissora para mitigar os efeitos desses FANs.

2.1.2 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDA

Visando superar essa limitação, têm sido estudadas técnicas de processamento que aumentem a biodisponibilidade dos nutrientes. Dentre elas, destaca-se a fermentação em estado sólido (FES), um processo que engloba o aumento da biopreservação, bioenriquecimento e produção de enzimas que degradam os fatores antinutricionais de um alimento tornando-os aptos a serem incorporados em formulações de ração por exemplo (Tamang, 1998).

A FES ocorre em condições de baixa umidade e exige controle de variáveis como temperatura, pH, tempo de fermentação e o tipo de microrganismo utilizado (Farinas et al., 2014)

As temperaturas empregadas em trabalhos com fermentação em estado sólido variam muito pelo microrganismo empregado no processo, porém, normalmente se utiliza como limite 50°C (Krishna, 2008), mas facilmente são encontrados trabalhos com fermentação sólida em 30°C (Yadav, 1988).

Outro fator fundamental em qualquer processo fermentativo é o pH que pode facilmente sofrer alteração pela secreção ou assimilação de ácidos orgânicos (Krishna, 2008). Apesar dessas variações, Oliveira (2010) identificou dois cenários ao realizar uma FES com bactérias, o primeiro é que em pH ácido de 5,0 foi constatado uma boa produção de amilase em temperatura de 25 a 35°C, já em pH mais alcalino (8,0) foi observada uma significativa atividade enzimática mas apenas em 42°C, ou seja, um pH suficiente para uma boa FES varia entre 5,0 e 8,0 a depender do objetivo da fermentação sólida.

Quanto ao tempo de fermentação este está diretamente ligado ao declínio da disponibilidade de nutrientes presentes no meio o que resulta diretamente na atividade

microbiana (Dos Santos et al., 2013). Swain et al. (2009) observaram que para a bactéria *Bacillus subtilis* o tempo de 144 horas (6 dias) foi o melhor durante o estudo, ou seja, se o meio for propício para um bom crescimento das bactérias, a fermentação pode durar em torno de 144 horas.

A umidade é um fator crucial na fermentação em estado sólido, pois o processo deve ocorrer com quantidade limitada de água livre. Para isso, recomenda-se um teor de umidade entre 40% e 80% (Gervais; Marechal; Molin, 1996). Esse nível é importante porque a água atua como solvente, facilitando as reações bioquímicas e influencia diretamente a estrutura e o funcionamento dos microrganismos envolvidos na fermentação.

2.1.3 MICRORGANISMOS UTILIZADOS NO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO SÓLIDA

Bactérias como *Bacillus subtilis*, que possui inúmeros metabólitos secundários (Embrapa, 2020) e *Lactobacillus plantarum*, amplamente usada em dietas para tilápias e camarões marinhos (*Penaeus vannamei*) com efeitos positivos na microbiota intestinal, na resposta imunológica, e até na sobrevivência (Jatobá et al. 2015), têm sido utilizadas em processos fermentativos (Vieira, 2010). Embora seja comum o uso de combinações microbianas (bactérias e fungos), estudos demonstram que a fermentação do FA apenas com essas bactérias pode reduzir significativamente os FANs, como o ácido fítico, indicando sua eficácia na melhoria da qualidade nutricional do subproduto (Moon et al. 2021).

O estudo conduzido por Adeyemo e Onilude (2013) avaliou a redução dos fatores antinutricionais presentes no farelo de soja a partir da fermentação sólida com a *Lactobacillus plantarum*. Após a fermentação, foram constatadas reduções significativas das FAN's como o phytato que saiu de 1,16 para 0,04 mg/g, a tripsina e protease que reduziram de 1,20 para 0,010 mg/g e 1,2 para 0,020 mg/g respectivamente.

Já Almanaa et al. (2020a) conduziram um experimento onde testaram a fermentação sólida com a *Bacillus subtilis* em diferentes resíduos agrícolas como substratos (incluindo o farelo de arroz), com o objetivo de avaliar a produção de amilase. No estudo, o farelo de arroz ficou abaixo apenas do farelo de trigo como substrato de maior atividade da enzima, demonstrando assim a boa relação de *B. subtilis* e FA na fermentação sólida.

METODOLOGIA

O trabalho foi realizado no laboratório de Camarões Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina (LCM-UFSC). O farelo de arroz utilizado no experimento foi adquirido na empresa Volkmann Alimentos localizada no Rio Grande do Sul, Brasil.

2.2 2.2.1 FERMENTAÇÃO

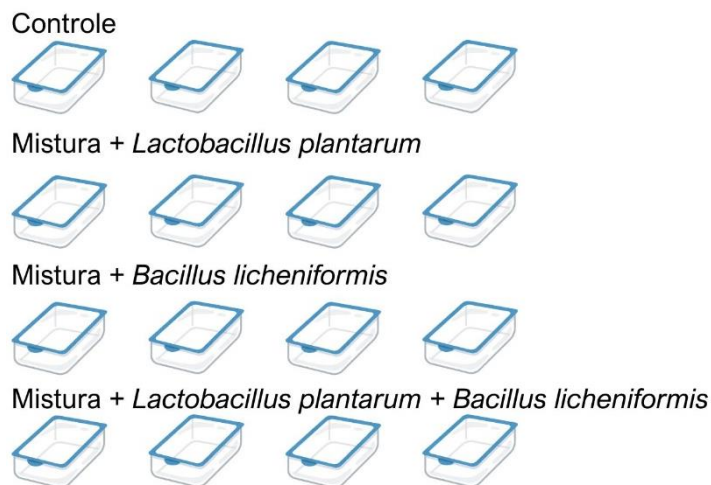
Todos os materiais necessários foram devidamente autoclavados antes dos procedimentos, a fim de se evitar interferências externas durante o processo de fermentação.

A fermentação foi conduzida em meio sólido, na proporção 1,5:1 (água: farelo de arroz) e microrganismos inoculado na concentração de 10^8 unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC mL⁻¹), a temperatura foi de 30°C e conduzida por 48 horas com análises de pH por meio de um pHmetro digital de bancada e contagem das UFC nos períodos de 0h, 24h e 48h.

O desenho experimental foi inteiramente casualizado, conduzido em quadruplicata e contendo quatro grupos experimentais, totalizando dezesseis unidades experimentais (UE). Os grupos foram (Figura 2):

- Fermentação sólida selvagem do farelo de arroz (controle);
- Fermentação sólida do farelo de arroz por *Lactobacillus plantarum*;
- Fermentação sólida do farelo de arroz por *Bacillus subtilis*;
- Fermentação sólida do farelo de arroz por *L. plantarum* e *B. subtilis* conjuntamente.

Figura 2- Esquema dos tratamentos utilizados no experimento



Fonte: Autor

As UEs utilizadas foram recipientes plásticos hermeticamente fechados com dimensões de 253 × 174 × 122 mm (3,5 L), nos quais foram acondicionadas as misturas contendo água, farelo de arroz e as bactérias, nas proporções de 1,5:1:10⁸ UFC mL⁻¹ (isto é, 750 mL: 500 g: UFC mL⁻¹g, respectivamente). Os recipientes foram mantidos em estufa a 30 °C por 48 horas para o processo de fermentação (Figura 3).

Figura 3 - Fotografia do acondicionamento das unidades experimentais na estufa.



Fonte: Autor

2.2.2 ATIVAÇÃO MICROBIANA

Inicialmente, os inóculos foram ativados em meios de cultura líquidos: Man Rogosa Sharpe (MRS, Himedia®) para *L. plantarum* e Brain Heart Infusion (BHI) para *B. subtilis*. Para confirmar a pureza das culturas bacterianas, estas foram semeadas, respectivamente, em meio sólido MRS e ágar triptona de soja (TSA). Após a confirmação da pureza, as bactérias foram cultivadas nos respectivos meios líquidos até atingirem o volume necessário para a inoculação no farelo de arroz dos grupos experimentais.

Antes da inoculação, os meios de cultura foram removidos por centrifugação a 4.000 g, a 4°C, durante 5 minutos. As células microbianas resultantes foram ressuspensas em solução salina estéril (SSE) e a concentração ajustada para 10⁸ UFC mL⁻¹.

2.2.3 CONTAGEM MICROBIANA

A contagem microbiológica foi realizada em dois meios de cultura: ágar triptona de soja (TSA), utilizado para a quantificação de bactérias heterotróficas totais, e de Man Rogosa Sharpe (MRS), utilizado para a contagem de bactérias ácido-láticas. As amostras foram submetidas a diluições seriadas decimais preparadas em solução salina estéril (SSE). Para cada diluição, utilizou-se 1 mL da amostra.

No tempo inicial (T0), as amostras de cada tratamento foram diluídas de 10^{-1} a 10^{-5} , sendo plaqueadas todas essas diluições. Nos tempos 24 h (T24) e 48 h (T48), as amostras foram diluídas de 10^{-1} a 10^{-7} , porém somente as diluições de 10^{-3} a 10^{-7} foram plaqueadas.

Após a semeadura, as placas foram incubadas em estufa a 30°C. As placas de TSA foram avaliadas após 24 horas de incubação, enquanto as placas de MRS foram avaliadas após 48 horas, devido ao crescimento mais lento das bactérias ácido-láticas. Para a obtenção das contagens, foram consideradas apenas as placas que continham entre 30 e 300 unidades formadoras de colônias (UFC). Os valores obtidos foram calculados segundo a fórmula:

$$\text{UFC ml}^{-1} = \frac{\text{Valor contado} \times \text{Diluição}}{0,1}$$

2.2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

2.3 Todos os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk e Levene para verificação de normalidade e homocedasticidade respectivamente. Os dados que não apresentaram homogeneidade de variância foram transformados em $\log_{10}(x+1)$ e se mesmo assim os pressupostos de ANOVA com medidas repetidas não foram garantidos. Os dados foram submetidos aos testes não paramétricos de Friedman (medidas repetidas) seguido de Kruskal-Wallis com múltiplas comparações independentes, quando verificadas diferenças significativas foram observadas. Todos os testes foram realizados com valor de significância de 5% com auxílio do software Statistica 10.0.

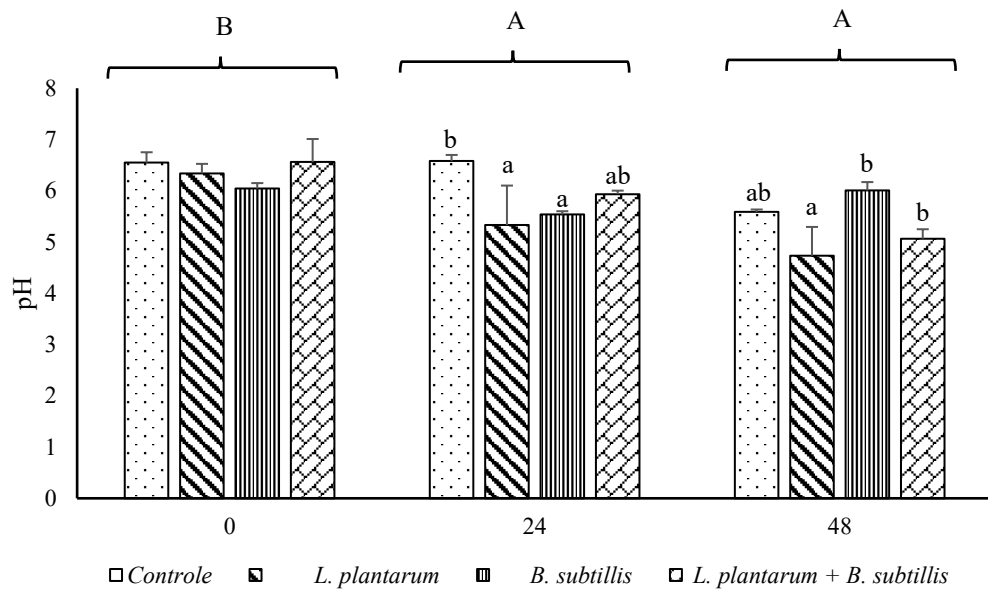
RESULTADOS

2.3.1 AVALIAÇÃO DO pH

Os valores de pH apresentaram variação significativa ao longo do tempo ($p < 0,05$). Na avaliação inicial (0h), os tratamentos não apresentaram diferenças

estatísticas entre si, mantendo valores semelhantes de pH ($p > 0,05$). No tempo de 24h, observaram-se redução significativa do pH no FA fermentado com *L. plantarum* e *B.subtilis* ($p < 0,05$) separadamente em razão ao controle (fermentação selvagem). Após 48 horas a fermentação do FA com *L. plantarum* continuou reduzindo o pH em comparação ao FA fermentado com *B.subtilis* ($p < 0,05$) e *L. plantarum* + *B. subtilis* (b) ($p < 0,05$) (Figura 4).

Figura 4 - Valores de pH do farelo de arroz fermentado selvagem (controle), com *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus subtilis* e a combinação *L. plantarum* + *B. subtilis* nos tempos 0, 24 e 48.



*Letras maiúsculas acima dos grupos indicam diferenças significativas entre os tempos de fermentação. Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos dentro de cada tempo, enquanto as letras ($p < 0,05$).

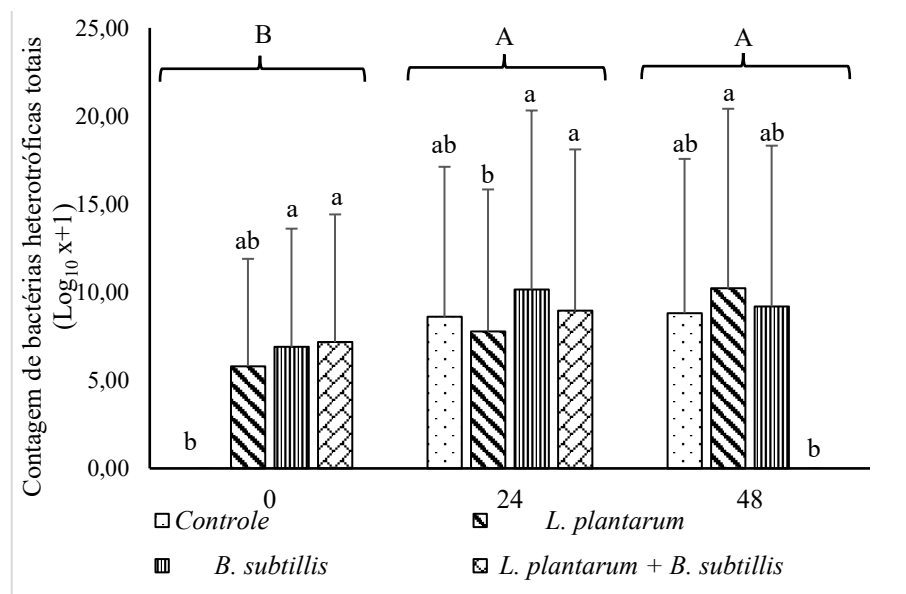
2.3.2 CRESCIMENTO DAS BACTÉRIAS

A contagem de bactérias heterotróficas totais variou significativamente entre os tempos avaliados ($p = 0,002$), tendo um incremento em 24h seguido de estabilização. No tempo 0h, houve crescimento bacteriano significativo ($p = 0,0119$) no FA fermentado com *B. subtilis* separadamente e *L. plantarum* + *B. subtilis* em comparação ao grupo controle (fermentação selvagem). Em 24h o FA fermentado com apenas *B. subtilis* continuou expressando maior crescimento microbiano só que agora

em relação ao *L. plantarum*. No enteando em 48h, *L. plantarum* (a) apresentou valor significativamente maior que *L. plantarum* + *B. subtilis* (Figura 5).

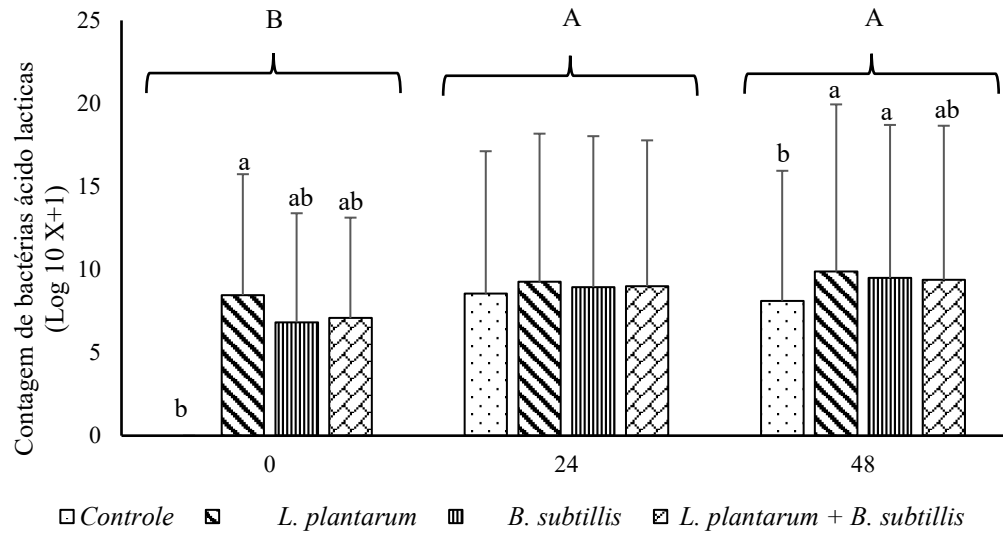
A contagem de bactérias ácido-láticas variou significativamente entre os tempos avaliados ($p < 0,001$). No tempo 0h a fermentação selvagem do FA (Controle) apresentou concentração microbiana significativamente menores que *L. plantarum*. No tempo 24h, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais ($p = 0,1029$). Já 48h a fermentação do FA com *L. plantarum* continuo exibindo maior crescimento microbiano em comparação ao controle (Figura 6).

Figura 5 - Contagem de bactérias heterotróficas totais ($\text{Log}_{10} \text{UFC g}^{-1}$) do farelo de arroz fermentado selvagem (controle), com *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus subtilis* e a combinação *L. plantarum* + *B. subtilis* nos tempos 0, 24 e 48. *



* Os dados são apresentados em média \pm desvio-padrão. Letras maiúsculas acima dos grupos indicam diferenças entre os tempos de fermentação. Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos dentro de cada tempo, enquanto as ($p < 0,05$).

Figura 6 - Contagem de bactérias ácido-láticas ($\text{Log}_{10} \text{UFC g}^{-1}$) no farelo de arroz fermentado selvagem (controle), com *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus subtilis* e a combinação *L. plantarum* + *B. subtilis* nos tempos 0, 24 e 48 horas



* Os dados são apresentados em média \pm desvio-padrão. Letras maiúsculas acima dos grupos indicam diferenças entre os tempos de fermentação. Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os tratamentos dentro de cada tempo, enquanto as ($p < 0,05$).

2.4

DISCUSSÃO

A redução do pH ao longo do processo fermentativo é um importante indicativo de sucesso da fermentação, uma vez que, as bactérias produzem muitos ácidos para degradarem o substrato. Dentre os microrganismos testados o *L. plantarum* foi o que promoveu maior redução do pH do FA em 48h. Além disso, os resultados desse trabalho estão em consonância ao de Vieira et al. (2025), onde a fermentação do FA com um combo microbiano que incluía *L. plantarum* também se observou diminuição do pH e que o FA fermentado apresentou qualidade nutricional adequada para a formulação de dietas em aquicultura. O mesmo autor registrou valores finais de pH (específico para *L. plantarum*) entre 4 e 5, semelhante ao observado neste trabalho. No entanto, o pH inicial do presente estudo foi superior a 6, enquanto na pesquisa de (Vieira, 2025 o valor no tempo 0 foi inferior a esse mesmo valor.

Em relação a essa faixa de pH, (Moon; Chang, 2021) verificou que, na fermentação sólida do FA com *Lactobacillus plantarum*, valores entre 6 e 7 favoreceram o maior crescimento celular e a atividade antimicrobiana. Por esse

motivo, o autor optou por manter o pH da fermentação em torno de 6,0, evitando sua queda durante o processo.

Quanto ao crescimento microbiano em MRS, o estudo de Vieira et al. (2025) demonstrou que a *L. plantarum* alcançou contagens próximas a $9 \log \text{CFU g}^{-1}$ já nas primeiras 24 horas de fermentação, mantendo esse patamar até 48 horas. Os autores destacam que *L. plantarum* apresentou um dos melhores desempenhos dentre as cepas avaliadas, sendo selecionada devido à sua elevada taxa de crescimento e capacidade fermentativa. Assim, enquanto no artigo o crescimento da espécie foi mais pronunciado e consistente, no presente trabalho o comportamento observado foi mais discreto, tanto no meio heterotrófico em que variou na faixa de 7 a 8 CFU g^{-1} quanto no meio seletivo que se mantiveram na faixa de 7 a 9 $\log \text{CFU g}^{-1}$. Uma possível explicação para essa diferença é a variação na origem e composição do farelo de arroz utilizado nos dois estudos.

Os resultados obtidos para o tratamento com *B. subtilis* mostraram uma redução moderada do pH ao longo do experimento, menor do que aquela observada no tratamento com a *L. plantarum*. Esse comportamento está de acordo com estudos de Almana et al. (2020) o maior desempenho metabólico desta bactéria foi em condições de pH alcalino, com máxima produção enzimática em torno de pH 9,0, indicando que a bactéria não possui forte tendência à acidificação do meio. Um resultado semelhante também foi observado por Saxena; Singh, (2011) que pode constatar uma faixa de pH entre 5,0 a 9,0 (do início ao fim do experimento) em que o pH 6,0 foi onde se obteve a maior produção de amilase ao fermentar o FA com a *B. licheniformis* e *B. subtilis*. Assim, o fato de *Bacillus sp.* atingir elevada produção enzimática em FA em uma faixa de pH neutra reforça os achados deste trabalho, no qual o tratamento contendo *B. subtilis* apresentou menor redução do pH ao longo do tempo quando comparado aos tratamentos contendo *L. plantarum*.

No presente estudo o crescimento do tratamento inoculado apenas com a bactéria *B. subtilis* apresentou crescimento elevado em 24h de fermentação. Em TSA foi observada uma média de $10,16 \log \text{CFU g}^{-1}$, enquanto em meio MRS que não é otimizado para o crescimento de *B. subtilis*, a média foi de $8,95 \log \text{CFU g}^{-1}$. Ao comparar esses resultados com o artigo de Abdel-Tawwab et al. (2020), observa-se que o desempenho do *B. subtilis* no presente estudo foi substancialmente superior. Abdel-Tawwab et al. (2020), constatou uma contagem final de *B. subtilis* no farelo de arroz fermentado após 24 horas de aproximadamente $7,30 \log \text{CFU g}^{-1}$, valor

consideravelmente inferior aos registrados neste experimento, tanto no meio TSA quanto no meio MRS. É importante ressaltar que Abdel-Tawwab et al. (2020) não tinha como objetivo avaliar parâmetros fermentativos, no entanto, os autores reportaram a contagem de *B. subtilis* no farelo de arroz fermentado após 24 h, permitindo uma comparação direta com os valores obtidos no presente estudo.

O tratamento contendo a co-cultura de *L. plantarum* e *B. subtilis* apresentou uma redução de pH nas primeiras 24 horas de fermentação. Esse comportamento é compatível com o observado por Le et al. (2023), que relataram quedas significativas de pH entre 9 e 24 horas de cultivo. Segundo os autores, esse efeito está associado à atuação de *B. subtilis*, que auxilia *L. plantarum* por meio da liberação de ácidos orgânicos e da modificação inicial do ambiente fermentativo, tornando-o mais favorável à atividade fermentativa da bactéria láctica. Essa interação pode explicar a redução de pH observada nas primeiras 24 horas no presente estudo.

Este mesmo comportamento é consistente em Su et al. (2024), que reportaram que a co-inoculação dessas duas bactérias aumentou significativamente a produção de ácido láctico, resultando em valores de pH abaixo de 4,0 logo no terceiro dia (vale ressaltar que esta fermentação durou 45 dias). No estudo, a presença simultânea de *L. plantarum* e *B. subtilis* elevou a abundância relativa de *Lactobacillus* e intensificou a fermentação láctica, indicando um efeito sinérgico entre as espécies. Assim, redução de pH deste tratamento nas primeiras 24h pode estar associada a esse mesmo efeito sinérgico, no qual *B. subtilis* favorece a disponibilidade de carboidratos fermentáveis e estimula o desempenho de *L. plantarum*, resultando em maior produção de ácido orgânico e consequente redução do pH.

O crescimento observado neste tratamento mencionado anteriormente, apresentou comportamentos distintos entre as contagens realizadas em TSA e MRS. Enquanto nenhuma colônia foi detectada no TSA após 48h, no MRS verificou-se um crescimento expressivo. Comparando com Le et al. (2023), os autores relatam que a co-fermentação de *L. plantarum* com *B. subtilis* estimula o crescimento de *L. plantarum* e aumenta a produção de ácido láctico, com aumento estatisticamente significativo do crescimento de *L. plantarum* especialmente aos 48h. Dessa forma, o incremento observado nas contagens em MRS de 7,08 para 9,38 log CFU/g em 48h está em concordância com o comportamento descrito pelos autores, isto é, estímulo do crescimento das bactérias ácido-lácticas em co-cultura. Esta observação também foi constatada por Su et al. (2024) que relatou um aumento na produção de ácido láctico

e uma melhora nos parâmetros de fermentação relacionados à atividade das bactérias lácticas a partir da combinação das duas bactérias em uma mesma fermentação.

CONCLUSÃO

3 Dentre os microrganismos avaliados para a fermentação sólida do FA a conduzida pelo *L. plantarum* isolada apresentou crescimento consistente e redução progressiva do pH ao longo das 48 horas, confirmando sua capacidade fermentativa do substrato. *B. subtilis* isolado apresentou crescimento elevado nas primeiras 24 horas, acompanhado de queda moderada do pH, atendendo parcialmente ao esperado para sua atividade fermentativa. Já o tratamento combinado resultou em um aumento moderado das populações, sem detecção de crescimento em meio heterotrófico às 48 horas, acompanhado por uma discreta redução do pH.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

4 Durante a realização deste estudo, algumas limitações e desafios foram identificados. A principal dificuldade esteve relacionada à obtenção do farelo de arroz, devido à baixa disponibilidade comercial do produto, o que ocasionou atraso no início do experimento. A pouca disponibilidade de outros trabalhos que tenham testado principalmente a co-cultura também foi uma dificuldade encontrada.

Apesar disso, a pesquisa gerou insights importantes, especialmente quanto à influência direta da composição do farelo no desempenho das bactérias avaliadas e a relação das duas bactérias juntas durante a fermentação.

Recomenda-se, para estudos futuros, avaliar períodos fermentativos superiores a 48 horas, testar diferentes proporções de inoculantes e investigar o impacto dessas fermentações nos valores nutricionais finais do farelo, bem como sua aplicação direta na alimentação de organismos aquícolas.

REFERÊNCIAS

ABDEL-TAWWAB, Mohsen *et al.* Effects of *Bacillus subtilis*-fermented rice bran on water quality, performance, antioxidants/oxidants, and immunity biomarkers of White leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) reared at different salinities with zero water exchange. *Journal of Applied Aquaculture*, v. 34, n. 2, p. 332–357, 14 dez. 2020.

ADEYEMO, S. M.; ONILUDE, A. A. Enzymatic Reduction of Anti-nutritional Factors in Fermenting Soybeans by *Lactobacillus plantarum* Isolates from Fermenting Cereals *Nigerian Food Journal Official Journal of Nigerian Institute of Food Science and Technology* www.nifst.org NIFOJ. [S.l.: S.n.]. Disponível em: <www.nifst.org>.

ALESSANDRA TEIXEIRA DOS SANTOS, Mônica. Efeito do cozimento sobre alguns fatores antinutricionais em folhas de brócoli, couve-flor e cove. [S.l.: S.n.].

ALMANAA, Taghreed N. *et al.* Solid state fermentation of amylase production from *Bacillus subtilis* D19 using agro-residues. *Journal of King Saud University - Science*, v. 32, n. 2, p. 1555–1561, 1 mar. 2020a.

APPEL, Henrique Boeira. Análise do custo de produção em cultivos de tilápias alimentadas com ração comercial no Litoral Norte de Santa Catarina. *Agropec. Catarin.*, v. 19, p. 43–45, nov. 2006.

ARANTES, Vânia Maria *et al.* AGREGAÇÃO DE VALOR À NUTRIÇÃO A PARTIR DO USO DE FARINHA DE INSETOS: PEIXES. *In: Zootecnia: pesquisa e práticas contemporâneas - Volume 1.* [S.l.]: Editora Científica Digital, 2021. p. 120–143.

CARLI, Gabriela Castellani. METABOLISMO DE CARBOIDRATOS E EFEITO POUPADOR DE PROTEÍNA PARA O TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*). Jaboticabal: [S.n.].

CORDEIRO, Joel. Farelo de arroz integral em dietas para frango de corte. Florianópolis: [S.n.].

DE OLIVEIRA VIEIRA, Antonio *et al.* Assembly of a synthetic microbial community to ferment rice (*Oryza sativa*) bran for aquaculture feedstuff. *International Microbiology*, 28 fev. 2025.

DOS SANTOS, T. C. *et al.* ASPERGELLUS NIGER COMO PRODUTOR DE ENZIMAS CELULOLITICAS A PARTIR FARELO DE CACAU (THEOBROMA CACAO) *Arq. Inst. Biol. São Paulo*: [S.n.].

EMBRAPA. Manual de produção e controle de qualidade de produtos biológicos à base de bactérias do gênero *Bacillus* para uso na agricultura. p. 02–47, maio 2020.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2024 - Blue transformation in action. [S.l.]: FAO, 2024.

FAO. Food Outlook - Biannual report on global food markets. p. 01–152, jun. 2025.

FARINAS, Cristiane Sanchez *et al.* Desenvolvimentos em fermentação em estado sólido para produção de enzimas de interesse agroindustrial. Embrapa, p. 211–241, 2014.

FERREIRA BRABO, Marcos *et al.* Viabilidade econômica da piscicultura em tanques-rede no reservatório da usina hidrelétrica de tucuruí, estado do Pará. São Paulo: [S.n.].

GERVAIS, P.; MARECHAL, P. A.; MOLIN, P. Water Relations of Solid State Fermentation. Journal of Scientific & Industrial Research, v. 55, p. 343–357, jun. 1996.

HARGREAVES, Paulo liboshi. Produção de etanol a partir de *Kappaphycus alvarezii* - Biocombustível de terceira geração. Rio de Janeiro: [S.n.].

HERTRAMPF, Joachim W.; PIEDAD-PASCUAL, Felicitas. Handbook on ingredients for aquaculture feeds. [S.l.]: Kluwer Academic Publishers, 2000.

HOLZAPFEL, Wilhelm H. *et al.* Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. American Society for Clinical Nutrition, p. 365–371, 2001.

HUERVANA, Fredson H.; TRAI FALGAR, Rex Ferdinand M.; DIONELA, Cleresa S. Solid-state fermentation converts rice bran into a high-protein feed ingredient for *Penaeus monodon*. Frontiers in Marine Science, v. 11, 2024.

JATOBÁ, Adolfo; MOURIÑO, José Luís Pedreira. *Lactobacillus plantarum* effect on intestinal tract of *Oreochromis niloticus* fingerlings. Ciencia Animal Brasileira, v. 16, n. 1, p. 45–53, jan. 2015.

KOVÁCS, Ákos T. *Bacillus subtilis*. Trends in Microbiology Elsevier Ltd, , 1 ago. 2019. KRISHNA, Chundakkadu. Solid-state fermentation systems - An overview. Critical Reviews in Biotechnology, 10 out. 2008.

LE, Tram Anh Ngoc; LEE, Jaslyn Jie Lin; CHEN, Wei Ning. Stimulation of lactic acid production and *Lactobacillus plantarum* growth in the coculture with *Bacillus subtilis* using jackfruit seed starch. Journal of Functional Foods, p. 01–09, 2 abr. 2023a.

LE, Tram Anh Ngoc; LEE, Jaslyn Jie Lin; CHEN, Wei Ning. Stimulation of lactic acid production and *Lactobacillus plantarum* growth in the coculture with *Bacillus subtilis* using jackfruit seed starch. Journal of Functional Foods, p. 01–09, 2 abr. 2023b.

MOON, Song Hee; CHANG, Hae Choon. Rice bran fermentation using *Lactobacillus plantarum* as a starter and the potential of the fermented rice bran as a functional food. Foods, v. 10, n. 5, 1 maio 2021.

MOURA, Larissa; LANDAU, Elena Charlotte. Evolução da Produção de Arroz (*Oryza* spp., Poaceae). Brasília: [S.n.].

OLIVEIRA, Arlem Nascimento de; FLOR, Nathália Siqueira; OLIVEIRA, Luiz Antonio de. Influência do pH e temperatura sobre a atividade amilolítica de rizóbios isolados de solos da Amazônia. Acta amazônica, v. 40, p. 401-404, 2010.

RICARDO SCOPEL, Bruno *et al.* Substituição da farinha de peixe em dietas para camarões marinhos cultivados em sistema bioflocos. Brasília: [S.n.].

SAXENA, Rajshree; SINGH, Rajni. AMYLASE PRODUCTION BY SOLID-STATE FERMENTATION OF AGRO-INDUSTRIAL WASTES USING BACILLUS SP. Brazilian Journal of Microbiology, p. 01–09, 6 jul. 2011.

SENAR. Piscicultura: alimentação. 263. ed. Brasília: Serviço Nacional de Aprendizagem Rural, 2019.

SHARIF, Mian Kamran *et al.* Rice Bran: A Novel Functional Ingredient. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v. 54, p. 807–816, 6 jul. 2013.

SU, Jiaqi *et al.* The Effects of *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus subtilis*, a Lignocellulolytic Enzyme System, and Their Combination on the Fermentation Profiles, Chemical Composition, Bacterial Community, and In Situ Rumen Digestion of Fresh Waxy Corn Stalk Silage. Animals, v. 14, p. 01–17, 28 nov. 2024.

SWAIN, Manas R.; KAR, Shaktimay; RAY, Ramesh C. Exo-polygalacturonase production by *Bacillus subtilis* CM5 in solid state fermentation using cassava bagasse. Brazilian Journal of Microbiology, v. 40, p. 636–648, 3 maio 2009.

TAMANG, J. ~. Role of Microorganisms in Traditional Fermented Foods. [S.l.: S.n.]. Utilização do farelo de arroz. . Santo Antônio de Goiás: [S.n.]. Disponível em: <www.cnpaf.embrapa.br>.

VIEIRA, Felipe do Nascimento *et al.* Seleção e utilização de bactérias probióticas na carcinicultura marinha. 2010. 133 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia de Aquicultura, Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

YADAV, J. S. SSF of wheat straw with alcaliphilic *Coprinus*. Biotechnology and Bioengineering, v. 31, n. 5, p. 414–417, 10 fev. 1988.