



INPI
INSTITUTO
NACIONAL
DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL
Assinado
Digitalmente

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA, COMÉRCIO E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR 102020009375-4

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: BR 102020009375-4

(22) Data do Depósito: 12/05/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 23/11/2021

(51) Classificação Internacional: C12N 1/20; C12N 1/36; C05F 11/08; C05F 11/10; C12R 1/07; C07D 209/04.

(54) Título: PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE BIO-INOCULANTE E ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO E COMPOSIÇÃO PROMOTORA DE CRESCIMENTO VEGETAL

(73) Titular: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA, Instituição de Ensino e Pesquisa. CGC/CPF: 75095679000149. Endereço: RUA JOÃO NEGRÃO, 280 2º ANDAR, CURITIBA, PR, BRASIL(BR), 80010-200, Brasileira

(72) Inventor: CARLOS RICARDO SOCCOL; GISELA MANUELA DE FRANÇA BETTENCOURT; SUSAN GRACE KARP.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 12/05/2020, observadas as condições legais

Expedida em: 21/11/2023

Assinado digitalmente por:

Alexandre Dantas Rodrigues

Diretor de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados



PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE BIO-INOCULANTE E ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO E COMPOSIÇÃO PROMOTORA DE CRESCIMENTO VEGETAL

Campo da Invenção

[001]. Esta invenção está inserida na área da agricultura, em particular no campo da produção de bio-inoculantes, para aplicação no crescimento de plantas. A presente invenção apresenta um processo para a produção de um bio-inoculante acrescido de regulador vegetal, da classe das auxinas, utilizando um meio de cultura de baixo custo, com base em resíduos agroindustriais disponíveis como a milhocina, e o subproduto do processo de produção de biodiesel, o glicerol, como fontes de nitrogênio e carbono para o crescimento microbiano. Mais especificamente, a presente invenção refere-se a um processo para a produção de bio-inoculantes e um regulador de crescimento vegetal da classe das auxinas, o ácido indol-3-acético, a partir de *Paenibacillus polymyxa*, e à composição resultante que é promotora de crescimento vegetal.

Fundamentos da Invenção e Estado da Técnica

[002]. O cultivo vegetal é uma atividade de grande importância econômica no Brasil. Culturas como soja, milho e feijão representam grande parte da produção agrícola nacional. A falta de nutrientes como N e P limita o crescimento das plantas e o seu rendimento. Nesse sentido, são aplicados fertilizantes químicos que trazem problemas ambientais graves como o desequilíbrio de nutrientes, a infertilidade do solo e a poluição de lençóis freáticos. Atualmente, busca-se por tecnologias que

proporcionem o mesmo ganho na produtividade agrícola, mas com menor impacto ambiental.

[003]. A aplicação das bactérias promotoras de crescimento no cultivo de plantas, como bio-inoculantes, visa reduzir a aplicação de fertilizantes químicos, visto que essas são capazes de fornecer elementos essenciais para as plantas, como o fósforo através da solubilização de fosfato insolúvel, e nitrogênio pela fixação simbiótica ou assimbiótica de N_2 .

[004]. Bactérias promotoras de crescimento vegetal, as quais podem ser rizobactérias ou bactérias endofíticas, têm a capacidade de promover o crescimento da planta por métodos diretos ou indiretos, como a solubilização de fosfato, fixação de nitrogênio e produção de reguladores de crescimento, facilitando assim a disponibilização e absorção de nutrientes, e ao mesmo tempo produzindo antibióticos ou outros compostos que inibem o crescimento de micro-organismos fitopatogênicos.

[005]. Dentre os reguladores de crescimento vegetal, as auxinas são ativos químicos responsáveis por diversos processos fisiológicos das plantas. São fito-hormônios responsáveis pela dominância apical, alongamento celular, promoção do crescimento radicular, formação de frutos, entre outros. Além das plantas, bactérias, fungos e algas também produzem auxinas. Dentre elas, a auxina natural mais conhecida é o ácido indol-3-acético (AIA). Em bactérias a síntese do AIA pode ser triptofano-dependente ou não. Portanto, o triptofano é o precursor utilizado comumente na produção de auxinas em laboratório, a partir de micro-organismos.

[006]. Atualmente estão disponíveis auxinas sintéticas como o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido 4-amino-3,5,5-tricloropicolínico (picloram) e o ácido 2-metóxi-3,6-diclorobenzóico

(dicamba), α -naftalenoacético (α -ANA) e o ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T). Estas auxinas sintéticas são utilizadas na cultura de tecidos vegetais, em laboratórios, e também aplicadas como herbicidas na produção agrícola.

[007]. Bactérias promotoras de crescimento vegetal podem ser produzidas industrialmente em biorreatores para serem utilizadas como bio-inoculantes e também para a produção de auxinas. Entretanto, num processo de fermentação industrial, o meio de cultivo tem um peso considerável no custo do processo, podendo variar de 30 a 40% do custo total, sendo necessário o uso de alternativas eficientes e econômicas.

[008]. O reaproveitamento de resíduos agroindustriais surge como uma alternativa para aplicação em processos fermentativos, pois além de diminuir o custo do processo, reduz o impacto no meio ambiente pelo descarte do resíduo e, ao mesmo tempo, agrega valor à cadeia produtiva de interesse. Dentre os resíduos agroindustriais produzidos em grande quantidade no Brasil pode-se citar a água de maceração do milho ou milhocina, e também o glicerol.

[009]. O glicerol é um coproduto do processo de produção do biodiesel por meio de transesterificação, equivalente a 10% do volume total produzido. Atualmente, a sua produção é dada em grandes quantidades devido ao rápido aumento da produção mundial de biodiesel. O Brasil tem grande destaque no panorama mundial do biodiesel, devido à sua alta diversidade de espécies vegetais que podem ser usadas na produção deste biocombustível. Esse cenário ressalta a importância do reaproveitamento do glicerol residual para a geração de produtos com valor agregado que promovam a comercialização deste nos diversos ramos da indústria.

[010]. A milhocina é um subproduto agroindustrial proveniente do processamento do milho que apresenta grande potencial de reuso

devido à sua composição e características físico-químicas. É constituída por carboidratos, aminoácidos, peptídeos, minerais, metais, vitaminas e fosfato (<https://www.ucs.br/site/midia/arquivos/4387-enzitec2016.pdf>).

[011]. Alguns documentos da literatura descrevem métodos de produção de bio-inoculantes ou fertilizantes para o crescimento de plantas. O trabalho de **Pumin Nutaratat, Apitchaya Monprasit e Nantana Srisuk. High-yield production of indole-3-acetic acid by *Enterobacter* sp. DMKU-RP206, a rice phyllosphere bacterium that possesses plant growth-promoting traits. 3 Biotech, v. 7:305. 2017, pp. 1-15**, avaliou diversas fontes de nitrogênio, dentre elas a milhocina, bem como diferentes fontes de carbono, incluindo o glicerol, para a produção de AIA a partir do triptofano utilizando uma cepa de *Enterobacter* sp. O processo otimizado chegou a uma concentração de 5562 mg/L de auxina após 7 dias ou 168h de cultivo, porém utilizando fontes comerciais de carbono e nitrogênio, isto é, lactose e extrato de levedura. As concentrações de AIA obtidas com glicerol e milhocina foram abaixo de 100 e 450 mg/L, respectivamente, após 5 dias.

[012]. O documento **US8568758, intitulado Corn Steep Liquor as a Biostimulant Composition**, propõe o uso da milhocina para promoção do crescimento vegetal, podendo estar associada a espécies bacterianas tais como *Bacillus*. Até o momento, nenhum documento reportou um processo para produção de AIA com rendimentos elevados e alta produtividade a partir de milhocina e glicerol. Também não foi reportado o uso do micro-organismo *Paenibacillus polymyxa* em uma composição com milhocina e glicerol para a promoção do crescimento vegetal.

[013]. O documento **CN106701090, intitulado *Bacillus subtilis*-containing soil amendment**, descreve o uso de uma mistura de amido, proteína e xarope, pó de levedura, milhocina e bentonita como matérias primas para cultivo de *Bacillus subtilis*.

[014]. O documento CN105831162 (A)/CN105831162 (B), intitulado **Sprouting vegetable seed soaking fungicide and application thereof**, cita o uso da composição de 6% a 8% de açúcar mascavo industrial, 0,8% a 1,5% de milhocina, 0,4% a 1,0% de ureia e 1% a 2% de sais para cultivo de fungicidas utilizando cepas de *Lactobacillus casei*, *Rhodopseudomonas palustris* e *Bacillus thuringiensis*.

[015]. O documento **CA1133270 - Preparation for protection of emerging sugar beet against damping-off and method of its production** descreve o uso de substrato de grão ou milho umedecido com solução de nutrientes, e suplementados com constituintes tipo açúcar, milhocina, e sais minerais, e 2-3 % de cloreto de cálcio, como meio de cultivo de *Pythium oligandrum* Drechsler para aplicação como biocontrole.

[016]. O documento **CN103146624A - Mixed liquid fermentation process of three plants of *Bacillus licheniformis*** descreve o uso da composição de 1,0–2,5% de glicose, 1,0–2,5% de melaço de soja, 0,2–1,0% de extrato de levedura, 0,2–1,0% de peptona, 0,2–1,5% de milhocina, 0,2–1,0% de fosfato de potássio bibásico, 0,2–1,0% de fosfato de sódio, 0,02–0,1% de sulfato de magnésio, 0,5% de carbonato de cálcio e pH de 6.5–7.0 para o cultivo de cepas de *Bacillus licheniformis*.

[017]. O documento **CN106554230A - Production method of lotus root special fertilizer** descreve o meio de cultivo composto por: 2,8%–3,5% de farelo e trigo, 1,5% de milhocina, 1%–2% de farinha de batata, 17–18% de açúcar mascavo, 0,4% de glicose, 3,15% de ureia, 0,1% de sulfato de amônio, 0,003%–0,005% de sulfato de magnésio, 0,001%–0,003% de sulfato de ferro, 0,02% de fosfato de potássio dibásico, pH 8,0–9,0, e 5,2% de inóculo, para um fertilizante de lótus.

[018]. O documento **CN102199569B- *Bacillus subtilis* submerged fermentation culture medium applied to microbial fertilizers** descreve a invenção de uma formulação de meio de cultivo de baixo custo para

Bacillus subtilis contendo (em massa): 2% amido, 1% milhocina, 0,5% fosfato de potássio dibásico, 0,1% sulfato de amônio, 0,1% carbonato de cálcio, 0,2–0,5% sulfato de manganês e pH 7,2 –7,4.

[019]. O documento **CN106699332A - Production method of special fertilizer for watermelon** descreve o meio para cultivo bacteriano que consiste em: 3% de farelo de trigo, 19% de açúcar mascavo, 12% de milhocina, 0,1–0,3% de dextrose, 0,2–0,3% de sulfato de amônio, 0,003–0,005% de sulfato de magnésio, 0,001–0,003% de sulfato de ferro e 0,01% de fosfato de potássio dibásico.

[020]. O documento **CN102242075B - Semi-continuous fermentation method for *Bacillus* used for microbial fertilizer** descreve a composição de um meio fermentativo para um fertilizante líquido contendo *Bacillus licheniformis* contendo (percentagem em massa): 1% de farinha de trigo, 1% de farinha de milho, 2,55% de melaço de soja, 0,3% de milhocina, 0,2% de sulfato de magnésio heptahidratado, 0,04% de sulfato de magnésio monohidratado, 0,2% de óleo de semente de uva e pH 7,2–7,4.

[021]. Nesses documentos de patente não há menção de um processo para produção de AIA utilizando *Paenibacillus polymyxa* com alto rendimento e alta produtividade a partir de milhocina e glicerol, nem de uma composição promotora de crescimento vegetal resultante contendo AIA e *Paenibacillus polymyxa*.

[022]. Uma pesquisa foi realizada na literatura de produção de AIA a partir de bactérias, e está resumida na Tabela 1. Conforme o levantamento de dados, poucos trabalhos desenvolveram a produção de AIA a partir de resíduos agroindustriais com o objetivo de baixar o custo do meio de cultivo. Um dos trabalhos foi o de **Nantana Srisuk, Varunya Sakpuntoon e Pumin Nutaratat. Production of Indole-3-Acetic Acid by *Enterobacter* sp. DMKU-RP206 Using Sweet Whey as a Low-Cost**

Feed Stock. J. Microbiol. Biotechnol, v. 28-9. 2018, pp. 1511-1516, no qual é descrito o uso de 1,48% de soro de leite como substituto da lactose, como fonte de carbono, adicionado a 1,42% de extrato de levedura e 0,88% de L-triptofano utilizando a cepa *Enterobacter* sp. DMKU-RP206. Farelo de milho e melaço de soja também foram reportados em estudo para produção de AIA (Tabela 1).

[023]. Outro trabalho de **Wagner Scheidt, Izadora Chauke Piovezan dos Santos Pedroza, Juliane Fontana, Luiz Augusto da Cruz Meleiro, Luis Henrique de Barros Soares, Veronica Massena Reis, Optimization of culture medium and growth conditions of the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* BR11417 for its use as an agricultural inoculant using response surface methodology (RSM). Plant soil, 2019**, descreveu o meio de cultura DYGS modificado, contendo: 5,5 g/L de glicerol, 2,8 g/L de extrato de levedura, 0,5 g/L de K_2HPO_4 , 0,5 g/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ para a produção de biomassa da bactéria promotora de crescimento de plantas *Herbaspirillum seropedicae* BR11417 e produção de AIA, que atingiu 11.97 mg/L.

[024]. Tabela 1. Dados bibliográficos de artigos referenciando a produção de auxinas a partir de cepas bacterianas

Autores	Ano	AIA	Micro-organismo	Meio de cultura
Sudha et al.	2012	6.1 µg/mL	<i>Rhizobium</i> sp. e <i>Bacillus</i> sp.	KH_2PO_4 3g, K_2HPO_4 0.6 g, $(NH_4)_2Cl_2$ 2g, NaCl 0.5g, glicose 0.8g e $MgSO_4$ 0.1g
Peng et al.	2014	18.73 µg/mL	<i>Pseudomonas putida</i> Rs-198	52.41 g/L farinha de milho, 15.82 g/L melaço de soja, 2.40 g/L K_2HPO_4 , 0.17 g/L $MnSO_4$ e 5.00 g/L NaCl
Swain e Ray	2008	23.5 µg/mL	<i>Bacillus subtilis</i>	Caldo nutriente (em g.L ⁻¹ : peptona 5; extrato de levedura 3; extrato de carne 1 e NaCl 5), L-triptofano 100 mg/L
Raut et al.	2017	47.5 µg/mL	Não identificados	Caldo nutriente suplementado com 0.1% de triptofano

Ribeiro et al.	2018	61.6 µg/mL	<i>Bacillus</i> spp.	Caldo Soja Trypticaseína (TSB) suplementado com 1.0 mg.mL ⁻¹ de L-triptofano
Ramanuj Shelat	and 2018	59.94 µg/mL	<i>Bacillus endophyticus</i> AAU K2 Accn. MF034734,	Caldo fosfato glicose (GPB) suplementado com L-triptofano 1 µg/mL
Kumari et al.	2018	168.09 µg/mL	<i>B. subtilis</i> DR2 (KP455653)	Caldo Triptona 1%
Balaji et al.	2012	245 µg/mL	<i>Pseudomonas</i> sp.	0.5% L-triptofano, 0.2% NaNO ₃ , 0.1% K ₂ HPO ₄ , 0.01% MgSO ₄ .7H ₂ O, 0.2% CaCO ₃ e 1% glicose
Sarkar e Laha	2016	313.63µg/mL & 319.31 µg/mL	<i>Rhizobium leguminosarum</i> e <i>Rhizobium loti</i>	Caldo YEMA (em g.L ⁻¹ : manitol 10, K ₂ HPO ₄ 0.5, MgSO ₄ .7H ₂ O 0.2, NaCl 0.1, extrato de levedura 0.5) suplementado com raffinose, glicose, maltose
Ozdal et al.	2017	490 µg/mL	<i>Arthrobacter agilis</i> A17 gave	Caldo Soja Trypticaseína (TSB) contendo 1 g/L L-triptofano
Bharucha et al.	2013	591.8 µg/mL	<i>Pseudomonas putida</i> UB1	1% manitol adicionado a tampão tris, 1 g/L L-triptofano
Jasim et al.	2014	869 +- 78.82 µg/mL	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Caldo nutriente contendo 0.2% triptofano
Apine e Jadhav	2011	2191 mg/mL 1.57 µg/mL	<i>P. agglomerans</i> PVM	8 g.L ⁻¹ de extrato de carne e 1 g.L ⁻¹ de L-triptofano, e sacarose
Khamna et al.	2010	300 mg/mL	<i>Streptomyces</i> CMU-H009	Caldo YM (g.L ⁻¹ : digestão enzimática de gelatina 5, extrato de malte 3, dextrose 10, extrato de levedura 3) suplementado com 2 mg/mL de L-triptofano
Nutaratat et al.	2017	3804.2 µg/mL em Erlenmeyer 5561.7 µg/mL em Biorreator	<i>Enterobacter</i> sp. DMKU-RP206	0.85% de lactose, 1.3% de extrato de levedura, 1.1% de L-triptofano, 0.4% de NaCl

[025]. A Tabela 1 descreve os trabalhos publicados para produção de auxinas, mais precisamente o AIA, utilizando diversas composições de meios de cultura.

[026]. Atualmente, existem no mercado bio-inoculantes na formulação líquida ou sólida, em pó. Na sua maioria são compostos de cepas bacterianas dos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*, consideradas espécies fixadoras de nitrogênio, e sem relato de presença de auxinas na sua composição.

[027]. Para citar alguns produtos comercializados atualmente: *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5079) e *Bradyrhizobium diazoefficiens* (SEMIA 5080) da BIAGRO™ HC (Agro Bayer Brasil), *Bradyrhizobium* sp. do CTS 500® (Bayer Co.), *Azospirillum brasiliense* cepa AbV5 e AbV6 UFPR da AZOKOP (Koppert Biological Systems), *Rhizobium tropici* SEMIA 4077 da Biomarhyzo Beans-Peaty (BIOMA, Brasil), *Sinorhizobium meliloti* RF14, indicado para alfafa (Andermatt Biocontrol, Switzerland). Em geral esses produtos são indicados para tratamento de sementes com o benefício de fixação de nitrogênio.

Descrição da abordagem do problema técnico

[028]. A presente invenção tem como objetivo a aplicação de um meio de cultivo formulado com resíduos agroindustriais em um processo fermentativo para a produção de bio-inoculante *Paenibacillus polymyxa* e de um regulador vegetal (auxina), resultando em uma composição promotora do crescimento vegetal.

[029]. A presente invenção aliou dois subprodutos, o glicerol e a milhocina, para o desenvolvimento de um novo processo de produção de bio-inoculantes de alto rendimento e produtividade. Isso possibilita o reaproveitamento de resíduos gerados em grandes quantidades aliado à produção de um bioproduto de valor agregado. Os subprodutos aqui mencionados têm um custo de matéria prima relativamente baixo, e são

utilizados *in natura*, sem a necessidade de tratamento prévio, contribuindo mais ainda para a redução dos custos do processo.

[030]. O meio de fermentação é constituído por glicerol como fonte de carbono principal, milhocina como fonte de nitrogênio, macro e micronutrientes necessários para promover uma alta taxa de multiplicação celular, e com a adição do triptofano que promove a biossíntese da auxina pelas bactérias. A concentração da auxina produzida a partir do meio e processo aqui descritos é superior à de muitos trabalhos já reportados.

[031]. A espécie utilizada *Paenibacillus polymyxa* contém uma ou mais propriedades de promover o crescimento de plantas como a fixação de nitrogênio, a solubilização de fosfatos, a produção de sideróforos, a produção de reguladores vegetais e tem ainda ação antimicrobiana. Não existem no momento produtos a serem comercializados como bio-inoculantes a partir da espécie aqui descrita. A espécie *Paenibacillus polymyxa* é reportada mais precisamente para o biocontrole de pragas.

[032]. Em geral, a utilização comercial de fito-hormônios tais como as giberelinas e as citocininas na agricultura tem sido muito limitada. Nesta invenção, propomos o processo de produção de bio-inoculantes em conjunto com a produção de auxinas para aplicação agrícola. Com isso, a presente invenção oferece, além das propriedades de promoção de crescimento de plantas pelas espécies bacterianas produzidas, um complexo de auxinas que incrementará ainda mais a produtividade vegetal, estimulando o desenvolvimento da raiz e o crescimento apical.

Descrição Detalhada da Invenção

[033]. O processo desenvolvido na presente invenção utiliza um meio de cultivo para a produção de bio-inoculante e ácido indol-3-acético que compreende uma mistura de glicerol, com uma concentração entre 2,0 e 5,0 % (m/v), e milhocina, na proporção de 0,3 a 1,0 % (m/v), como fontes de carbono e nitrogênio.

[034]. O meio de fermentação deve conter ainda os seguintes sais: K_2HPO_4 , com concentração na faixa de 0,2 a 0,8 g.L⁻¹, KH_2PO_4 na faixa de 0,1 a 0,5 g.L⁻¹, NaCl na faixa de 0,5 a 2 g.L⁻¹, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ na faixa de 0,1 a 0,8 g.L⁻¹ e $CaCl_2$ na faixa de 0,02 a 0,08 g.L⁻¹.

[035]. O meio deve conter ainda os seguintes elementos traço: $FeCl_3$ em concentração de 0,01 a 0,05 g.L⁻¹, KI em concentração de 0,02 a 0,1 g.L⁻¹, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ em concentração de 0,05 a 0,2 g.L⁻¹, H_3BO_3 em concentração de 0,01 a 0,05 g.L⁻¹, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ em concentração de 0,1 a 0,5 g.L⁻¹, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ em concentração de 0,1 a 0,5 g.L⁻¹ e $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ em concentração de 0,1 a 0,5 g.L⁻¹.

[036]. O meio de fermentação deve ter seu pH ajustado para valores entre 4,5 e 8, sendo utilizado preferencialmente o pH mais ácido, entre 5,0 e 6,5.

[037]. Para a promoção da biossíntese da auxina, o ácido indol-3-acético, é adicionado ao meio de cultivo o aminoácido triptofano na concentração de 0,1 a 10 % (m/v).

[038]. O meio de cultivo deve ser preferencialmente esterilizado para evitar contaminações e variações de rendimento. A esterilização pode ser realizada por qualquer uma das técnicas tradicionais, tais como calor úmido entre 100 e 130 °C por 10 – 45 min, e filtração em membrana (0,22 – 0,45 µm). No caso de o meio de cultivo ser esterilizado por calor, a adição do triptofano deve ser realizada após a etapa de esterilização, e esse componente deve ser esterilizado por técnicas não destrutivas, tais como a filtração em membrana de uma solução.

[039]. Um exemplo de preparação do meio de fermentação envolve misturar primeiramente os componentes líquidos (glicerol, milhocina e água) e os sais, ajustar o pH com uma solução alcalina ou ácida (por exemplo, hidróxido de sódio a 1 M ou ácido clorídrico a 1 M), até a faixa de pH desejada, e então submeter o meio à esterilização por calor úmido, a 121°C por 20 min. Após o resfriamento do meio pode-se adicionar assepticamente o triptofano. Por exemplo, utilizando-se uma solução padrão do triptofano, de 20 a 25% (m/v), previamente esterilizada por filtração. O meio de cultivo pode ser acondicionado em frascos Erlenmeyer (250, 500 ou 1000 mL) ou em biorreatores, conforme o volume pretendido de fermentação.

[040]. O processo para a produção de bio-inoculante e ácido indol-3-acético, segundo a presente invenção, compreende o cultivo em fermentação submersa da bactéria promotora do crescimento de plantas *Paenibacillus polymyxa*.

[041]. *Paenibacillus polymyxa* é cultivada inicialmente em meio caldo nutriente ou similar previamente esterilizado, a uma temperatura de 25 a 35°C, sob agitação de 100 a 150 rpm por tempo entre 12 e 24h.

[042]. Um exemplo de preparação dos inóculos é o uso de alíquotas das cepas previamente armazenadas em glicerol ou em placas de Petri contendo meio de cultivo sólido com colônias isoladas das mesmas. Essas alíquotas podem ser adicionadas em tubos ou em frascos Erlenmeyer contendo entre 20 e 50 mL do meio de cultivo, como o caldo nutriente esterilizado. Para a inoculação, são transferidos 100 µL do material armazenado em glicerol ou uma alçada da cultura caso esteja armazenada em placa de Petri com meio sólido para os tubos ou frascos, e em seguida incuba-se por 12 a 24 h em temperatura entre 25 e 35°C, sob agitação entre 100 e 150 rpm. Após a incubação, a cultura iniciadora

deverá conter uma quantidade de células viáveis entre 10^4 e 10^6 UFC.mL⁻¹.

[043]. Para dar início ao processo fermentativo, com a inoculação das bactérias no meio de cultivo, adiciona-se de 2 a 5% (v/v) da cultura iniciadora ao meio previamente descrito, de modo a obter uma concentração inicial entre 10^2 a 10^3 unidades formadoras de colônia por mL para o processo fermentativo. Essa proporção corresponde à quantidade total de inóculo.

[044]. Na sequência, incuba-se o recipiente (frasco para cultivo ou biorreator) contendo o meio de cultivo com as bactérias a uma temperatura entre 25 e 37°C, sob agitação entre 120 e 150 rpm e aeração entre 0,5 e 3 vvm, por tempo entre 24 e 144h.

[045]. Após a realização dessas etapas o produto fermentado contendo a bactéria *Paenibacillus polymyxa* em concentração entre 10^8 e 10^{12} unidades formadoras de colônia por mL, ácido indol-3-acético em concentração entre 200 e 900 µg.mL⁻¹, glicerol entre 5 e 25 g.L⁻¹ e milhocina entre 0.5 e 3 g.L⁻¹ pode ser acondicionado em embalagens preferencialmente estéreis e à prova de umidade, e armazenado a temperaturas entre 4 e 10 °C, podendo ser utilizado como bio-inoculante para germinação de sementes ou fertilizante de plantas.

Outros exemplos

[046]. A produção de auxina e biomassa microbiana pode ser realizada utilizando concentrações de glicerol e milhocina de modo a obter uma relação de carbono:nitrogênio preferencialmente entre 8 e 12, equivalente a concentrações de glicerol entre 20 e 44 g.L⁻¹ e de milhocina entre 3 e 9 g.L⁻¹, em meio de cultivo acrescido de triptofano na faixa de 2 a 8 % (m/v). Como resultado da fermentação, pode-se esperar a formação de biomassa microbiana entre 10^8 e 10^{12} unidades

formadoras de colônia por mL, após 2 a 5 dias de cultivo, e uma concentração entre 600 e 900 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de ácido indol-3-acético.

[047]. Um exemplo de produção de auxina com alto rendimento e produtividade é apresentado na Figura 1. Após 32 h de cultivo em biorreator de 10L (30°C, pH 5 e 1 vvm) são obtidos 812 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de ácido indol-3-acético, o que corresponde a uma produtividade de 25,37 $\mu\text{g.mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

[048]. A espécie bacteriana aqui descrita demonstra promover o crescimento de plantas de diversas espécies como alface, feijão e soja. O produto resultante do processo pode ser aplicado como uma mistura de biomassa bacteriana e complexo de auxinas, ou separadamente, utilizando somente a biomassa bacteriana ou somente o sobrenadante contendo o complexo das auxinas. Esse produto contém, além das bactérias e da auxina, glicerol entre 10 e 25 g.L^{-1} , milhocina entre 0,5 e 3 g.L^{-1} e traços de triptofano e sais utilizados para a fermentação.

[049]. O produto pode ser aplicado em proporção de 2 a 10% em sementes, como as sementes de feijão, antes do plantio. Como resultado, pode-se observar o aumento na taxa de germinação, a promoção da formação de raízes e o incremento no crescimento apical da planta (conforme ilustrado na Figura 2).

Descrição das Figuras

[050]. Figura 1. Produção de auxina por *Paenibacillus polymyxa* em fermentador do tipo tanque agitado de 10L a 30°C, pH 5 e 1 vvm.

[051]. Figura 2. Aplicação do produto fermentado do *Paenibacillus polymyxa* em sementes de feijão após 45 dias de cultivo. Legenda: 1 – controle negativo com aplicação de água; 2 – controle positivo com uso do ácido indol-3-acético (AIA) padrão 0,150 mg.L^{-1} ; 3 – aplicação com

5% do sobrenadante do fermentado bacteriano contendo 0,450 mg.L⁻¹ de AIA; 4 – aplicação com o produto final do fermentado contendo 0,450 mg.L⁻¹ de AIA e 1,8x10¹⁰ UFC.mL⁻¹.

REIVINDICAÇÕES

PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE BIO-INOCULANTE E ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO E COMPOSIÇÃO PROMOTORA DE CRESCIMENTO VEGETAL

1. **PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE BIO-INOCULANTE E ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO** caraterizado por ser realizado pelo cultivo em fermentação submersa de *Paenibacillus polymyxa* em concentração inicial entre 10^2 a 10^3 unidades formadoras de colônia por mL de meio de cultivo preparado com os resíduos agroindustriais glicerol em concentração de 2,0 a 5,0% (m/v) e milhocina (água de maceração do milho) in natura em concentração de 0,3 a 1,0% (m/v) como fontes de carbono e nitrogênio, suplementado com sais minerais, um ácido inorgânico e o aminoácido triptofano na concentração de 0,1 a 10 % (m/v).
2. **PROCESSO** de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser realizado em meio de cultivo preferencialmente esterilizado e com pH entre 4,5 e 8.
3. **PROCESSO** de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser realizado com meio de cultivo suplementado com os componentes K_2HPO_4 (0,2 a 0,8 g.L⁻¹), KH_2PO_4 (0,1 a 0,5 g.L⁻¹), NaCl (0,5 a 2 g.L⁻¹), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,1 a 0,8 g.L⁻¹), $CaCl_2$ (0,02 a 0,08 g.L⁻¹), $FeCl_3$ (0,01 a 0,05 g.L⁻¹), KI (0,02 a 0,1 g.L⁻¹), $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (0,05 a 0,2 g.L⁻¹), H_3BO_3 (0,01 a 0,05 g.L⁻¹), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,1 a 0,5 g.L⁻¹), $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ (0,1 a 0,5 g.L⁻¹) e $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,1 a 0,5 g.L⁻¹).
4. **PROCESSO** de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser realizado com *Paenibacillus polymyxa* adicionado ao meio em concentração de 2 a 5% (v/v), a partir de uma cultura iniciadora preparada em meio líquido caldo nutriente, de modo a obter a

concentração inicial de 10^2 a 10^3 unidades formadoras de colônia por mL no processo fermentativo.

5. **PROCESSO** de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela realização da fermentação submersa em frascos para cultivo ou biorreatores, a uma temperatura entre 25 e 37°C, agitação entre 120 e 150 rpm, aeração entre 0,5 e 3 vvm, por 24 a 144 horas.
6. **PROCESSO** de acordo com as reivindicações de 1 a 6, caracterizado por resultar em um caldo contendo a bactéria *Paenibacillus polymyxa* em concentração entre 10^8 e 10^{12} unidades formadoras de colônia por mL, e ácido indol-3-acético em concentração entre 200 e 900 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.
7. **COMPOSIÇÃO PROMOTORA DE CRESCIMENTO VEGETAL** resultante de processo conforme reivindicação 1, caracterizada por conter a bactéria *Paenibacillus polymyxa* em concentração entre 10^8 e 10^{12} unidades formadoras de colônia por mL, ácido indol-3-acético em concentração entre 200 e 900 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, glicerol entre 5 e 25 g.L^{-1} e milhocina entre 0.5 e 3 g.L^{-1} .

FIGURAS

Figura 1

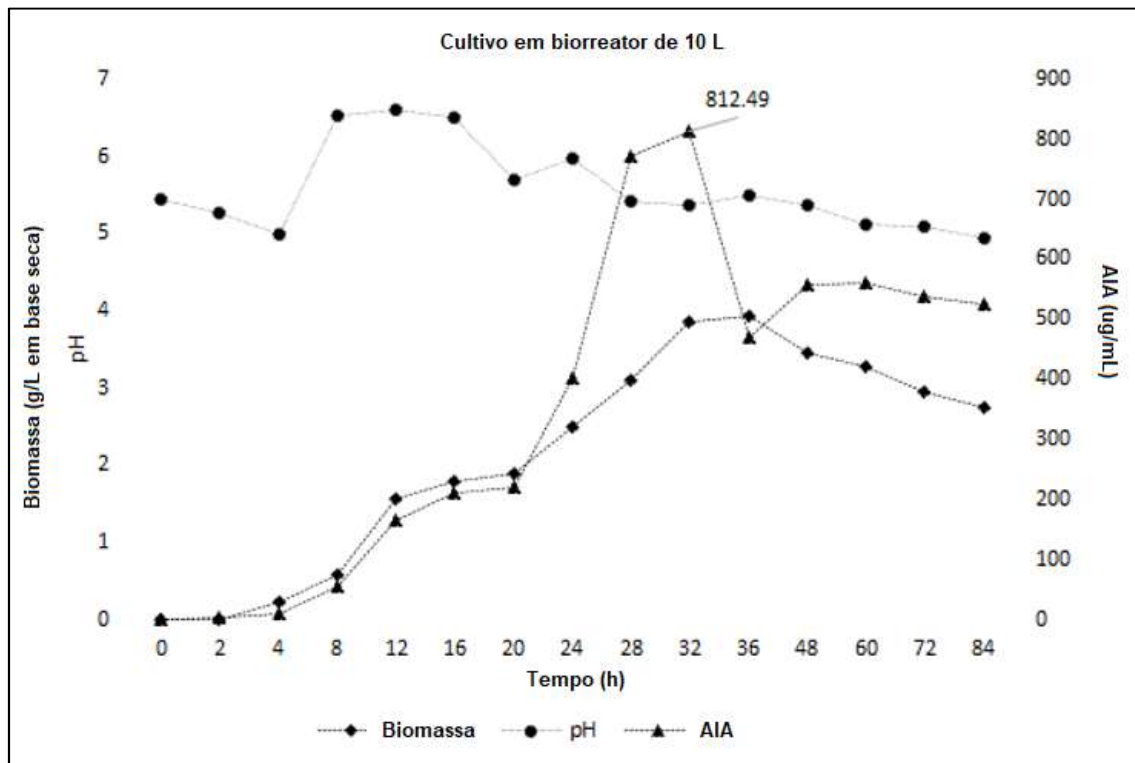


Figura 2

