



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**IMPLEMENTAÇÃO DA METODOLOGIA DE  
PRODUÇÃO DE DEFENSIVOS BIOLÓGICOS “*ON  
FARM*” DE ALTO PADRÃO EM LARGA ESCALA**

**LAURA MONNERAT GOERGEN**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM AGRONOMIA**

**BRASÍLIA/DF**

**JANEIRO/2023**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**IMPLEMENTAÇÃO DA METODOLOGIA DE PRODUÇÃO DE  
DEFENSIVOS BIOLÓGICOS “*ON FARM*” DE ALTO PADRÃO EM  
LARGA ESCALA**

**LAURA MONNERAT GOERGEN**

**ORIENTADORA: Dra. ROSE MONNERAT**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM AGRONOMIA**

**PUBLICAÇÃO: NÚMERO DA DISSERTAÇÃO/2023**

**BRASÍLIA/DF**

**JANEIRO/2023**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**IMPLEMENTAÇÃO DA METODOLOGIA DE PRODUÇÃO DE  
DEFENSIVOS BIOLÓGICOS “ON FARM” DE ALTO PADRÃO EM  
LARGA ESCALA**

**LAURA MONNERAT GOERGEN**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-  
GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS  
NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM AGRONOMIA.**

**APROVADA POR:**

---

**ROSE MONNERAT SOLON DE PONTES, PhD/Universidade de Brasília**  
**/512.803.701-06/ rosemonnerat@gmail.com**

---

**MARIA LUCRÉCIA GEROSA RAMOS, PhD/Universidade de Brasília**  
**/002.094.438-12/ lucreciaunb@gmail.com**

---

**SANDRO COELHO LINHARES MONTALVÃO, Dr/Universidade de Brasília**  
**/937.726.965-20/ sandro.coelho@yahoo.com.br**

**BRASÍLIA/DF, 31 de JANEIRO de 2023.**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Goergen, Laura Monnerat

Implementação da metodologia de produção de defensivos biológicos “*on farm*” de alto padrão em larga escala/ Laura Monnerat Goergen, orientação de Rose Monnerat – Brasília, 2023.

68 p. : il.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2023.

1. Controle biológico. 2. Produção *on farm*. 3. Defensivos biológicos 4. Bioinsumos. 5. *Bacillus* spp I. Monnerat, R. II. Implementação da metodologia de produção de defensivos biológicos *on farm* de alto padrão em larga escala.

CDD ou CDU

Agris / FAO

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

GOERGEN, L. M. **Implementação da metodologia de produção de defensivos biológicos “*on farm*” de alto padrão em larga escala.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2023, 68 p. Dissertação de Mestrado.

## CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: LAURA MONNERAT GOERGEN

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Implementação da metodologia de produção de defensivos biológicos *on farm* de alto padrão em larga escala.

GRAU: Mestre

ANO: 2023

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado para única e exclusivamente propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada à fonte.

Nome: Laura Monnerat Goergen

CPF: 011.134.861-71

Endereço: SHIN QI 08 Conjunto 02 Casa 08 – Lago Norte – Brasília/DF

Tel: 61 998740131

Email: [lauramgoergen@gmail.com](mailto:lauramgoergen@gmail.com)

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer inicialmente a meus pais, Roque e Marcia, e irmão, Pedro, que são minha base e porto seguro, são meus exemplos diários de persistência e perseverança. Sou especialmente grata a minha mãe, que sempre me oferece uma palavra ou gesto de conforto e carinho e que me estimula a buscar meus sonhos e a sair da zona de conforto. Sou grata aos exemplos do meu pai, que sempre lutou com muita paciência e sabedoria para alcançar seus objetivos, que me ensinou que é preciso dar um passo de cada vez, que é preciso plantar para colher e que sempre colocou a educação em primeiro lugar. E ao meu irmão, tenho muito a agradecer pela amizade e por me ensinar que é necessário confiar na intuição e no coração para se tomar decisões e ter persistência para realizar objetivos. Eles são a razão de eu ter coragem de me aventurar e perseguir sonhos que, muitas vezes, nem acredito ser capaz de alcançar.

Agradeço imensamente à família Aoyagui e ao Grupo AgroSalgueiro pela experiência adquirida nos quase três anos trabalhando na Biofábrica da fazenda Salgueiro da Serra, que me permitiu sonhar com um título de Mestre. Agradeço também ao Sr. Rogério Aoyagui por me incentivar a crescer profissionalmente, a buscar esse título e por me oferecer os meios de conquistá-lo.

E por fim, mas não menos importante, sou extremamente grata à minha orientadora, a Dra. Rose Monnerat, que é minha mentora desde a graduação, que me apresentou e me encantou com o mundo do controle biológico de pragas, que é meu exemplo de pesquisadora e de profissional no Agronegócio brasileiro, responsável por grandes feitos e avanços no setor. Muito obrigada pela paciência e apoio ao longo de todos esses anos e por acreditar em mim!

## SUMÁRIO

Lista de Tabelas.....	vii
Lista de Figuras .....	viii
Lista de Siglas .....	ix
Resumo .....	xi
Abstract.....	xii
<b>1.INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
1.1 PROBLEMÁTICA E RELEVÂNCIA .....	13
1.2 OBJETIVOS .....	14
<b>2.REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>15</b>
2.1 O MERCADO BRASILEIRO DE DEFENSIVOS BIOLÓGICOS.....	15
2.2 O GÊNERO <i>Bacillus</i> .....	22
2.3 ALGUMAS ESPÉCIES DE BACTÉRIAS DO GÊNERO <i>Bacillus</i> DE IMPORTÂNCIA AGRÍCOLA.....	24
2.4 PRODUÇÃO <i>ON FARM</i> .....	29
2.5 DIFICULDADES DA PRODUÇÃO <i>ON FARM</i> .....	36
2.6 CARACTERIZAÇÃO DE <i>Bacillus</i> .....	40
<b>3.MATERIAIS E MÉTODO .....</b>	<b>41</b>
3.1 ISOLAMENTO DE <i>Bacillus SPP.</i> A PARTIR DE AMOSTRAS DE SOLO.....	41
3.2 ESTABELECIMENTO DO PROCESSO EM FERMENTADOR DE 100 LITROS NA EMBRAPA .....	46
3.3 ETABELECIMENTO DO PROCESSO EM FERMENTADOR DE 1000 LITROS NA AGROSALGUEIRO .....	47
3.4 CONTROLE DE QUALIDADE DOS PRODUTOS FINALIZADOS .....	48
<b>4.RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>50</b>
4.1 ISOLAMENTO DE <i>Bacillus SPP.</i> A PARTIR DE AMOSTRAS DE SOLO.....	50
4.2 PROCESSO EM FERMENTADOR DE 100 LITROS NA EMBRAPA .....	55
4.3 PROCESSO EM FERMENTADOR DE 1000 LITROS NA AGROSALGUEIRO.....	57
4.4 CONTROLE DE QUALIDADE DOS PRODUTOS FINALIZADOS .....	60
<b>5.CONCLUSÃO .....</b>	<b>62</b>

<b>6.PUBLICAÇÃO .....</b>	<b>63</b>
<b>7.CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>64</b>
<b>8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>65</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1:</b> Número de produtos registrado pelo MAPA e apresentados no Catálogo Nacional de Bioinsumos, em duas atualizações .....	20
<b>TABELA 2:</b> Parâmetros físico-químicos descritos na literatura .....	33
<b>TABELA 3:</b> Intervalo de concentração de esporos estabelecido pelas Especificações de referência.....	35
<b>TABELA 4:</b> Número de biofábricas mapeadas pelo Brasil, de acordo com dados coletados de produtores rurais associados ao GAAS.....	39
<b>TABELA 5:</b> Meios de cultura comerciais para detectar microrganismos contaminantes durante o Controle de Qualidade .....	49
<b>TABELA 6:</b> Características morfológicas das colônias observadas em placa de Meio Embrapa .....	50
<b>TABELA 7:</b> Características morfológicas das células e esporos das colônias isoladas das amostras de solo.....	51
<b>TABELA 8:</b> Resultados da caracterização molecular de isolados do gênero Bacillus.....	54
<b>TABELA 9:</b> Microrganismos produzidos em pequena escala, tempo, em horas, de bioprocessamento até alcançar 95% de esporulação, média dos tempos para cada microrganismo, concentração de esporos por mL de produto finalizado e médias de concentrações de esporos/mL por microrganismo .....	56
<b>TABELA 10:</b> Microrganismos produzidos em larga escala, tempo, em horas, de bioprocessamento até alcançar 95% de esporulação, média dos tempos para cada microrganismo, concentração de esporos por mL de produto finalizado e médias de concentrações de esporos/mL por microrganismo .....	58
<b>TABELA 11:</b> Microrganismos e presença de contaminantes nas análises realizadas na Embrapa e na AgroSalgueiro .....	60

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>FIGURA 1:</b> Página inicial do aplicativo do Catálogo Nacional de Bioinsumos, resultado do Programa Nacional de Bioinsumos do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). A imagem A mostra a atualização de agosto de 2022 e a imagem B, a de novembro de 2022 .....	21
<b>FIGURA 2:</b> Imagens de satélite das localizações da sede da Fazenda Salgueiro da Serra (A) e da área experimental (B), de onde as amostras de solo foram coletadas.....	41
<b>FIGURA 3:</b> Frascos Erlenmeyer 125 mL contendo solução Tween 80 0,01% e amostras de solo .....	42
<b>FIGURA 4:</b> Registros de algumas placas contendo colônias de <i>Bacillus</i> isoladas a partir de amostras de solo. Placas de Petri (90x15 mm) .....	51
<b>FIGURA 5:</b> Imagens referentes à microscopia de contraste de fase das colônias 1 (A, B, C) e 2 (D, E), isoladas a partir das amostras de solo, com seus respectivos recortes (em vermelho) ampliados. A imagem (A) mostra a) as células vegetativas; (B) a formação dos b) esporos e c) cristais dentro da célula; (C) células contendo b) esporo e c) cristal bipiramidal em seu interior e d) esporos e e) cristais bipiramidais já liberados, (D) aglomerado de a) células vegetativas e b) esporos já liberados, e (E) pequeno aglomerado contendo a) célula vegetativa, b) esporo em formação dentro da célula e d) esporos liberados. Imagens com aumento de 400x com zoom por programa de computador .....	52 e 53

## LISTA DE SIGLAS

% (v/v)	Porcentagem em volume;
µL	Microlitro;
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
atm	Atmosfera
B.	<i>Bacillus</i> ;
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i> ;
Cenargen	Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia;
DNA	Ácido desoxirribonucleico;
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária;
ER	Especificação de referência;
g	Grama;
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis;
IN	Instrução Normativa;
kg	Quilograma;
L	Litro;
LBE	Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas;
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento;
ME	Meio Embrapa;
Meio LB	Meio Luria Bertani;
Meio NB	Meio Caldo nutriente;
Meio NYSM	Nutrient Yeast Extract Salt Medium;
Meio TSB	Trypticase Soy Broth;
mg	Miligrama;
MIPD	Manejo Integrado de Pragas e Doenças;
mL	Mililitro;
MMA	Ministério do Meio Ambiente;
PNB	Programa Nacional de Bioinsumos;
q-PCR	Reação em cadeia polimerase em tempo real;
RNA	Ácido ribonucleico;
rpm	Rotação por minuto;

Sip	Proteínas inseticidas secretadas;
spp.	Espécie;
UFC	Unidade formadora de colônias;
Vip	Proteínas inseticidas vegetativas;

## RESUMO

A agricultura brasileira tem grande destaque no cenário agrícola mundial, pois o clima tropical e a abundância de água permitem a realização de mais de uma safra por ano agrícola. No entanto, esse clima favorece também o surgimento e estabelecimento de pragas e doenças que prejudicam a produtividade das lavouras brasileiras. Para controlar essas mazelas, o agricultor depende de métodos de controle que costumam ser onerosos e, por vezes, perigosos à saúde humana e ao meio ambiente. Para evitar o consumo excessivo e a dependência de defensivos químicos, que costumam ser importados, alternativas foram criadas para amenizar os custos da produção agrícola e estimular o controle mais sustentável das pragas e doenças que atingem as culturas: o Manejo Integrado de Pragas e Doenças (MIPD), manejo que estimula diferentes práticas de controle e incentiva o consumo consciente de defensivos químicos. Uma das estratégias do MIPD é o controle biológico, que pode ser realizado por meio dos defensivos biológicos a base de microrganismos, que podem inclusive ser produzidos na propriedade rural onde serão utilizados, prática chamada de produção *on farm*. Esses defensivos biológicos podem ser produzidos a partir de diversos microrganismos, e os mais utilizados são formulados de bactérias do gênero *Bacillus*, que possui mais de 200 espécies e algumas delas possuem grande potencial para uso agrícola. Elas produzem em sua fase de desenvolvimento vegetativo diversos compostos e toxinas com funções antibióticas, inseticidas, antifúngicas, entre outras. A Embrapa desenvolveu uma metodologia de produção desses bio defensivos de forma totalmente padronizada e segura, produzindo defensivos de alta qualidade e eficiência. Nessa dissertação de mestrado, avaliamos a implantação dessa metodologia instruída pela Embrapa Cenargen e pela empresa AgroSalgueiro para validar se a metodologia criada para pequena escala é possível de ser reproduzida em larga escala, mantendo a qualidade do produto finalizado.

**Palavras-chave:** Controle biológico, Produção *on farm*, Defensivos biológicos, Bioinsumos, *Bacillus* spp.,

## ABSTRACT

Brazilian agriculture has great prominence in the world agricultural scenario, because the tropical climate and the abundance of water allow the realization of more than one crop per agricultural year. However, this climate also favors the emergence and establishment of pests and diseases that damage the productivity of Brazilian crops. To try to control these diseases, the farmer depends on control methods that are usually costly and sometimes dangerous to human health and the environment. To avoid excessive consumption and dependence on chemical pesticides, which are usually imported, alternatives have been created to ease the costs of agricultural production and stimulate a more sustainable control of pests and diseases that affect crops: the Integrated Management of Pests and Diseases (IPM), management that stimulates different control practices and encourages the conscious consumption of chemical pesticides. One of the IPM strategies is biological control, which can be achieved by means of microorganism-based biological pesticides, which can even be produced on the farm where they will be used, a practice known as on-farm production. The most commonly used are bacteria of the genus *Bacillus*, which has more than 200 species, some of which have great potential for agricultural use. They produce in their vegetative development phase several compounds and toxins with antibiotic, insecticide, and antifungal functions, among others. Embrapa has developed a methodology for producing these bio defensives in a totally standardized and safe way, producing high quality and efficient defensives. In this master's thesis, we evaluate the implementation of this methodology instructed by Embrapa Cenargen by the company AgroSalgueiro to validate if the methodology created for small scale is possible to be reproduced in large scale, maintaining the quality of the final product.

Keywords: Biological control, On-farm production, Biological defensives, Bioinputs, *Bacillus* spp.

# INTRODUÇÃO

## 1.1 PROBLEMÁTICA E RELEVÂNCIA

Ao longo dos anos, os produtores rurais tornaram-se dependentes de insumos, como os defensivos químicos e fertilizantes minerais, para atingir produtividades no Brasil. Entretanto, a interferência da geopolítica faz com que os custos desses insumos variem com facilidade, o que é desafiador para os produtores rurais (GOULET, 2021). Além disso, a resistência de insetos e patógenos aos princípios ativos dos defensivos químicos causada pelo uso abusivo desses produtos criou uma demanda por alternativas mais sustentáveis, baratas e eficazes para o controle de pragas e doenças de plantas (PARRA, 2014).

Em resposta a essa demanda, o mercado de defensivos biológicos cresceu e com ele, cresceu também a necessidade de conhecimento científico e tecnológico (VIDAL et al., 2022) à respeito da produção de alto padrão e em larga escala desses insumos em propriedades rurais para consumo próprio, ou seja, sobre a produção de bioinsumos *on farm*. A premissa para esse tipo de produção é de que a estrutura fabril tenha condições mínimas para garantir que o microrganismo alvo da produção prevaleça no meio de cultura (BOCATTI et al., 2022), com o mínimo de assepsia necessária para evitar contaminações (VALICENTE et al., 2018), para, portanto, garantir a qualidade exigida dos defensivos biológicos. O ideal é que a estrutura da biofábrica contenha: a) área de fermentação, equipada com bioreator que realize controles de temperatura, oxigenação do meio de cultura, espuma e pH, e capaz de realizar ciclos de esterilização do meio de cultura e de limpeza; b) área de utilidades, que comporte os equipamentos que dão suporte à fermentação, como gerador de vapor, torre de resfriamento, compressor de ar; c) áreas de estoque e de armazenamento de produtos acabados, de preferência separadas; d) área de controle de qualidade, sendo que todas essas áreas devem ser limpas e

livres de insetos e roedores, passando por desinfecções frequentes (MONNERAT et al., 2020b), e e) responsável técnico e funcionários capacitados (XAVIER, 2022).

## 1.2 OBJETIVOS

- Hipótese;

É possível obter alta qualidade em defensivos produzidos na própria fazenda semelhante à alcançada em produtos fermentados que utilizam a metodologia definida para produção em pequena e média escalas pelo Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas (LBE) da Embrapa CENARGEN.

- Objetivos:
  - Produzir seis espécies de bactérias do gênero *Bacillus* para controle biológico de pragas e doenças e
  - Validar o processo de produção em larga escala, a partir da metodologia descrita por MONNERAT et al. (2020).

## REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 O MERCADO BRASILEIRO DE DEFENSIVOS BIOLÓGICOS

A agricultura é um dos principais pilares da economia brasileira, pois gera renda, empregos, alimento para a população e commodities para exportação, além de estimular o desenvolvimento tecnológico no setor. O clima tropical do Brasil permite mais de uma produção por safra, mas favorece a manutenção dos patógenos e dos insetos vivos nas lavouras, que dificultam o controle de doenças e pragas importantes, causando grandes perdas aos produtores. Entretanto, a biodiversidade do Brasil é tão grande, que possibilita a criação de soluções alternativas para esses problemas do campo (XAVIER, 2022).

A produção extensiva de monoculturas, como algodão, feijão, milho e soja demandam altos investimentos em insumos, tanto de defensivos químicos, para o controle dessas doenças e pragas (MONNERAT et al., 2007), quanto de fertilizantes minerais, adubos e corretivos de solo, para a nutrição do solo e boa produtividade. O alto custo dos insumos no Brasil, especialmente de defensivos químicos, pode tornar uma produção agrícola financeiramente inviável (MONNERAT et al., 2007; MONTALVÃO et al., 2021).

O Manejo Integrado de Pragas e Doenças (MIPD) agrícolas é uma prática importante para reduzir o consumo desses produtos, seja por razões de combate à resistência dos insetos e patógenos aos ingredientes ativos, por empregar opções de controle mais seguras ao meio ambiente ou por reduções de custo (VAN LENTEREN; BUENO, 2003). Esse tipo de manejo surgiu da necessidade de se resolver problemas resultantes do uso abusivo dos defensivos químicos nas lavouras brasileiras, problema que foi observado pelos agricultores e pela comunidade científica (BUENO et al., 2021). O MIPD é composto por um conjunto de estratégias de controle, sendo uma delas a utilização de defensivos biológicos, com o objetivo

de manter os níveis de densidade populacional de pragas ou de patógenos causadores de doença abaixo do nível de dano econômico (PARRA, 2014; ROTOLO et al., 2016), já que as plantas toleram um certo nível de dano sem resultar em perdas econômicas relevantes (BUENO et al., 2021). Além disso, as plantas estabelecem interações diferenciadas a depender do tipo de microrganismo com o qual entraram em contato, podendo ser microrganismos patogênicos ou benéficos (YANG et al., 2022).

Dentre seus diversos benefícios, os bio defensivos estimulam a biodiversidade, uma vez que são inseridos no ambiente agrícola, microrganismos ou insetos que são inimigos naturais diferentes dos que estão presentes em maior quantidade em determinada área, para se reduzir os patógenos do agroecossistema. Outro benefício é a redução do consumo de defensivos químicos, restringindo o potencial poluidor da prática agrícola e os casos de fitotoxicidade nas plantas e de resistência das pragas e patógenos aos ingredientes ativos de defensivos químicos, além de reduzir a quantidade de compostos carcinogênicos e alergênicos dos alimentos, tornando-os mais seguros para o consumo humano (ERJAE; SHEKARFOROUSH; HOSSEINZADEH, 2019; KILANI-FEKI et al., 2016; ROTOLO et al., 2016; VAN LENTEREN et al., 2018).

A utilização dos bio defensivos também estimula o desenvolvimento econômico sustentável, ao melhorar a qualidade de vida de funcionários e residentes de fazendas em que a produção agrícola é realizada de maneira extensiva, ao reduzir custos com a aquisição de insumos químicos e fertilizantes minerais e ao estimular a indústria de bioinsumos em pequena e em larga escalas (VAN LENTEREN et al., 2018). Diversas iniciativas ecológicas e políticas incentivam o crescimento desse mercado de defensivos biológicos em escala mundial (VLAJKOV et al., 2022). O mercado externo, ou seja, o importador de produtos agropecuários brasileiros, é um dos responsáveis pelo aumento da demanda por defensivos biológicos para consumo interno no Brasil. Esses países importadores possuem regras rígidas que restringem a

entrada de produtos que apresentem altas concentrações de resíduos químicos provenientes dos agrotóxicos (VIDAL et al., 2022). Por essa razão, foi necessário desenvolver um controle do que é exportado e, conseqüentemente, cresceu também a demanda por pesquisas sobre controle biológico de pragas e doenças agrícolas (PARRA, 2014).

Já em âmbito nacional, quando o decreto 6.913 de 23 de julho de 2009 foi publicado, iniciou-se o processo de incentivo à produção de bioinsumos nas fazendas para uso exclusivamente próprio, sem a possibilidade de comercialização desses produtos, ou seja, esse decreto regulamentou a dispensa do registro dos produtos fitossanitários de origem microbiológica para uso exclusivamente próprio que são aprovados para a agricultura orgânica. Desde então, esse tipo de produção, também conhecida como produção *on farm*, cresceu significativamente (XAVIER, 2022).

Em 2020, houve a criação do Programa Nacional de Bioinsumos (PNB), criado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e instituído pelo Decreto n° 10.375, de 26 de maio de 2020. De acordo com esse Decreto, é considerado um bioinsumo o produto, o processo ou a tecnologia de origem vegetal, animal ou microbiana, destinado ao uso na produção, no armazenamento e no beneficiamento de produtos agropecuários, nos sistemas de produção aquáticos ou de florestas plantadas, que interfiram positivamente no crescimento, no desenvolvimento e no mecanismo de resposta de animais, de plantas, de microrganismos e de substâncias derivadas e que interajam com os produtos e os processos físico-químicos e biológicos (BRASIL, 2020). Esse é um instrumento bastante amplo que estimula a ciência, a tecnologia e a inovação e promove práticas sustentáveis de controle de pragas e doenças agropecuárias, que atendem a demandas coletivas importantes, como a preservação de recursos naturais, segurança alimentar, saúde e outros. Como consequência dessas mudanças, o decreto 10.833 de 07 de outubro de 2021 expandiu a utilização desses produtos para além do sistema

de produção orgânico, permitindo-o também no sistema convencional de produção agrícola (GOULET, 2021; XAVIER, 2022).

Dentre os objetivos estratégicos do PNB, está o de estimular a geração e disseminação de conhecimento e informações qualificadas sobre desenvolvimento, produção e uso dos bioinsumo, tendo um papel relevante de entregar instrumentos e ferramentas sustentáveis aos produtores rurais para o controle de pragas de forma mais sustentável. Uma das formas de viabilizar esses objetivos é oferecendo acesso a linhas de crédito e outros instrumentos econômicos que possibilitem esse investimento, produção e uso dos bioinsumos, o que inclui a construção de biofábricas voltadas à fabricação de bioinsumos (XAVIER, 2022).

No entanto, uma das dificuldades que o mercado de defensivos biológicos enfrenta é alcançar o nível de expectativa estabelecido pelos consumidores para a eficiência que esses produtos devem alcançar, visto que a performance deles costuma ser comparada à dos defensivos químicos. De acordo com Hu et al. (2019), a baixa consistência de performance alcançada por esses produtos quando dessa comparação, reduz a credibilidade de atuação dos biológicos. Um fator relevante responsável por gerar essa inconsistência são os fatores abióticos, como pH do solo, concentração de minerais do solo e tensões de oxigênio, e os fatores bióticos encontrados pelos agentes de controle biológico no ambiente em que são aplicados, como as populações de patógenos alvo e não-alvo, população de microrganismos do solo em geral e as próprias plantas cultivadas na lavoura, reduzem a eficiência do controle biológico. Por medo de perdas significativas de produtividade ao notar aumento da incidência de pragas ou doenças na lavoura, o produtor prefere aplicar defensivos químicos (BUENO et al., 2021).

Uma das formas de se melhorar essa consistência no controle biológico de doenças de plantas é a combinação de diferentes espécies ou isolados (geneticamente distintas) em uma mesma formulação, pois esses microrganismos possuem diferentes mecanismos de adaptação ao ambiente e de controle à doença alvo, fazendo com que esse conjunto de microrganismos

consiga expressar melhor seus métodos de controle do que um microrganismo sozinho (HU et al., 2019). Apesar dessa interação ser benéfica às plantas, esses microrganismos podem ser sensíveis a fatores bióticos e abióticos, como temperatura e composição da comunidade microbial, que podem interferir negativamente na qualidade dessas interações, em especial no sistema radicular das plantas, fazendo com que a absorção de água e nutrientes seja afetada (ISLAM; KABIR; KHAIR, 2019).

Testes conduzidos por Hu et al. (2019) a respeito do controle do fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, agente causal da doença conhecida como mofo-branco, na cultura da canola por meio da aplicação de três microrganismos no tratamento das sementes, *Bacillus megaterium* A6 e dois isolados de *Bacillus subtilis*, BY-2 e Tu-100, demonstraram que o isolado BY-2 apresentou melhor capacidade de controle da doença quando aplicado isoladamente em solos com texturas variadas. No entanto, a combinação dos três isolados resultou em uma leve queda na doença quando comparado aos tratamentos com os isolados separados. Apesar disso, não foram reportados aumentos representativos na produtividade nesses tratamentos em conjunto.

Os bioinsumos são uma grande inovação na agricultura, que tem potencial para criar muitas oportunidades, como renda, empregos e desenvolvimento científico e tecnológico a uma região em razão dos projetos de pesquisa e desenvolvimento realizadas sobre o tema (GOULET, 2021; VIDAL et al., 2022). Diversas delas tem sido realizadas com objetivos variados: desenvolver novos produtos, seja por descobrir uma nova espécie ou isolado, ou por criar consórcios de microrganismos; otimizar processos já estabelecidos, como refinar os parâmetros fermentativos; desenvolver novos meios de cultura e estabilizantes com matérias primas de menor custo ou com maior eficiência de produção; verificar as reações negativas que os fatores bióticos e abióticos causam na performance dos microrganismos; manipulações genéticas de microrganismos, entre outras (BONATERRA et al., 2022; STAMENKOVIC-STOJANOVIC et al., 2019; VLAJKOV et al., 2022).

De acordo com o Catálogo Nacional de Bioinsumos<sup>1</sup>, até o dia 09 de agosto de 2022, o Brasil havia registrado 470 produtos biológicos para controle de pragas e doenças e 509 inoculantes biológicos, de origens e classes variadas, contendo agentes microbiológicos diversos (vírus, bactérias e fungos), macrobiológicos (ácaros, insetos e nematoides), semioquímicos (feromônios), bioquímicos (hormônios) e fitoquímicos (extratos vegetais) em sua composição. Dentre os 470 produtos de controle de pragas e doenças de plantas, 397 são produzidos a partir de microrganismos e compõem as classes de acaricidas, bactericidas, fungicidas, inseticidas e nematicidas microbiológicos. E dentre os microbiológicos, 110 possuem bactérias do gênero *Bacillus* em sua composição (Tabela 1).

Tabela 1: Número de produtos registrado pelo MAPA e apresentados no Catálogo Nacional de Bioinsumos, em duas atualizações.

<b>APP Bioinsumos</b>	<b>09/08/2022</b>	<b>09/11/2022</b>
<b>Total de produtos biológicos para controle de pragas e doenças</b>	470	501
<b>Agentes microbiológicos</b>	397	425
<b>Agentes macrobiológicos</b>		73
<b>Semioquímicos</b>		46
<b>Bioquímicos</b>		-
<b>Fitoquímicos</b>		14
<b><i>Bacillus</i> spp.</b>	110	118

Fonte: Aplicativo Bioinsumos (MAPA), último acesso em 17/12/2022.

Já no dia 09 de novembro de 2022, após uma atualização de dados, o aplicativo mostrou que a quantidade de produtos biológicos registrados cresceu para 501 produtos para controle de doenças e pragas e para 524 inoculantes biológicos (Figura 1). A quantidade de agentes microbiológicos cresceu 6,5% em dois meses, uma diferença de 31 novos ingredientes ativos

<sup>1</sup> Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inovacao/bioinsumos/o-programa/catalogo-nacional-de-bioinsumos> – último acesso em 17/12/2022.

de origem biológica, sendo 28 deles de origem microbiológica, das quais oito eram bactérias do gênero *Bacillus* (Tabela 1).

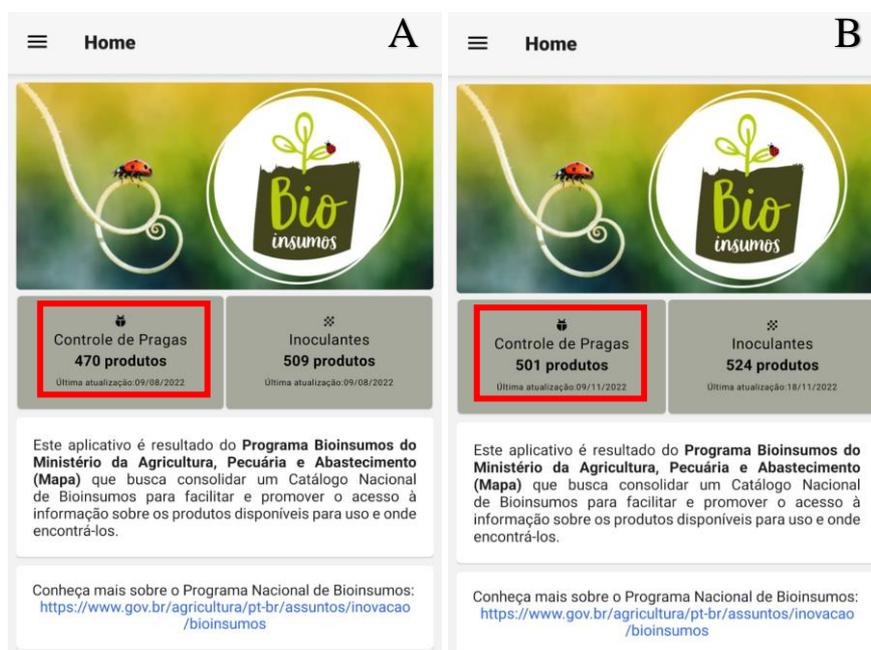


Figura 1: Página inicial do aplicativo do Catálogo Nacional de Bioinsumos, resultado do Programa Nacional de Bioinsumos do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). A imagem A mostra a atualização de agosto de 2022 e a imagem B, a de novembro de 2022.

O consumo de defensivos biológicos tem crescido exponencialmente no Brasil nos últimos anos. Em razão disso, o Brasil se tornou líder mundial na adoção de produtos biológicos, possuindo mais de 23 milhões de hectares tratados, segundo o Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA). Desde 2017, a quantidade de produtos biológicos disponíveis no mercado brasileiro duplicou, movimentando mais de R\$ 675 milhões em 2019 e o ano de 2020 apresentou tendência de crescimento desse montante, de acordo com a Crop Life Brasil<sup>2</sup>. Na safra 2019/2020 de soja, 2,5 milhões de hectares utilizaram produtos biológicos para controlar nematoides, um verme que causa sérios prejuízos nas culturas. Essa adoção corresponde a um

<sup>2</sup> Disponível em Crop Life Brasil: <https://croplifebrasil.org/produtos-biologicos/crescente-adocao-de-produtos-biologicos-no-mundo-e-o-brasil-e-protagonista-nesse-mercado/#sec12> (Acesso em 09/12/2022).

incremento de 45%, em relação à safra anterior (VIDAL et al., 2022). Em 2019, toda a indústria dos bioinsumos gerou um faturamento de R\$ 22 bilhões (GOULET, 2021).

Parte desses resultados se dá pelo desenvolvimento de novos produtos biológicos pelas indústrias e laboratórios de bioinsumos espalhados pelo Brasil. Após a criação desses novos produtos, existe a etapa de registro junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e ao MAPA para que esses produtos tenham a autorização para serem comercializados. Foi observado um aumento expressivo no número de registros de produtos biológicos com finalidade de controle biológico de pragas e doenças na agricultura nos últimos anos. O ano de 2020 foi o primeiro marco histórico, com a liberação de 95 novos registros. Em 2021, foram 92 registros. Já o ano de 2022 recebeu o novo marco na quantidade recorde de defensivos agrícolas registrados pelo MAPA, sendo 112 produtos de baixo impacto, de acordo com o Canal Rural<sup>3</sup>.

No Brasil, o consumo de bioinsumos ainda é muito pequeno quando comparado ao que se consome de defensivos químicos, mas considerando outros países, a expectativa de consumo de bioinsumos no Brasil em 2025 é de 14%, 4% superior à observada para o mundo, que é de 10%. Dessa forma, o país poderá se tornar menos dependente de produtos importados e estimulará o mercado interno de bioinsumos, restringindo também os riscos provenientes dessa dependência externa (XAVIER, 2022).

De acordo com a legislação vigente, defensivos biológicos se enquadram como agrotóxicos, apesar de serem diferentes por definição, sendo, portanto, regulados pela Lei dos Agrotóxicos, Componentes e Afins, a Lei 7.802 de 11 de julho de 1989 (XAVIER, 2022).

## 2.2 O GÊNERO *Bacillus*

O gênero *Bacillus* contém mais de 260 espécies e sete subespécies de bactérias (LANA et al., 2019), sendo que algumas já são muito utilizadas como ingredientes ativos nos produtos

---

<sup>3</sup> Disponível em Canal Rural: <https://www.canalrural.com.br/noticias/agricultura/ministerio-da-agricultura-aprova-45-novos-defensivos-agricolas/> (Acesso em 17/12/2022).

biológicos; estes microrganismos estão presentes no solo, na superfície das plantas, em resíduos orgânicos em decomposição, na rizosfera, no interior das plantas ou em grãos armazenados (FIRA et al., 2018; MONTALVÃO et al., 2021). As bactérias do gênero *Bacillus* atuam como biorreguladores, promotores de crescimento e agentes de controle biológico de pragas e doenças, pois produzem compostos, como toxinas, enzimas hidrolíticas, lipopeptídeos, compostos voláteis, fitohormônios, sideróforos, cianetos e metabólitos secundários, capazes de inibir ou eliminar os agentes causais desses distúrbios (KILANI-FEKI et al., 2016; MONTALVÃO et al., 2021; POSADA-URIBE; ROMERO-TABAREZ; VILLEGAS-ESCOBAR, 2015; STAMENKOVIC-STOJANOVIC et al., 2019; VEHAPI et al., 2022). Além disso, algumas espécies também são capazes de elevar a absorção de nitrogênio e fósforo pelas plantas, pois atuam nos processos de fixação biológica de nitrogênio (FBN) e na solubilização de fósforo (STAMENKOVIC-STOJANOVIC et al., 2019).

A supressão de patógenos causadores de doenças em plantas pode ser estimulada por essas bactérias por meio de diferentes modos de ação. Uma delas é a indução à resistência sistêmica adquirida, que é estimulada por lipopeptídeos produzidos pelos *Bacillus* spp. (ROTOLO et al., 2016); outra é a atividade diretamente antagonista expressa pela liberação de antibióticos ou pela competição por espaço e nutrientes (COSSUS, 2021). Alguns metabólitos secundários também possuem capacidade antibiótica ou inibitória a bactérias fitopatogênicas. Um exemplo é a subtilina, produzida pelo *Bacillus subtilis*, um lantipeptídeo, classificado como bacteriocina classe I, que causa morte celular de diversas bactérias Gram-positivas. A mersadicina, lantipeptídeo de mesma classificação, possui ação inibitória da biossíntese de parede celular e é produzido pelo *Bacillus amyloliquefaciens*. Já a amylociclina, também produzida por essa espécie, é uma bacteriocina cíclica classe II com atividade inibitória contra bactérias Gram-positivas. *B. thuringiensis* e *B. cereus* produzem Zwittermicina A, que é um antibiótico aminipolyol que apresenta atividade antagonista contra microrganismos patogênicos, como

oomicetos, fungos e bactérias. Esse metabólito secundário causa distúrbio de paredes celulares, inibição da síntese de RNA em fungos, se liga ao DNA, o que resulta em indução de resposta à resistência nas hospedeiras (DIMKIĆ et al., 2022). As subtilases possuem papel importante no funcionamento tanto de plantas, como de patógenos; auxiliam na germinação de sementes, na modificação de paredes celulares de fungos e possuem uma resposta mais ativa sob estresse biótico ou abiótico, como estresse hídrico ou deficiência de nutrientes (YANG et al., 2022).

De forma geral, os *Bacillus* spp. produzem também diversas enzimas hidrolíticas, capazes de degradar paredes celulares e seus componentes, principalmente em fungos patogênicos, controlando o crescimento desses microrganismos e os produtos da hidrólise podem ser usados como fonte de carbono. Algumas das principais enzimas hidrolíticas produzidas pelo gênero são as quitinases, glucanases, proteases, celulasas e xilanases (DIMKIĆ et al., 2022). As quitinases e glucanases são enzimas mucolíticas, que dissolvem a parede celular de fungos; lipopeptídeos como surfactinas e iturinas também tem ação sobre as paredes celulares, causando a formação de poros nas membranas celulares, o que resulta na morte celular e inibição do crescimento dos fungos (YANG et al., 2022).

Já a capacidade inseticida é decorrente da produção de diferentes fatores de virulência, como as  $\delta$ -endotoxinas, alfa-exotoxinas, beta-exotoxinas, hemolisinas, enterotoxinas, quitinases e fosfolipases. Durante o crescimento vegetativo, algumas estirpes produzem também outras toxinas, denominadas proteínas inseticidas vegetativas (Vip) e proteínas inseticidas secretadas (Sip) (MONNERAT et al., 2020a).

### 2.3 ALGUMAS ESPÉCIES DE BACTÉRIAS DO GÊNERO *Bacillus* DE IMPORTÂNCIA AGRÍCOLA

- *Bacillus thuringiensis* (Bt)

Essa espécie de *Bacillus* é conhecida no mundo, principalmente por sua capacidade inseticida, decorrente da produção de diversas toxinas e outros compostos de alta virulência, como endo, entero e exotoxinas, especialmente as toxinas Sip e Vip e as proteínas Cry e Cyt (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007; MONNERAT et al., 2020a). As proteínas Cry e Cyt são eficientes contra diferentes ordens de insetos, como Lepidoptera, Coleoptera e Diptera, além de nematoides. As proteínas Cry agem na lise de células epiteliais do intestino desses insetos, ao se inserirem em receptores nas membranas e formarem poros. Os cristais do *B. thuringiensis* são compostos pelas proteínas Cry, que interagem com receptores específicos da célula hospedeira e são ativadas por proteases desse hospedeiro após a ligação do receptor, que resulta em uma estrutura pré-poro que é a inserção competente. Já as toxinas Cyt interagem diretamente com os lipídeos da membrana e conseguem assim se inserirem nela (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007).

Estirpes de *B. thuringiensis* são encontradas no mundo todo, em diferentes substratos, sendo que as subespécies mais frequentemente encontradas são a *kurstaki* e a *galleriae*. Algumas estirpes conseguem produzir e secretar proteínas com propriedades inseticidas no meio de cultura durante o crescimento vegetativo. São as proteínas Vip1, Vip2 e Sip, que se dividem em classes diferentes. As Vip1 e 2 possuem alta atividade inseticida contra coleópteros e hemípteros, enquanto a Sip atua contra diversas espécies de lepidópteros (MONNERAT et al., 2020a).

Os principais sintomas observados em larvas de insetos suscetíveis após ingerirem os cristais e esporos de Bt, que são característicos de infecção decorrente dessa bactéria, são perda de apetite, abandono de alimentos, paralisia do intestino, diarreia, vômito, paralisia total e morte. Durante esse processo, a larva adquire uma coloração marrom-escura e após a morte, preta (MONNERAT et al., 2020a).

A utilização de *B. thuringiensis* no controle biológico de pragas tem sido reportada há pelo menos 85 anos. Em 1938 na França, foi produzido o Sporine, um produto à base dessa bactéria. Alguns anos depois, na década de 50, outros países da Europa, a União Soviética (URSS) e os Estados Unidos da América também começaram a produzir produtos biológicos à base de Bt. Além das toxinas e compostos virulentos mencionados anteriormente, o Bt produz diversos outros compostos e metabólitos secundários, como algumas moléculas bioestimuladoras e biofertilizadoras, fitohormônios, proteínas solubilizadoras de fosfato e sideróforos e proteínas parasporinas (MONNERAT et al., 2020a).

Por produzir um amplo espectro de toxinas, *B. thuringiensis* possui mecanismos de infecção diversificados, que fazem com que esta espécie controle diferentes ordens de insetos, como Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Himenoptera e Lepidoptera. Em razão dessa ampla capacidade de atuação, o Bt possui um potencial biotecnológico de grande valor, pois além de possibilitar a produção de vários defensivos biológicos, é fonte de genes que podem ser usados no desenvolvimento de plantas transgênicas. Apesar dos crescentes casos de resistência às toxinas Cry, a variedade de toxinas geradas por essa espécie permite que outros modos de ação possam ser aplicados, sem que o produto seja rejeitado pelo mercado (MONNERAT et al., 2020a).

- *Bacillus methylotrophicus*

Essa espécie possui capacidade de promover o crescimento de plantas, de biorremediar solos e controlar doenças de plantas por meio da produção de bacteriocinas, interações bastante benéficas para a agricultura (MONNERAT et al., 2020b).

A parte dessas interações referente ao controle de doenças se dá pela produção de metabólitos secundários, sideróforos e de enzimas hidrolíticas. Graças a esses compostos, as bactérias causam efeitos antagonista e inibitório ao crescimento de fungos como, *Fusarium oxysporum*, fungo causador da podridão basal em diversas culturas, *Alternaria* sp., que causa

alternariose em hortaliças, e *Colletotrichum capsici*, agente da antracnose (ISLAM; KABIR; KHAIR, 2019).

*Bacillus methylotrophicus* produz compostos que também auxiliam no controle de nematóides, como alguns lipopeptídeos, iturina, surfactina e fengycina, e outros que inibem o desenvolvimento de fungos fitopatogênicos, como a fenaminometilacetico. Esses compostos também podem promover a produtividade na cultura do algodão (MONTALVÃO et al., 2021).

- *Bacillus subtilis*

*Bacillus subtilis* produz diversos metabólitos secundários, enzimas e lipopeptídeos (KILANI-FEKI et al., 2016), benéficos não só à agricultura, como também à medicina. Por ser encontrada em solos e na rizosfera com maior facilidade, esta espécie coloniza as raízes de plantas, formando um biofilme que as protege (MONNERAT et al., 2020b). O controle de patógenos é realizado por proteínas tóxicas, que oferecem diversos benefícios à agricultura, uma vez que são pouco afetadas por efeitos bióticos e abióticos, causam baixa indução de resistência nos patógenos e podem oferecer variados mecanismos de ação. Quando os genes desses compostos são isolados, podem ser usados em programas de biotecnologia e transferidos às plantas, resultando em plantas geneticamente modificadas com resistência a patógenos de importância econômica (ZHANG et al., 2021).

Os principais compostos produzidos pelo *B. subtilis* são peptídeos de baixo peso molecular, como os peptídeos cíclicos e lineares e lipopeptídeos cíclicos, que podem ser divididos em bacteriocinas, enzimas que degradam parede celular (glucanases, proteases e quitinases), além de diversas proteínas com funções inibitórias. Dentre essas proteínas, existe a *Bacisubina*, capaz de inibir o crescimento de uma grande variedade de fungos patogênicos (ZHANG et al., 2021).

Os modos de ação dos compostos antifúngicos produzidos por algumas estirpes induzem inchaço das hifas, lise e completa degradação da extremidade das hifas, ou seja, também tem como alvo a parede celular desses microrganismos. Os metabólitos produzidos apresentam resistência e estabilidade a altas temperaturas e à luz ultravioleta (KILANI-FEKI et al., 2016).

- *Bacillus pumilus*

Na agricultura, *B. pumilus* é usado como promotor de crescimento e para controlar diversos fungos (MONNERAT et al., 2020b). Essa atividade antifúngica ocorre devido à produção de compostos de peso molecular baixo, dos quais alguns sofrem desativação por tratamentos proteolíticos, ou seja, tratamentos que causam a decomposição de proteínas, e outros não se degradam. Um exemplo de composto produzido por essa espécie é a Pumilacidina, um lipopeptídeo que apresenta efeitos inibitórios ao crescimento de várias espécies de fungos patogênicos, como *Rhizoctonia solani*, *Pythium aphanidermatum* e *Sclerotium rolfsii*. Outro exemplo é de um peptídeo já mencionado em outras espécies de *Bacillus*, a iturina (ERJAE; SHEKARFOROUSH; HOSSEINZADEH, 2019).

*Bacillus pumilus* também produz diversas enzimas que possuem os fungos fitopatogênicos como alvo, como *Aphanomyces cochleoides*, *Rhizoctonia solani* e *Pythium ultimum*, que é um oomiceto (NIELSEN; SØRENSEN, 1997).

- *Bacillus licheniformis*

Essa espécie é usualmente utilizada como probiótico na medicina humana ou veterinária e na indústria química, para produzir detergentes. Além disso, possui boa atuação no controle de nematoides e, quando misturado com *B. subtilis*, promove o crescimento de plantas, como a soja (MONNERAT et al., 2020b).

Os mecanismos de ação empregados para o controle biológico nos quais o *B. licheniformis* se enquadra são o antagonismo, a competição, indução de resistência a doenças e promoção de crescimento, que apresentam eficiência contra fungos, oomicetos, nematoides e vírus. De acordo com Yang et al. (2022), pesquisadores conseguiram purificar e identificar a protease serina, que inibiu o crescimento de dez fungos patogênicos (*Botrytis cinerea*, *Pseudomonas amygdali*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Monilinia fructicola*, *Glomerella cingulata*, *Rhizopus stolonifer*, *Fusarium moniliforme*, *Gaeumannomyces graminis* e *Alternaria cerasi*) e de quatro bactérias patogênicas (*Xanthomonas arboricola*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas syringae* e *Aphelenchus avenae*), ou seja, possui amplo espectro de controle, e atestaram que esse composto é tolerante a altas temperaturas e a variações de pH, o que indica que ele possui alto potencial para ser utilizado como um biopesticida. O controle fúngico é realizado por alterar a estrutura das hifas e reduzir a germinação de esporos, além de induzir um mecanismo molecular de resistência antifúngica à planta, que ativa suas respostas de defesa e a resistência sistêmica (YANG et al., 2022).

*Bacillus licheniformis* apresenta diversos benefícios como defensivo biológico, como a resistência a temperaturas altas, produz grande variedade de enzimas e a segurança para o consumo humano, que pode ser exemplificada pelo pós-colheita de frutas, considerado um período sensível e propício ao surgimento de doenças nesses produtos. A utilização de *B. licheniformis* no pós-colheita de frutas, como o pêssego, se mostrou eficiente, pois além de controlar o crescimento de *Rhizopus stolonifer*, agente da podridão mole, também preservou os valores nutricionais da fruta e elevou a atividade enzimática da oxidoreductase, que reduziu o crescimento de lesões (WANG et al., 2023).

## 2.4 PRODUÇÃO ON FARM

Apesar de ser uma solução interessante e inovadora, os defensivos biológicos comerciais também apresentam alto valor monetário, fator que limita sua aquisição e utilização. Uma

solução para essa dificuldade é a produção *on farm*. Esse sistema de produção de bioinsumos é realizado em biofábricas localizadas nas propriedades rurais onde serão utilizados, ou seja, são os bioinsumos para consumo próprio (XAVIER, 2022). No entanto, ainda há diversos desafios a serem enfrentados, dentre eles o alto custo de produção, o que envolve o custo do meio de cultura e do estabilizante (VLAJKOV et al., 2022), e o alto investimento inicial para a instalação da biofábrica na propriedade rural, mão-de-obra qualificada escassa, pequena quantidade de publicações científicas disponíveis sobre o tema, principalmente devido ao segredo industrial que envolve tais produções acadêmicas. Deve-se também considerar os riscos das biofábricas *on farm*, que é produzir com segurança à saúde humana e ao meio ambiente, razão pela qual é indispensável o acompanhamento de atividades por profissionais qualificados e experientes (VIDAL et al., 2022; XAVIER, 2022).

A limitação de conhecimentos científicos e tecnológicos sobre o tema é um fator de risco para a produção *on farm*, visto que uma fermentação eficaz, ou seja, com altas concentrações de células, de estruturas de resistência, de compostos e de metabólitos secundários, depende de questões nutricionais do meio de cultura (relação C/N, minerais e vitaminas) e de fatores físico-químicos (pH, temperatura, concentração de meio de cultura, aeração, entre outros) e do prazo de validade do produto finalizado (formulação e estabilização) (KILANI-FEKI et al., 2016; STAMENKOVIC-STOJANOVIC et al., 2019; VEHAPI et al., 2022).

Apesar de ser fator limitante, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária possui papel relevante na formação de profissionais capacitados e nas publicações científicas produzidas sobre controle biológico de pragas e doenças. De acordo com a Embrapa<sup>4</sup>, a empresa investe há mais de 30 anos nas pesquisas sobre esse tema, período no qual criou e alimentou as Coleções de microrganismos e insetos, que são fundamentais para a continuidade das pesquisas; participou da elaboração de políticas públicas que incentivam a prática do controle biológico;

---

<sup>4</sup>Disponível em “Controle biológico”, Embrapa: <https://www.embrapa.br/tema-controle-biologico/sobre-o-tema>. Acesso em 17/12/2022.

estimulou a criação de empresas incubadoras; desenvolveu, em parceria com empresas privadas, produtos biológicos comerciais e auxiliou na instrução dos produtores rurais frente à atuação com a produção e utilização dos defensivos biológicos. Nesse sentido, foram criados manuais por laboratórios em diferentes unidades da Embrapa, especializados na produção de defensivos biológicos para guiar o produtor rural na sua produção de defensivos biológicos *on farm*. Um deles, o “Manual de produção e controle de qualidade de produtos biológicos à base de bactérias do gênero *Bacillus* para uso na agricultura” (MONNERAT et al., 2020b), desenvolvido pelo Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas (LBE) e lançado em 2020 pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, descreve a metodologia utilizada nos processos fermentativos realizados para esse trabalho de dissertação.

O primeiro ponto a ser considerado para a produção *on farm* a nível industrial é a definição dos microrganismos a serem multiplicados, tendo em vista quais são os alvos, insetos e/ou patógenos, e o mecanismo de ação que pode ser aplicado para seu controle (BONATERRA et al., 2022). A partir dessa informação, será possível determinar quais os melhores parâmetros de produção e a qualidade do meio de cultura, do estabilizante e tipo de formulação. Uma das grandes vantagens de se escolher as bactérias do gênero *Bacillus* para a produção de biodefensivos é a sua capacidade de produzir endósporos ou esporos, que são a estrutura de resistência desses microrganismos (DIMKIĆ et al., 2022; FIRA et al., 2018; VLAJKOV et al., 2022). A importância dos endósporos se dá por serem estruturas termotolerantes, mecanicamente resistentes que suportam fatores externos, como raios ultra violeta, baixa umidade, altas temperaturas e solventes orgânicos, fazendo com que sejam, portanto, muito resistentes a condições ambientais severas e também a alguns processos agressivos durante a fermentação em larga escala (STAMENKOVIC-STOJANOVIC et al., 2019). Outra vantagem, é a capacidade do *Bacillus* spp. utilizar nutrientes de diversas fontes, até mesmo de resíduos agroindustriais, o que pode reduzir alguns custos de produção (VLAJKOV et al., 2022).

É decisivo aclarar os mecanismos fisiológicos que acentuam ou inibem os processos de crescimento e esporulação das bactérias formadoras de esporos, assim como definir as demandas nutricionais para ambos processos. A esporulação é altamente dependente dos parâmetros de fermentação, como aeração, composição do meio de cultura, pH e temperatura (KHARDZIANI et al., 2017). Esses parâmetros físico-químicos de condução do bioprocessamento em biorreator são muito relevantes, pois influenciam na eficácia do processo produtivo, podendo variar de acordo com o isolado, interferindo também na eficiência de esporulação (POSADA-URIBE; ROMERO-TABAREZ; VILLEGAS-ESCOBAR, 2015; VEHAPI et al., 2022).

A formação dessas estruturas ocorre devido ao instinto de sobrevivência das bactérias, ao perceberem condições estressantes durante a fermentação, ou seja, quando sentem variações de temperatura, de pH e de oxigenação e exaustão de nutrientes. Para garantir uma boa concentração de esporos ao final do bioprocessamento, é importante que a esporulação inicie quando a densidade celular estiver em aproximadamente  $10^9$  células/mL. Para que isso ocorra, é necessário que as condições nutricionais e os parâmetros da fermentação sejam mantidos em níveis ótimos até que se alcance no mínimo tal densidade celular (STAMENKOVIC-STOJANOVIC et al., 2019).

Em meio líquido, o pH pode interferir na estabilidade e viabilidade dos esporos, sendo o pH de 6,8 o mais indicado para manter a estabilidade das estruturas e abaixo de 4,8, a viabilidade dos esporos é reduzida gradativamente (VEHAPI et al., 2022). O pH do meio de cultura pode interferir também na ocorrência de contaminações, pois caso a faixa do pH durante a fermentação não seja bem definida e controlada, pode alcançar níveis acima ou abaixo do intervalo de pH apropriado ao desenvolvimento do microrganismo alvo, fazendo com que o crescimento de microrganismos contaminantes seja favorecido (BOCATTI et al., 2022).

A temperatura durante o bioprocesso influencia na taxa de multiplicação celular ou reprodução, assim como no consumo de oxigênio, de carbono e de outras fontes de energia para os microrganismos (VEHAPI et al., 2022). A oxigenação do meio de cultura representa um fator relevante para a produção do defensivo biológico durante o processo de fermentação (VALICENTE et al., 2018). A relação entre agitação e aeração interfere na densidade celular durante a fermentação, pois perturba a dispersão do oxigênio em todo o meio de cultura, e também na produção de metabólitos secundários, mas não influencia na eficiência de esporulação (POSADA-URIBE; ROMERO-TABAREZ; VILLEGAS-ESCOBAR, 2015).

Os parâmetros para fermentação de bactérias do gênero *Bacillus* encontrados na literatura estão descritos na Tabela 2. Dentre os trabalhos encontrados, somente Vehapi et al. (2022) utilizaram reatores aeróbicos, os demais foram realizados em frascos Erlenmeyer incubados em incubadores shaker. É por essa razão que nessas publicações foram descritas as velocidades de agitação e não as faixas de oxigenação dos meios de cultura durante o bioprocessos.

Tabela 2: Parâmetros físico-químicos descritos na literatura:

<b>Isolado</b>	<b>pH</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Agitação (rpm)</b>	<b>Meio de cultura</b>	<b>Autores</b>
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>Kustaki</i> HD1	-	30	200	Meio NYSM	Da Silva et al., 2004
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>Kustaki</i> HD1	7	30	200	Meio Embrapa	Monnerat et al., 2007
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> B128	-	30	200	Meio NB	Rao et al., 2007
<i>Bacillus subtilis</i>	7	28	150	Diversos	Kilani-Feki et al., 2016

<i>Bacillus subtilis</i> QST713 e <i>Bacillus</i> <i>amyloliquefaciens</i> var. <i>plantarum</i>	7	28	150	Meio LB	Rotolo et al., 2016
<i>Bacillus</i> <i>thuringiensis</i> MA	-	28	180	Caldo nutritivo + Penicilina	Lobo et al., 2018
<i>Bacillus</i> <i>thuringiensis</i> subsp. <i>Kustaki</i> HD1	-	28	400	Meio Embrapa	Da Costa et al., 2020
<i>Bacillus subtilis</i> PTB 185	7	28	150	Meio Landy	Cossus, 2021
<i>Bacillus</i> <i>amyloliquefaciens</i> , <i>Bacillus</i> <i>methylophilus</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	8-9	32	-	Maltose, oxalato de amônio ou extrato de carne bovina e sulfato ferroso	Zhang et al., 2021
<i>Bacillus</i> spp.	7	28	150	Meio Embrapa	Montalvão et al., 2022
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	7	30 a 35	-	Meio TSB	Vehapi et al., 2022

A composição do meio de cultura é capaz de influenciar a densidade de células vegetativas e, conseqüentemente, a concentração de esporos (RAO et al., 2007). O que se busca é a maior concentração possível de esporos, cristais e metabólitos secundários, sendo necessário, portanto, fornecer os nutrientes e vitaminas que aquele microrganismo demandar durante todas as suas fases de desenvolvimento. Um meio de cultura de qualidade apresenta uma fonte de carbono, que fornece matéria prima para compostos celulares e energia para as células, uma fonte de nitrogênio, que é indispensável para as sínteses de proteína e de ácidos nucleicos, e sais minerais, que controlam a osmolaridade celular e atuam como cofatores. Podem ser adicionados antiespumantes ao meio, para reduzir a formação de espuma na esterilização do meio e no início do bioprocessamento, e alguns tampões, como fosfato (MONNERAT et al., 2020b).

O início do processo de esporulação usualmente acontece em sistema de *Quorum-Sensing* (detecção de quórum, tradução livre), seja em momento de alta densidade celular ou em situação de estresse, como quando ocorre a exaustão de nutrientes (POSADA-URIBE; ROMERO-TABAREZ; VILLEGAS-ESCOBAR, 2015). Para acompanhar o processo de esporulação, devem ser retiradas amostras numa frequência de 6 horas até a finalização, ou seja, quando o produto alcançou mais de 95% de esporulação, para a realização de microscopias. Quando finalizada a fermentação, deve ser retirada uma amostra do produto, com a qual são realizadas duas diluições seriadas, uma de amostra sem choque térmico e outra, com choque térmico, para avaliar a concentração de células vegetativas presentes nos produtos (MONNERAT et al., 2020b). Para uma boa produção desses defensivos, é de extrema importância que se tenha acesso a um bom isolado do microrganismo que se deseja produzir, que ele apresente uma boa capacidade de se multiplicar e se desenvolver em condições controladas.

Tabela 3: Intervalo de concentração de esporos estabelecido pelas Especificações de referência.

<b>Ingrediente ativo</b>		<b>Especificação de referência (ER)</b>	<b>UFC mínimo (UFC/mL)</b>	<b>UFC máximo (UFC/mL)</b>
<b>Espécie</b>	<b>Isolado</b>			
<i>Bacillus subtilis</i>	UFPEDA 764	ER n° 25 - IN n° 119, 12/01/2021	1,0 x 10 <sup>9</sup>	8,0 x 10 <sup>9</sup>
<i>Bacillus methylotrophicus</i>	UFPEDA 20	ER n° 27 - IN n° 119, 12/01/2021	5,0 x 10 <sup>8</sup>	4,0 x 10 <sup>9</sup>
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i>	HD-1 (S1450)	ER n° 28 - IN Conjunta n° 1, 28/11/2017	2,50 x 10 <sup>9</sup>	5,0 x 10 <sup>9</sup>
<i>Bacillus thuringiensis</i>	CBMAI 1398	ER n° 35 - IN Conjunta n° 2, 29/08/2018	2,0 x 10 <sup>8</sup>	2,5 x 10 <sup>9</sup>
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	CBMAI 1301	ER n° 37 - IN n° 25, 04/09/2019	1,0 x 10 <sup>8</sup>	2,0 x 10 <sup>9</sup>

FONTE: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)<sup>5</sup>.

<sup>5</sup> Disponível em Especificações de Referência, MAPA: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/produtos-fitossanitarios/especificacao-de-referencia>. Acesso em: 15/07/2022.

Para padronizar a faixa de concentração de esporos (UFC mínimo e máximo) de cada microrganismo ser considerada eficiente para defensivos biológicos, o MAPA estabeleceu as Especificações de Referência - Instruções Normativas (IN) de número 25, 119 e 170 e a IN Conjunta de número 1 (Tabela 3). Caso uma empresa tenha a intenção de registrar seu produto junto ao MAPA para que se torne um produto comercial, é necessário que esse pré requisito seja cumprido. As ERs podem ser usadas, portanto, como um guia por essas empresas.

## 2.5 DIFICULDADES DA PRODUÇÃO *ON FARM*

Apesar de tantos benefícios, alguns fatores ainda tornam a utilização dos microrganismos como agentes de controle de doenças de plantas pouco difundida comercialmente. O mecanismo de ação dos microrganismos é diretamente influenciado por fatores bióticos ou abióticos que interferem na relação entre planta, patógeno e agente de controle, nesse caso as bactérias. Alguns desses fatores se referem aos patógenos, como características genotípicas e densidade do inóculo na área, além de fatores ambientais específicos do local, que são razões para variações no nível de controle alcançado pelos microrganismos. Para reduzir essa variação, é importante conhecer a forma de ação do patógeno para definir o melhor agente de controle biológico a ser utilizado e a melhor forma de aplicação do produto, que pode ser feita por tratamento das sementes, aplicação em sulco de plantio, aplicação localizada na região radicular (fertirrigação, hidroponia ou gotejamento) ou pulverizações foliares (BONATERRA et al., 2022). Os autores também sugerem outras formas de favorecer a eficiência da ação dos agentes de controle biológico, como a adição de nutrientes na formulação que seriam assimilados com maior eficiência por esses agentes do que pelos patógenos; a aplicação de consórcios de microrganismos compatíveis que se complementam em relação a atuação contra o patógeno e podem apresentar efeito sinérgico de seus mecanismos de ação, além de alcançar um favorecimento de sua atuação em diferentes condições ambientais de acordo com o alcance

dos microrganismos em tais condições; o incremento de compostos antibióticos de baixa toxicidade, como óleos essenciais, biorreguladores e ácidos orgânicos; além de alterações genéticas (BONATERRA et al., 2022).

Diversas publicações científicas já encontraram problemas sérios em produtos biológico *on farm*, principalmente naqueles produzidos com equipamentos rudimentares e sem metodologia padronizada, em razão da grande quantidade de contaminações encontradas em análises técnicas (BOCATTI et al., 2022; LANA et al., 2019; VALICENTE et al., 2018). Esse alto índice de contaminações, geralmente, é resultado da manipulação indevida dos microrganismos e aplicação de processos, metodologias e tecnologias pouco eficientes. Esses produtos contaminados podem oferecer riscos à saúde pública, mesmo quando produzidos para consumo próprio, pois os funcionários precisam manusear os produtos, entrar nas áreas aplicadas e, se o produto da lavoura for consumido *in natura*, os consumidores também podem sofrer consequências em decorrência dos contaminantes presentes no alimento (BOCATTI et al., 2022; XAVIER, 2022).

Por essa razão, é importante que as propriedades rurais sigam as regras definidas de boas práticas para fabricação e manuseio de microrganismos durante a fermentação, para evitar a contaminação de microrganismos oportunistas que podem ter concentração mais alta do que a do microrganismo desejado. Algumas dessas espécies contaminantes podem, inclusive, ser resistentes a antibióticos, o que as torna ainda mais perigosas à saúde humana e animal (MONNERAT et al., 2020b; VALICENTE et al., 2018).

Muitos dos contaminantes observados nas amostras coletadas de inoculantes produzidos *on farm* em diversas propriedades espalhadas pelo Brasil, são potencialmente patogênicas a humanos e a plantas, ou seja, podem causar diversas doenças, e algumas demonstraram ser resistentes a antibióticos. Segundo Monnerat et al. (2020b) e Valicente et al. (2018), o risco às lavouras é alto, pois o gene de resistência a antibióticos pode ser dispersado pelo ambiente,

reduzindo as possibilidades de combater as infecções de microrganismos oportunistas. Esse risco é potencializado quando aplicados em culturas que podem ser consumidas *in natura*, pois a contaminação de humanos pode ser representativa. A grande maioria das amostras coletadas no estudo de Bocatti et al. (2022), 83%, foram de inoculantes a base de microrganismos produzidos *on farm* por meio de equipamentos rudimentares e de baixo custo, como caixas d'água, que não possuem nenhum sistema de controle de parâmetros físico-químicos de fermentação ou de contaminações. Ainda assim, as outras 17% de amostras foram produzidas em fermentadores simples, que também não possuíam os sistemas de controle adequados. Em consequência disso, segundo os autores, não foram encontrados os microrganismos alvo em nenhuma das amostras coletadas, o que mostra que os contaminantes suprimiram o microrganismo que se pretendia produzir e que, de fato, seria benéfico à produção (BOCATTI et al., 2022).

Parâmetros devem ser observados e seguidos corretamente durante os processos de fermentação de cada espécie de microrganismo para garantir que o produto final seja seguro e eficaz no controle de pragas e patógenos. Esses parâmetros envolvem desde cuidados com a infraestrutura e higiene da biofábrica, passando pela capacitação e capacidade técnica dos colaboradores, até o correto procedimento das práticas e dos processos fermentativos. Caso a produção seja feita sem o devido cuidado com essas condições, a proliferação de contaminantes pode se tornar perigosa, resultando no crescimento de patógenos que podem causar eventos danosos tanto a humanos quanto ao meio ambiente, ou gerar um produto ineficaz, no qual a concentração do microrganismo pretendido se torna muito baixa (MONNERAT et al., 2020b; XAVIER, 2022).

Xavier (2022) realizou um mapeamento de biofábricas ativas localizadas em fazendas no Brasil, por meio de um questionário disponibilizado aos associados do Grupo Associado de Agricultura Sustentável, o GAAS. O grupo possui 650 associados, mas o questionário foi

disponibilizado somente aos produtores rurais que fabricam seus próprios bioinsumos *on farm*, sem obrigatoriedade de resposta, e 27 desses produtores responderam. Foi informada a existência de 30 biofábricas *on farm* espalhadas por todo o território nacional, sendo três na região Norte, três na região Nordeste, nove na região Centro-oeste, onze no Sudeste e quatro na região Sul do Brasil (Tabela 4).

Tabela 4: Número de biofábricas mapeadas pelo Brasil, de acordo com dados coletados de produtores rurais associados ao GAAS.

<b>Quantidade de Biofábricas (GAAS)</b>			
<b>Estado</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Região</b>	<b>Quantidade</b>
<b>PA</b>	2	Norte	3
<b>TO</b>	1		
<b>AL</b>	1	Nordeste	3
<b>BA</b>	1		
<b>MA</b>	1		
<b>DF</b>	1	Centro Oeste	9
<b>GO</b>	4		
<b>MT</b>	1		
<b>MS</b>	3		
<b>MG</b>	6	Sudeste	11
<b>SP</b>	4		
<b>RJ</b>	1		
<b>RS</b>	3	Sul	4
<b>PR</b>	1		

Fonte: Xavier (2022).

A maioria das unidades industriais de bioinsumos estão concentradas principalmente no eixo Sul-Sudeste, o que limita a oferta para regiões mais distantes, devido ao prazo de validade desses produtos ser menor, já que são compostos por substâncias bioativas, quanto pelos custos da logística diferenciada para esse tipo de produto (VIDAL et al., 2022). Por esse motivo, é importante destacar que existem biofábricas espalhadas inclusive fora desse eixo, o que estimula o desenvolvimento desse mercado nessas regiões mais próximas aos locais de demanda e reduz as perdas de produto durante o transporte.

Por não ter sido instituída a etapa de fiscalização ou de registro das biofábricas *on farm* existentes no país, ainda não é possível se conhecer a quantidade exata de unidades existentes no Brasil. Por isso é importante a participação e atuação de associações que incentivam a utilização

dessa tecnologia. No entanto, as unidades que possuem produtos registrados passaram pela fiscalização das etapas e metodologias de produção e suas localizações geográficas foram divulgadas em “Biofábricas de Bioinsumos” na página de Bioinsumos do MAPA<sup>6</sup>. Até junho de 2020, data da última atualização dos endereços dessas empresas, havia registro de 90 biofábricas industriais de produtos para controle de pragas e doenças e 37 biofábricas industriais de inoculantes biológicos no Brasil.

## 2.6 CARACTERIZAÇÃO DE *Bacillus*

De acordo com o IBAMA (2020), os microrganismos utilizados como ingredientes ativos para defensivos biológicos, no controle de pragas e doenças agropecuárias, ou como biorremediadores, devem passar por uma identificação a nível de espécie. No caso das bactérias, deverá ser feito o sequenciamento molecular da região genômica que codifica a subunidade ribossomal 16S. As sequências utilizadas deverão conter um tamanho mínimo de 150 pares de bases. A identificação taxonômica será feita de acordo com a comparação com a banco de dados GenBank, sendo que o microrganismo selecionado deverá possuir pelo menos 97% de similaridade.

A reação em cadeia polimerase (*Polymerase chain reaction*) amplifica uma sequência conhecida do DNA da bactéria, o que permite a comparação entre estirpes diferentes dentro da mesma espécie e com o mesmo sorotipo (DA SILVA et al., 2004; MONNERAT et al., 2020a). Diversos oligonucleotídeos podem ser utilizados nessas reações para identificar genes específicos de bactérias do gênero *Bacillus* (MONNERAT et al., 2020a).

---

<sup>6</sup> Disponível em Biofábricas de Bioinsumo, MAPA: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inovacao/bioinsumos/o-programa/biofabricas-de-bioinsumos> (último acesso em 17/12/2022).

## MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 ISOLAMENTO DE *Bacillus* A PARTIR DE AMOSTRAS DE SOLO

- Coleta de amostras de solo

O isolamento de cepas de diferentes espécies do gênero *Bacillus* foi realizada com amostras de solo da fazenda Salgueiro da Serra, uma das fazendas do Grupo AgroSalgueiro, localizada em Buritis-MG a 155 quilômetros de Brasília-DF. A sede da fazenda está localizada nas coordenadas geográficas S15° 22' 9.28", W46° 50' 28.84" e a área experimental, nas S15° 22' 7.01", W 46° 51' 12.72" (Figura 2).

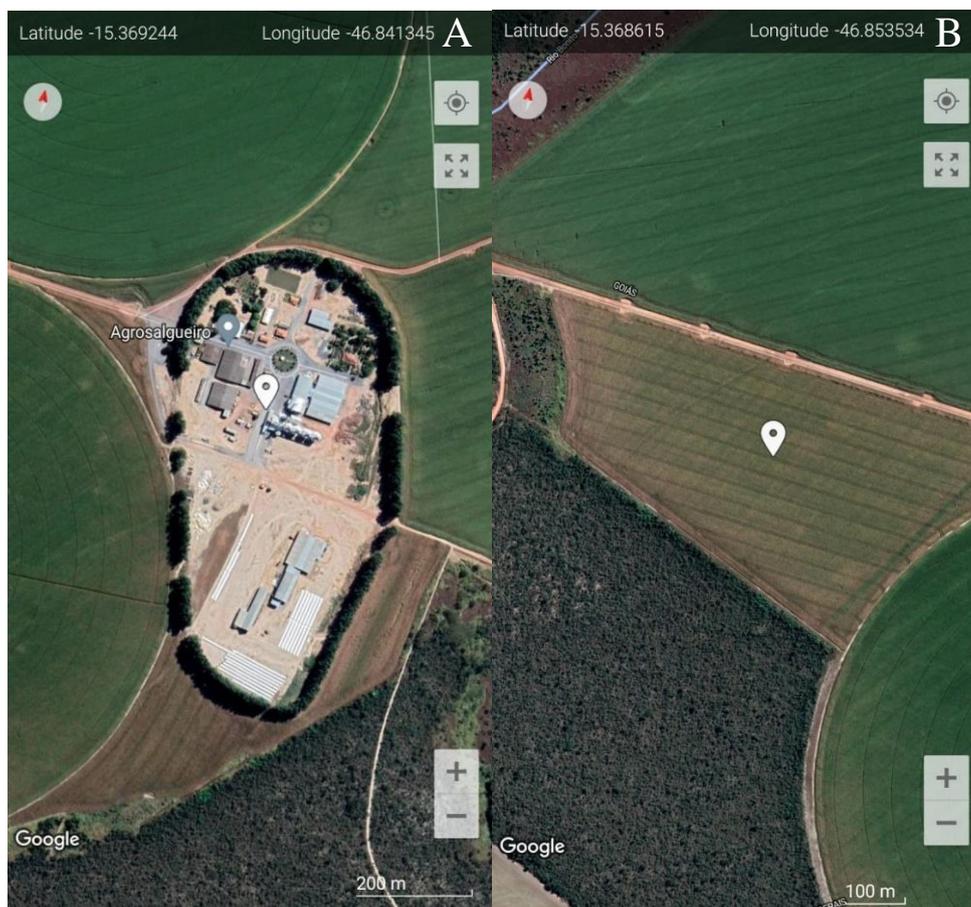


Figura 2: Imagens de satélite das localizações da sede da Fazenda Salgueiro da Serra (A) e da área experimental (B), de onde as amostras de solo foram coletadas.

As amostras de solo foram retiradas da área experimental da fazenda, a Área 1, onde tradicionalmente são rotacionadas as culturas de feijão (*Phaseolus vulgaris*), milho (*Zea mays*) e soja (*Glicine max*). O solo foi coletado a 5 e 10 cm de distância da base das plantas de soja, na profundidade de 0-10 cm. As amostras foram acondicionadas em sacolas plásticas, identificadas e mantidas à sombra até serem transportadas ao laboratório da fazenda.

- Isolamento de bactérias do solo

De cada amostra de solo, foram retiradas subamostras de dez gramas e transferidas para frascos Erlenmeyer de 125 mL com 90 mL de solução estéril de Tween 80 0,01% (v/v) (Figura 3). Os frascos contendo as amostras foram selados com papel-alumínio e filme plástico e colocados em incubadora shaker (Solab, modelo SL 102/250) à velocidade de 200 rpm, por 40 minutos, à temperatura de 30° C ( $\pm 2,0^\circ$  C).



Figura 3: Frascos Erlenmeyer 125 mL contendo solução Tween 80 0,01% e amostras de solo para isolamento de bactérias.

Foram retiradas duas alíquotas de 1 mL de cada frasco com o auxílio de micropipetas (Kasvi, modelo Basic Monocanal Volume Variável) de 100-1000 µL e colocadas em microtubos (tipo Eppendorf) de 2 mL, as quais foram submetidas a choque térmico. Esse procedimento tem o objetivo de submeter a amostra a condições extremas, das quais as células vegetativas não sobrevivem, somente as estruturas de resistência, como esporos, que se mantêm viáveis. A primeira etapa do choque térmico é o aquecimento a 80°C por doze minutos, realizado em placa térmica (Labnet, modelo D1301), seguido de resfriamento rápido por meio de banho de gelo por cinco minutos. Já os resultados “sem choque térmico” representam a composição total de células capazes de criar uma colônia, o que inclui as células vegetativas presentes na amostra que ainda não finalizaram seu ciclo completo até a liberação dos esporos. (MONNERAT et al., 2020b).

Foram realizadas as diluições seriadas para plaqueamento, nas quais 1 mL de cada amostra submetida ao choque térmico foi transferido a 9 mL de solução salina estéril com Tween 80 0,01% (v/v) e homogeneizada em agitador de tubos (LAB1000, modelo MX-S). Esse procedimento representa uma diluição de dez vezes (1:10), que foi repetido mais seis vezes, até se alcançar a diluição 1:10.000.000, sempre homogeneizando as soluções antes de transferi-las. Com a micropipeta, 100 µL de cada diluição foram semeadas e espalhadas sobre a superfície das placas de Petri com as alças de Drigalsky previamente flambadas em lamparina. Foram realizadas duas repetições para cada diluição. As placas foram vedadas com filme plástico e incubadas por 24 a 48 horas à temperatura de 30°C ( $\pm$  2,0°C) em estufa bacteriológica (Nova Técnica, modelo NT 525) (MONNERAT et al., 2020b).

O meio de cultura utilizado foi o MEIO EMBRAPA (ME), com a seguinte composição química: 8 g de caldo nutriente [composição por litro: 1 g de extrato de carne, 2 g de extrato de levedura, 5 g de peptona, 5 g de cloreto de sódio], 1 g extrato de levedura, 1 g fosfato de potássio [KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>], 14 g de ágar bacteriológico e 10 mL de solução de sais/ 1 litro de meio. [Composição

de 1 litro de solução de sais: 10 g de carbonato de cálcio –  $\text{CaCO}_3$ , 10 g de sulfato de magnésio hepta hidratado  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1 g de sulfato de ferro hepta hidratado -  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1 g de sulfato de manganês hidratado –  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 1 g de sulfato de zinco hepta hidratado-  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e 1 litro de água destilada]). Caracterização morfológica – Microscopia por contraste de fase

Durante o período de incubação, as placas foram observadas para acompanhar o crescimento das colônias e suas características morfológicas (LOBO et al., 2018), como coloração e aspecto das colônias e regularidade das bordas. Foi utilizada a microscopia com contraste de fase (100 x aumento, microscópio Olympus, modelo CX43) para determinar as características das espécies de *Bacillus* isoladas. As características analisadas foram as seguintes (MONNERAT et al., 2020b):

- a) Formato das células vegetativas;
  - b) Presença de esporos, seu formato e localização na célula vegetativa;
  - c) Presença de inclusões proteicas cristalinas bipiramidais e
  - d) Mobilidade das células.
- Caracterização molecular – preparação das amostras de DNA e reação em cadeia polimerase em tempo real (q-PCR)

Na primeira etapa da caracterização foi realizada a coleta de células vegetativas jovens (de uma placa de Petri com meio EMBRAPA inoculada com cada isolado e mantida em estufa bacteriológica por aproximadamente 16 horas) em quantidade suficiente para isolar o DNA. Para isso, foram usadas uma sequência de enzimas. A primeira, a Lisosina, para diferir as paredes celulares; depois foi adicionada a proteinase K-lise, que libera o DNA das células vegetais, e por fim a RNase, que quebra as cadeias de RNA.

Foi então realizada a coleta do DNA e em seguida a lavagem dessas amostras para retirar impurezas. A etapa seguinte foi quantificar o DNA de cada amostra com o auxílio do Quantificador Qubit Fluorometer, para que fossem feitas diluições padronizadas de cada uma, seguindo as instruções do fabricante. Nesse caso, a concentração padrão foi de 10 µg de DNA/mL. De cada colônia isolada do solo, foram feitas duas amostras, totalizando doze amostras.

Iniciou-se então a caracterização molecular, com o q-PCR. Os primers utilizados foram desenvolvidos e validados no Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas da Embrapa (dados não publicados e em sigilo) e através deles podem ser identificadas 25 espécies do gênero *Bacillus*.

- Definição dos parâmetros físico-químicos para as fermentações:

Foi realizada uma revisão bibliográfica por parâmetros físico-químicos utilizados em fermentações de *Bacillus* spp., que foram testados em frascos Erlenmeyer de 125 mL com 20 mL de meio de cultura Embrapa e inoculados com esporos coletados por alça microbiológica descartável de 1 µL de uma das colônias isoladas do solo, a de *Bacillus thuringiensis*. O melhor resultado de concentração de esporos definiu qual combinação de parâmetros foi utilizada como padrão para as etapas seguintes do trabalho. É importante considerar que o fator agitação revisto na literatura foi empregado somente em fermentações em frascos Erlenmeyers em incubadora shaker/agitador orbital para garantir a oxigenação do meio de cultura. Nas etapas de bioprocessos em reatores, a oxigenação do meio de cultura (mínimo de 20%) foi empregada como parâmetro para controlar o fluxo de entrada de ar no reator e a agitação do meio.

Para avaliar quais dos parâmetros encontrados na literatura (como temperatura, pH, agitação e tempo de processo) seriam aplicados nas etapas de bioprocessos seguintes, foram realizados testes em frascos Erlenmeyer 125 mL com 20 mL de meio Embrapa. Após validados,

todos os isolados foram produzidos seguindo as condições de pH, temperatura e, quando em incubadora shaker, agitação.

### 3.2 ESTABELECIMENTO DO PROCESSO EM FERMENTADOR DE 100 LITROS NA EMBRAPA

Após selecionadas e caracterizadas as cepas, deram-se início às etapas de fermentações. Na primeira, foram realizadas três fermentações para cada uma dessas cepas em reator aeróbico de 100 litros localizado no Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas (LBE) na EMBRAPA CENARGEN e na última etapa, em reator aeróbico de 1000 litros, localizado na Biofábrica de Bactérias da Fazenda Salgueiro da Serra, ambas com controles de temperatura, pH, oxigenação, pressão e espuma e com o meio de Cultura AgroSalgueiro (Composição não identificada pelo fabricante, mas que segue o recomendado por Monnerat et al., (2020b). Relação C/N de 1 a 0,66).

Foram preparados dois pré-inóculos para cada cepa. Dois frascos Erlenmeyer de 125 mL com 20 mL de Meio Embrapa foram inoculados com esporos das colônias isoladas, coletadas com o auxílio de alças microbiológicas descartáveis de 10 µL. Os frascos foram identificados e incubados em incubadora shaker por 48 a 72 horas, a 30°C e 200 rpm de agitação. Ao final deste período, amostras de ambos os frascos foram analisadas por microscopia de contraste de fase e plaqueamentos em meios de cultura seletivos para atestar a pureza do pré-inóculo, ou seja, para garantir que não houve contaminação por outros microrganismos. Em seguida, foi preparado o inóculo de 500 mL em frasco Erlenmeyer de 2 L, incubado em incubadora shaker por oito a doze horas, a 30°C e 200 rpm de agitação. O intervalo menor de agitação é aplicado para garantir que as células inoculadas no reator sejam vegetativas e se encontrem na fase de desenvolvimento na qual ocorre alta multiplicação celular, também conhecida como fase log (MONNERAT et al., 2020b).

A primeira etapa da fermentação foi a esterilização do meio de cultura. É preciso abastecer o reator com o meio de cultura e o volume de água desejado (100 litros), acionar a agitação e iniciar o processo de aquecimento do reator para que alcance a temperatura de 120°C, pressão de 1,2 atm e permaneça nessas condições por 30 minutos, seguindo recomendação do fabricante. Dessa maneira, é possível garantir que não haverá microrganismos vivos naquele meio e conseqüentemente, não haverá competidores para a bactéria que desejamos produzir. Após esse processo, o reator foi resfriado para a temperatura de trabalho, 30°C ± 2°C, e o pH do meio foi corrigido, de acordo com os parâmetros validados da literatura (pH = 7,0 ± 0,2), estando, portanto, pronto para ser inoculado. Enquanto o biorreator esfria, as soluções de ácido, base e antiespumante foram conectadas ao reator, para realizar os controles de pH e de espuma quando necessário durante a fermentação.

A inoculação do meio de cultura estéril com as células do isolado desejado é a etapa seguinte do processo fermentativo. O conteúdo do frasco Erlenmeyer foi então inoculado no reator e o processo fermentativo acompanhado em intervalos de seis horas. Nesses momentos, amostras foram retiradas e analisadas em microscópio de contraste de fase para acompanhar o processo de desenvolvimento das células e a pureza do produto. Ao observar que ocorreu esporulação em mais de 95% das células, ou seja, que os esporos foram liberados do interior das células, o processo fermentativo foi encerrado e uma amostra desse produto seguiu para a etapa de Controle de Qualidade. Foram realizadas três repetições para cada um dos seis isolados.

### **3.3 ESTABELECIMENTO DO PROCESSO EM FERMENTADORES DE 1000 LITROS NA AGROSALGUEIRO**

Após realizados os processos no reator de 100 litros, as mesmas condições foram estabelecidas para as fermentações no reator de 1000 litros (Innovar, modelo IRY BIO 1000),

o que inclui os parâmetros físico-químicos, meio de cultura e procedimentos de análise no decorrer do processo. Iniciou-se, então, o preparo dos pré-inóculos em frascos Erlenmeyer de 125 mL com 20 mL de meio EMBRAPA cada, incubados em incubadora shaker (Solab, modelo SL 102/250) a 30°C de temperatura e 200 rpm, por 48 horas. Após atestada a pureza do conteúdo, os inóculos foram preparados. Seis frascos Erlenmeyer de 2 litros contendo 500 mL de meio EMBRAPA foram inoculados com 2 mL do pré-inóculo e incubadas nas mesmas condições de temperatura e agitação na incubadora shaker (Nova Técnica, modelo NT 714), por um período de 8 a 10 horas, fase do desenvolvimento em que ocorre intensa multiplicação das células vegetativas (fase log). Esse conteúdo deve, preferencialmente, ser inoculado imediatamente no reator.

No período em que o inóculo ficou em incubação, o biorreator foi abastecido com os 1000 litros de meio de cultivo e foi esterilizado à temperatura de 120°C e pressão de 1,2 atm por 60 minutos. O reator foi então resfriado até a temperatura de trabalho, 30°C ± 2°C, e o pH do meio corrigido, respeitando os parâmetros estabelecidos na etapa de produção anterior. Assim como na etapa anterior, enquanto o biorreator esfriava, as soluções de ácido, base e antiespumante foram conectadas ao reator, para realizar os controles de pH e de espuma quando necessário durante a fermentação.

Ao fim das 8 a 10 horas de incubação, o conteúdo do inóculo foi adicionado ao reator e o processo acompanhado da mesma maneira como na etapa anterior. Ao ser observada mais de 95% de esporulação, o processo foi encerrado e foram coletadas amostras para o Controle de Qualidade.

### **3.4 CONTROLE DE QUALIDADE DOS PRODUTOS FINALIZADOS**

A metodologia de diluição seriada já foi descrita em 2.1 “Isolamento de *Bacillus* a partir de amostras de solo”, “Isolamento de bactérias do solo” desse trabalho. A semeadura de

alíquotas de diluições em placas de Petri com Meio EMBRAPA sólido seguiu a metodologia, para as diluições com choque térmico e sem choque térmico. A incubação das placas foi feita em estufa bacteriológica por 12 a 18 horas a 30°C até que seja possível realizar a contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC), para determinar a concentração de esporos (UFC/mL) de cada um desses produtos.

Os resultados de concentração de esporos (UFC/mL) foram comparados entre si e aos intervalos de concentração estabelecidos como mínimos para determinadas espécies e isolados de *Bacillus*, quando houver, pelas Especificações de Referência, que serão mencionadas na Tabela 4 deste trabalho.

Também foram semeadas alíquotas de 100 µL da diluição de 10<sup>-3</sup> das amostras sem choque térmico em placas com meios de cultura sólidos seletivos, que detectam a presença de microrganismos considerados contaminantes de produtos biológicos, como coliformes termotolerantes, *Escherichia coli*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Salmonella* e fungos (MONNERAT et al., 2018) (Tabela 5).

Tabela 5: Meios de cultura comerciais para detectar microrganismos contaminantes durante o Controle de Qualidade:

<b>Meio de cultura seletivo</b>	<b>Contaminante</b>	<b>Especificação</b>
Ágar Bile cristal-violeta vermelho neutro	Coliformes termotolerantes	≤ 500 UFC
Ágar MacConkey	<i>Escherichia coli</i>	≤ 400 UFC
Ágar Confirmatório para <i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	≤ 50 UFC
Ágar Seletivo para <i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	0
Ágar Verde Brilhante	<i>Salmonella</i>	0
Ágar Sabouraud 4%	Fungos	0

Fonte: (MONNERAT et al., 2018)

Foram considerados como “Aprovados” no controle de qualidade os produtos que seguiram os pré-requisitos de enquadramento dentro ou acima do intervalo de concentração de esporos, definidos pelas Especificações de referência da Tabela 4, e quando não for detectada a presença de tais microrganismos contaminantes além dos limites especificados na Tabela 1.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DAS COLÔNIAS

As características analisadas nas colônias foram sua coloração, regularidade das bordas e aspecto. As mais recorrentes foram a coloração esbranquiçada e todas com bordas irregulares (Tabela 6).

Tabela 6: Características morfológicas das colônias observadas em placa de Meio Embrapa:

	Características das colônias		
	Formato	Coloração	Aspecto
<b>Colônia 1</b>	Bordas irregulares	Esbranquiçada	Fosco
<b>Colônia 2</b>	Bordas irregulares	Creme	Enrugado
<b>Colônia 3</b>	Bordas irregulares	Creme claro	Fosco
<b>Colônia 4</b>	Bordas regulares	Esbranquiçada	Brilhoso
<b>Colônia 5</b>	Bordas irregulares	Esbranquiçada	Fosco
<b>Colônia 6</b>	Bordas irregulares	Esbranquiçada	Fosco

As placas correspondentes às diluições  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$  (Figura 4) apresentaram colônias bem isoladas, sendo possível observar algumas características morfológicas e realizar a primeira seleção das possíveis colônias de *Bacillus*.

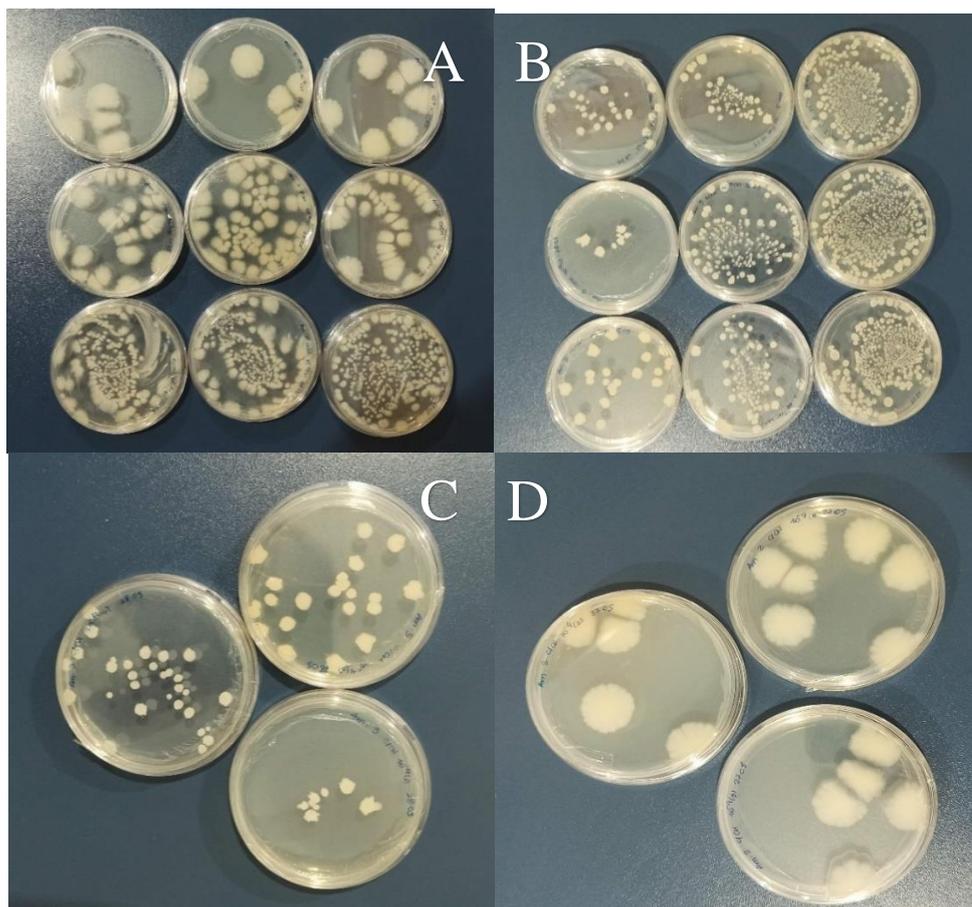


Figura 4: Registros de algumas placas contendo colônias de *Bacillus* isoladas a partir de amostras de solo. Placas de Petri (90x15 mm).

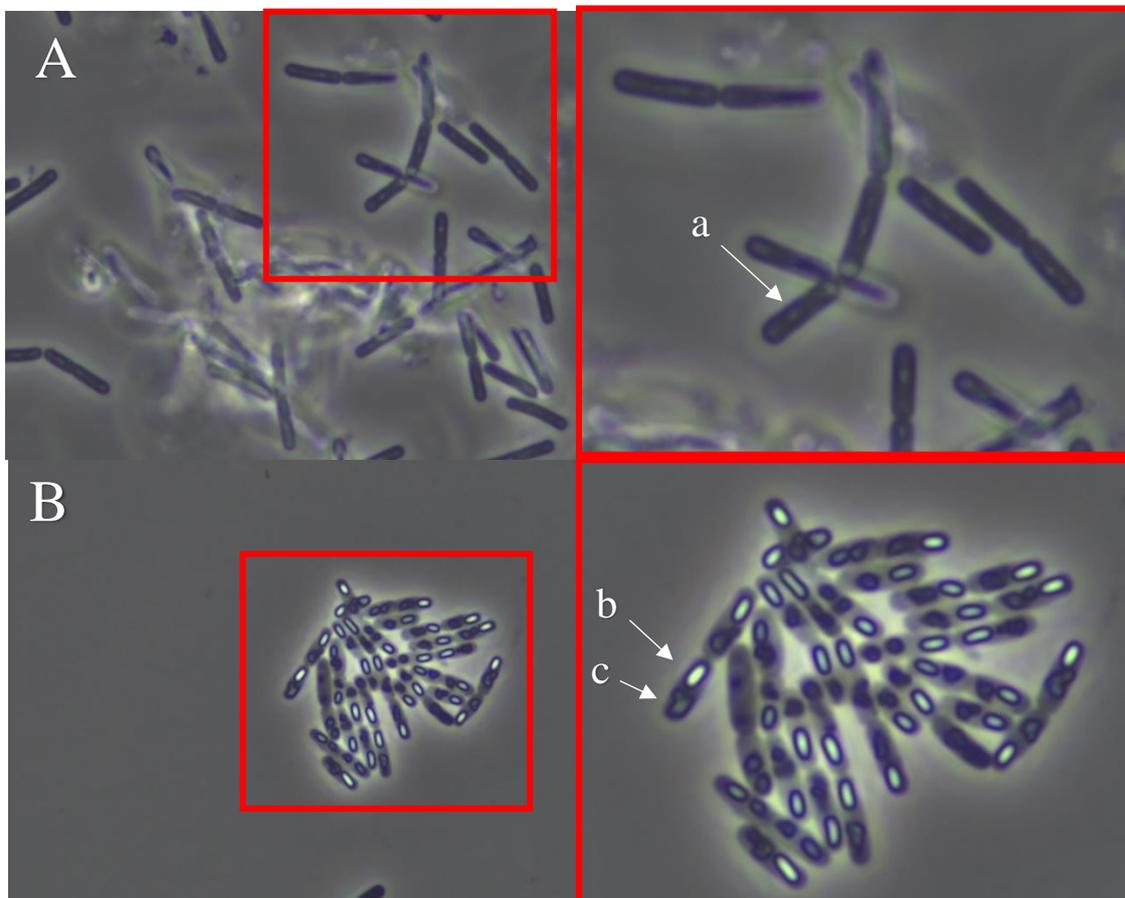
- Caracterização morfológica: Microscopia por contraste de fases:

Para as seis colônias encontradas que aparentavam ser do gênero *Bacillus*, foram observadas as seguintes características de células vegetativas, cristais e esporos (Tabela 7).

Tabela 7: Características morfológicas das células e esporos das colônias isoladas das amostras de solo:

	Células			Esporos		
	Formato células vegetativas	Mobilidade células	Presença Cristais Bipiramidais	Presença	Formato	Localização célula
<b>Colônia 1</b>	Cilíndrico	Móveis	Sim	Sim	Elíptico	Subterminal
<b>Colônia 2</b>	Cilíndrico	Móveis	Não	Sim	Elíptico	Subterminal
<b>Colônia 3</b>	Cilíndrico	Móveis	Não	Sim	Cilíndrico	Centro da célula
<b>Colônia 4</b>	Cilíndrico	Móveis	Não	Sim	Elíptico	Subterminal
<b>Colônia 5</b>	Cilíndrico	Móveis	Não	Sim	Elíptico	Subterminal
<b>Colônia 6</b>	Cilíndrico	Móveis	Sim	Sim	Elíptico	Subterminal

Através da análise microscópica, como demonstrado na Figura 5, foi possível confirmar que as seis colônias isoladas apresentavam características morfológicas que estão de acordo com as características descritas na literatura referente às bactérias do gênero *Bacillus*. Foram realizados, portanto, novos plaqueamentos para reisolar essas bactérias e garantir que não houvessem contaminações. Para isso, a colônia foi tocada levemente com uma alça descartável estéril de 1  $\mu\text{L}$  e riscada delicadamente sobre a superfície de placas de Petri com ME sólido. Esse procedimento foi repetido em 3 placas para cada colônia. As placas foram vedadas com filme plástico e incubadas por até 48 horas a temperatura de  $30^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 2,0^{\circ}\text{C}$ ). Durante esse período, as placas foram observadas e as que apresentavam colônias com aspectos e características diferentes foram descartadas.



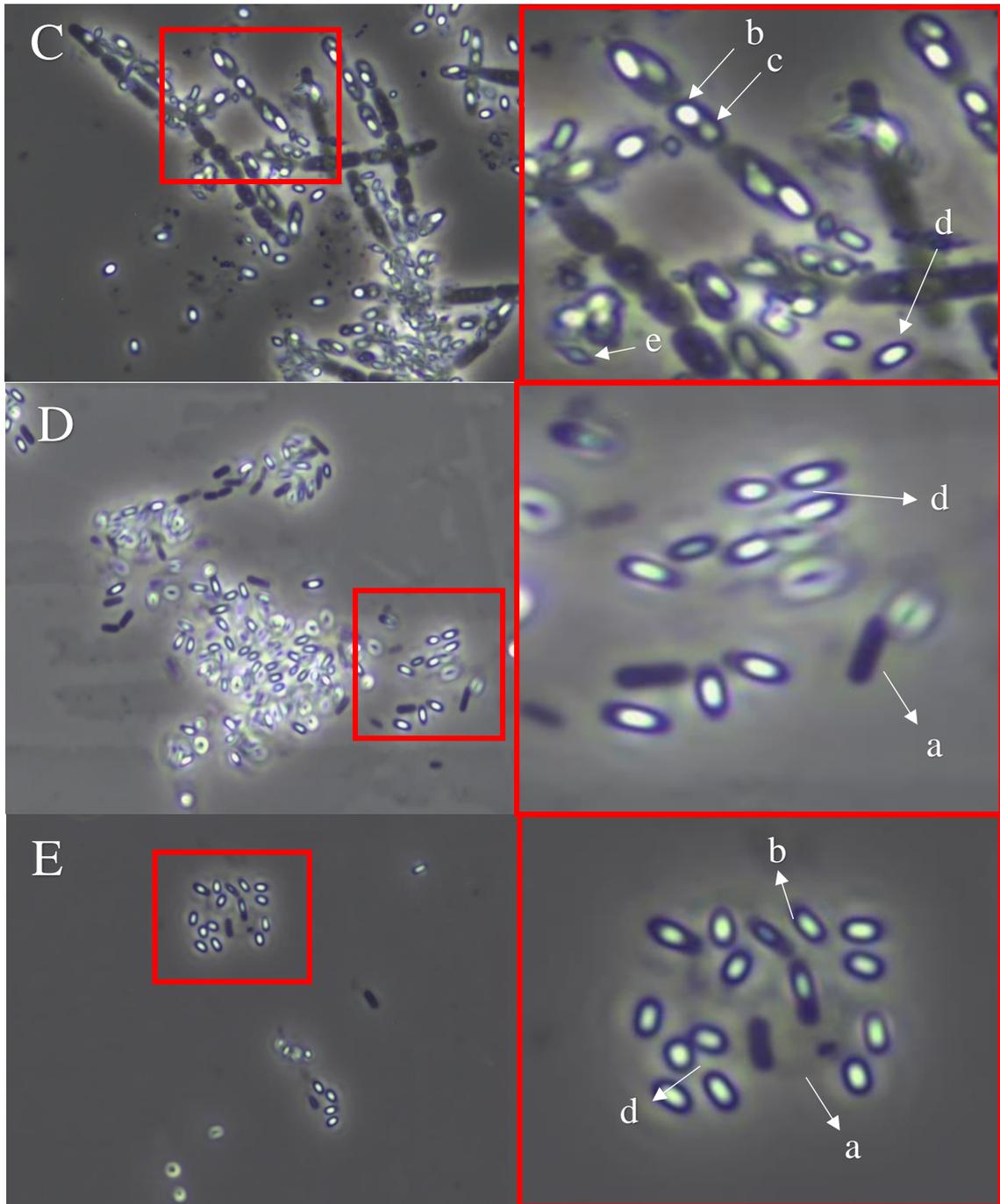


Figura 5: Imagens referentes à microscopia de contraste de fase das colônias 1 (A, B, C) e 2 (D, E), isoladas a partir das amostras de solo, com seus respectivos recortes (em vermelho) ampliados. A imagem (A) mostra a) as células vegetativas; (B) a formação dos b) esporos e c) cristais dentro da célula; (C) células contendo b) esporo e c) cristal bipyramidal em seu interior e d) esporos e e) cristais bipyramidais já liberados, (D) aglomerado de a) células vegetativas e b) esporos já liberados, e (E) pequeno aglomerado contendo a) célula vegetativa, b) esporo em formação dentro da célula e d) esporos liberados. Imagens com aumento de 400x com zoom por programa de computador.

- Caracterização molecular por PCR

Neste trabalho, o q-PCR foi utilizado para caracterizar as bactérias isoladas do solo e para realizar o sequenciamento genético, para então se verificar se eram homólogas a espécies e isolados já conhecidos (DA SILVA et al., 2004).

Tabela 8: Resultados da caracterização molecular de isolados do gênero *Bacillus*:

	<b>Espécie</b>
<b>Colônia 1</b>	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kustaki</i>
<b>Colônia 2</b>	<i>B. subtilis</i>
<b>Colônia 3</b>	<i>B. methylotrophicus</i>
<b>Colônia 4</b>	<i>B. pumilus</i>
<b>Colônia 5</b>	<i>B. licheniformis</i>
<b>Colônia 6</b>	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i>

As bactérias isoladas foram levadas ao Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas (LBE) na EMBRAPA CENARGEN, onde foram realizadas caracterizações moleculares por meio de q-PCR para confirmar a identificação das espécies isoladas do solo (Tabela 8).

Com o resultado das caracterizações moleculares realizadas, é preciso fazer algumas considerações quanto às características observadas em laboratório das colônias, células e esporos, como descritos nas tabelas 6 e 7. De acordo com Monnerat et al. (2020b), as características morfológicas das colônias e das células e dos esporos observadas na microscopia são compatíveis com as características apresentadas no manual para essas espécies. Já as características de colônias destacadas por Zhang e colaboradores (2021) para *B. methylotrophicus* e *B. subtilis* são diferentes no que se refere à coloração de ambas espécies, a qual o autor descreveu como branco e branco acinzentado, respectivamente, sendo que a descrição feita nesse trabalho é de colorações creme claro e creme, respectivamente. Isso se deve, provavelmente, ao meio de cultivo onde as bactérias se desenvolveram.

## 4.2 PROCESSO EM FERMENTADOR DE 100 LITROS NA EMBRAPA

Nos testes realizados para validar os fatores físico-químicos encontrados na literatura, os melhores resultados de esporulação em incubador shaker ocorreram em condições de 30°C de temperatura, pH entre 6,8 e 7,2, 200 rpm de agitação por 48h. Para replicar esses parâmetros em biorreatores, o controle da velocidade de agitação foi substituído pelo controle da oxigenação do meio de cultivo, que deveria ser superior à 20% durante toda a fermentação; e o tempo de processo foi controlado de acordo com o percentual de esporulação do fermentado. Os controles de pH e temperatura eram automáticos, sendo as correções acionadas quando se alcançavam valores fora das faixas pré-definidas.

Os resultados da primeira etapa de fermentações, realizadas em reator de 100 litros do LBE, EMBRAPA CENARGEN, estão descritos na Tabela 9.

Nesta etapa já é possível observar que o tempo de produção variou para algumas espécies e isolados. Mas isso não necessariamente interfere na concentração de esporos ao final do processo, visto que as produções de *Bacillus subtilis* alcançaram uma média de  $4,66 \times 10^9$  esporos/mL com uma média de 51,6 horas de bioprocessamento, enquanto que as de *B. pumilus* alcançam  $6,26 \times 10^9$  esporos/mL com uma média de 66,3 horas de bioprocessamento. Já as produções de *B. licheniformis* apresentaram uma média de 59 horas de fermentação, mas alcançaram  $1,2 \times 10^9$  esporos/mL na média.

Houve a variação de resultados obtidos quanto ao tempo de bioprocessamento dentro de uma mesma subespécie, como o *B. thuringiensis* var. *kustaki* que apresentou dois resultados finais iguais, mas em tempos de produção diferentes:  $1,4 \times 10^9$  esporos/mL com 46 e 53 horas, sendo que na terceira repetição, com 54 horas, apresentou uma produção de  $2,2 \times 10^9$  esporos/mL. Outro exemplo dessa variação ocorreu com o *B. subtilis*, que apresentou duas repetições com tempos semelhantes, de 50 e 51 horas, mas os resultados foram expressivamente contrastantes,

de  $1,9 \times 10^9$  e  $7,4 \times 10^9$  esporos/mL, respectivamente, sendo o último quase quatro vezes superior ao primeiro.

Tabela 9: Microrganismos produzidos, tempo, em horas, de bioprocessamento até alcançar 95% de esporulação, média dos tempos para cada microrganismo, concentração de esporos por mL de produto finalizado e médias de concentrações de esporos/mL por microrganismo.

<b>Microrganismo</b>	<b>Tempo (horas) de bioprocessamento até esporulação de 95%</b>	<b>Média do tempo (horas)</b>	<b>Esporos/mL</b>	<b>Média do número de esporos/mL</b>
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i>	53	51	$1,4 \times 10^9$	$1,66 \times 10^9$
	46		$1,4 \times 10^9$	
	54		$2,2 \times 10^9$	
<i>Bacillus subtilis</i>	50	51,6	$1,9 \times 10^9$	$4,66 \times 10^9$
	54		$4,7 \times 10^9$	
	51		$7,4 \times 10^9$	
<i>Bacillus methylophilus</i>	51	50,5	$1,5 \times 10^9$	$1,7 \times 10^9$
	49		$1,4 \times 10^9$	
	52		$2,3 \times 10^9$	
<i>Bacillus pumilus</i>	68	66,3	$6,5 \times 10^9$	$6,26 \times 10^9$
	72		$6,6 \times 10^9$	
	59		$5,7 \times 10^9$	
<i>Bacillus licheniformis</i>	71	59,3	$1,28 \times 10^9$	$1,2 \times 10^9$
	56		$1,25 \times 10^9$	
	51		$1,07 \times 10^9$	
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i>	46	45	$1,9 \times 10^9$	$1,46 \times 10^9$
	48		$1,4 \times 10^9$	
	43		$1,1 \times 10^9$	

Ao considerar as concentrações estabelecidas nas Especificações de Referência (ER), como descritas na Tabela 4, somente os resultados do *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, Especificação de Referência nº 28, estão abaixo do mínimo recomendado para o registro como

produto comercial, que é de  $2,5 \times 10^9$  esporos/mL, e o máximo alcançado nas três repetições foi de  $2,2 \times 10^9$  esporos/mL.

Foi possível observar, portanto, que variações de concentração acontecem tanto entre espécies diferentes, dentro da mesma espécie e isolados diferentes e até mesmo dentro da mesma espécie e isolado.

Todos os testes de controle de qualidade em meios seletivos foram aprovados, ou seja, não apontaram a presença de microrganismos contaminantes nas amostras coletadas. Isso significa que todo o processo, desde o isolamento em placas de Petri até a fermentação em reator de 100 litros, foi realizado de forma estéril e mantendo os níveis de qualidade esperados.

#### 4.3 PROCESSO EM FERMENTADOR DE 1000 LITROS NA AGROSALGUEIRO

Os resultados da segunda etapa de fermentações, realizadas em reator de 1000 litros da biofábrica de bactérias da AgroSalgueiro estão descritos na Tabela 10.

A partir desses resultados alcançados nas fermentações em larga escala na AgroSalgueiro, foi possível observar que a variação dos tempos de fermentação até 95% de esporulação entre as repetições de uma mesma espécie foi recorrente. Nas fermentações de algumas espécies, o intervalo entre o maior e menor tempo de fermentação são menores, como o do *B. subtilis*, que apresentou um intervalo de variação de 5 horas, enquanto que de outras espécies, como o *B. methylophilus*, o intervalo de variação foi de 21 horas. Ainda sobre essa espécie, o maior tempo de fermentação até os 95% de esporulação, 69 horas, apresentou a menor concentração final de esporos, de  $1,0 \times 10^9$  esporos/mL.

O mesmo ocorreu com as fermentações de *B. pumilus*, na qual a repetição com o maior tempo de fermentação, 85 horas, apresentou a menor concentração final de esporos, de  $5,8 \times$

10<sup>9</sup> esporos/mL, enquanto que o menor tempo, de 68 horas, apresentou concentração de 6,5 x 10<sup>9</sup> esporos/mL. Já na fermentação de *B. thuringiensis* var. *aizawai* a repetição que apresentou maior concentração final de esporos, 2,7 x 10<sup>9</sup> esporos/mL, foi a de menor tempo, 53 horas.

Tabela 10: Microrganismos produzidos em larga escala, tempo, em horas, de bioprocessamento até alcançar 95% de esporulação, média dos tempos para cada microrganismo, concentração de esporos por mL de produto finalizado e médias de concentrações de esporos/mL por microrganismo:

Microrganismos	Tempo, em horas, de fermentação até a esporulação de 95%	Média do tempo, em horas, de fermentação até a esporulação de 95%	esporos por mL	Média do número de esporos por mL
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i>	47	50	1,4 x 10 <sup>9</sup>	2,36 x 10 <sup>9</sup>
	54		1,7 x 10 <sup>9</sup>	
	48		4,0 x 10 <sup>9</sup>	
<i>Bacillus subtilis</i>	54	51	4,7 x 10 <sup>9</sup>	6,7 x 10 <sup>9</sup>
	50		6,8 x 10 <sup>9</sup>	
	49		8,8 x 10 <sup>9</sup>	
<i>Bacillus methylotrophicus</i>	69	59	1,0 x 10 <sup>9</sup>	2,6 x 10 <sup>9</sup>
	60		4,0 x 10 <sup>9</sup>	
	48		3,0 x 10 <sup>9</sup>	
<i>Bacillus pumilus</i>	68	75	6,5 x 10 <sup>9</sup>	6,3 x 10 <sup>9</sup>
	85		5,8 x 10 <sup>9</sup>	
	72		6,6 x 10 <sup>9</sup>	
<i>Bacillus licheniformis</i>	61	53,6	4,6 x 10 <sup>9</sup>	3,2 x 10 <sup>9</sup>
	52		2,6 x 10 <sup>9</sup>	
	48		2,4 x 10 <sup>9</sup>	
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i>	57	57	1,1 x 10 <sup>9</sup>	2,0 x 10 <sup>9</sup>
	53		2,7 x 10 <sup>9</sup>	
	61		2,4 x 10 <sup>9</sup>	

Outro fator interessante de ser apontado aconteceu nas fermentações de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, das quais duas repetições com tempos de fermentação muito próximos, 47 e 48

horas, apresentaram resultados muito destoantes,  $1,4 \times 10^9$  esporos/mL e  $4,0 \times 10^9$  esporos/mL. Essas variações podem ser explicadas por fatores internos e externos que interferem no resultado final dos bioprocessos, como, por exemplo, quedas de energia elétrica durante a fermentação, o que interrompe diversos processos importantes, como a agitação, aeração e os controles de temperatura dos biorreatores. A depender do período total em que a energia estiver indisponível, o processo fermentativo pode ser consideravelmente prejudicado, que pode representar uma queda de produtividade, redução na qualidade do produto final, aumento da possibilidade de contaminações e prolongamento do tempo de fermentação até a esporulação de 95%. A instabilidade e as oscilações da energia elétrica nas propriedades rurais são dificultadores e até limitadores da produção de defensivos biológicos *on farm*, pois podem danificar os equipamentos e/ou interferir na qualidade dos produtos finais.

Ao considerar os valores estabelecidos pelas Especificações de Referência da produção de microrganismos para registro como bioinsumo comercial, descritos na Tabela 4, somente o *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, ER n° 28, não alcançou o mínimo necessário em duas das três repetições, de  $1,4$  e de  $1,7 \times 10^9$  esporos/mL, sendo que o mínimo é de  $2,5 \times 10^9$  esporos/mL. Somente a terceira repetição alcançou a faixa recomendada, de  $4,0 \times 10^9$  esporos/mL. Todas as outras espécies alcançaram os valores estabelecidos pelas Especificações de Referência (ER). O *Bacillus methylotrophicus* alcançou o valor máximo recomendado pela ER n° 27, de  $4,0 \times 10^9$  esporos/mL em uma das repetições. Para o *Bacillus subtilis* em uma das repetições, o número de células ultrapassou o máximo recomendado na ER n° 25, de  $8,0 \times 10^9$  esporos/mL, com uma concentração de  $8,8 \times 10^9$  esporos/mL.

Ao comparar as duas etapas de fermentação, a em pequena e a em larga escala, alguns resultados gerais apresentaram fortes variações. As fermentações em larga escala de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (*Btk*) e de *B. subtilis* foram mais eficientes, visto que apresentaram um média de tempo de fermentação levemente inferior, de até uma hora a menos, mas as

concentrações finais de esporos foram 40% maiores para o *Btk* e 45% maiores para o *B. subtilis*. Houve também casos em que a fermentação em larga escala apresentou um resultado bastante superior ao alcançado em pequena escala, mas o tempo de produção médio também foi superior, como com o *B. methylotrophicus*, que alcançou uma concentração de esporos 53% superior em oito horas a mais de bioprocessamento, e a de *B. thuringiensis* var. *aizawai* que elevou em 47% a concentração média final em 12 horas a mais de fermentação.

A fermentação mais eficaz em larga escala foi a de *B. licheniformis*, que apresentou uma concentração média final cerca de 160% superior em aproximadamente seis horas a menos de fermentação. E a menos eficaz foi a de *B. pumilus*, que manteve a concentração média de esporos estável com uma média de nove horas a mais de bioprocessamento em larga escala.

#### 4.4. CONTROLE DE QUALIDADE DOS PRODUTOS FINALIZADOS

Tabela 11: Microrganismos e presença de contaminantes nas análises realizadas na Embrapa e na AgroSalgueiro:

Microrganismo	Presença de Contaminantes	
	Embrapa	Agrosalgueiro
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i>	negativo	negativo
<i>B. subtilis</i>	negativo	negativo
<i>B. methylotrophicus</i>	negativo	negativo
<i>Bacillus subtilis</i>	negativo	negativo
<i>B. licheniformis</i>	negativo	negativo
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i>	negativo	negativo

Todos os testes de controle de qualidade em meios seletivos foram aprovados, negativos para a presença de contaminantes (Tabela 11), ou seja, não apontaram a presença de microrganismos contaminantes nas amostras coletadas na primeira etapa de fermentações em

pequena escala, realizadas na Embrapa, assim como na etapa de fermentações em larga escala, na AgroSalgueiro. Isso significa que todo o processo, desde o isolamento em placas de Petri até a fermentação em reator de 1000 litros, foi realizado de forma estéril e mantendo os níveis de qualidade esperados, assim como na etapa em pequena escala.

## CONCLUSÃO

Os resultados apresentados para as etapas de pequena e larga escalas demonstram que a metodologia criada no LBE da EMBRAPA CENARGEN aplicada em pequena escala pode ser replicada em larga escala, sem comprometer a produção e qualidade dos bioprodutos. A produtividade em larga escala foi superior à de pequena escala e a qualidade foi mantida alta em ambas as etapas. Isso significa que a metodologia foi validada para a larga escala de produção *on farm* e os procedimentos foram eficazes, podendo ser aplicados em propriedades rurais que buscam a alternativa do uso dos defensivos biológicos para consumo próprio, pois são mais seguros a humanos, animais, e ao meio ambiente, econômicos e reduzem a dependência por defensivos químicos e importados, especialmente em períodos instáveis na geopolítica.

## **PUBLICAÇÕES**

O artigo científico desenvolvido com os dados apresentados nessa dissertação foi aceito para publicação como Circular Técnica na série Embrapa.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

As produções de defensivos biológicos *on farm* realizadas na AgroSalgueiro tem como objetivo o controle de pragas e doenças nas lavouras da propriedade, ou seja, consumo próprio. Os produtos são de alta qualidade e eficazes. A perspectiva futura seria a produção comercial, que demanda o registro dos produtos junto ao MAPA.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOCATTI, C. R. et al. Microbiological quality analysis of inoculants based on *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense* produced “on farm” reveals high contamination with non-target microorganisms. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 267–280, 1 mar. 2022.
- BONATERRA, A. et al. Bacteria as Biological Control Agents of Plant Diseases. **Microorganisms**, v. 10, n. 9, p. 1759, set. 2022.
- BRASIL. Decreto nº 10.375, de 26 de maio de 2020. Decreto nº 10.375, de 26 de maio de 2020. Institui o Programa Nacional de Bioinsumos e o Conselho Estratégico do Programa Nacional de Bioinsumos. . 26 maio 2020.
- BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, v. 49, n. 4, p. 423–435, 15 mar. 2007.
- BUENO, A. F. et al. Challenges for Adoption of Integrated Pest Management (IPM): the Soybean Example. **Neotropical Entomology**, v. 50, n. 1, p. 5–20, fev. 2021.
- COSSUS, L. Interactions with plant pathogens influence lipopeptides production and antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* strain PTB185. **Biological Control**, p. 7, 2021.
- DA SILVA, S. M. B. et al. Characterization of novel Brazilian *Bacillus thuringiensis* strains active against *Spodoptera frugiperda* and other insect pests. **Journal of Applied Entomology**, v. 128, p. 102–107, 2004.
- DIMKIĆ, I. et al. Plant-associated *Bacillus* and *Pseudomonas* antimicrobial activities in plant disease suppression via biological control mechanisms - A review. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 117, p. 101754, 1 jan. 2022.
- ERJAEI, Z.; SHEKARFOROUSH, S. S.; HOSSEINZADEH, S. Identification of endophytic bacteria in medicinal plants and their antifungal activities against food spoilage fungi. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, n. 12, p. 5262–5270, dez. 2019.
- FIRA, D. et al. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. **Journal of Biotechnology**, v. 285, p. 44–55, 10 nov. 2018.
- GOULET, F. Characterizing alignments in socio-technical transitions. Lessons from agricultural bio-inputs in Brazil. **Technology in Society**, v. 65, p. 101580, maio 2021.
- HU, X. et al. Seed treatment containing *Bacillus subtilis* BY-2 in combination with other *Bacillus* isolates for control of *Sclerotinia sclerotiorum* on oilseed rape. **Biological Control**, v. 133, p. 50–57, 1 jun. 2019.

IBAMA. **SEI/IBAMA - 7966315 - Procedimento Operacional Padrão**. Disponível em: <[https://sei.ibama.gov.br/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&codigo\\_verificador=7966315&codigo\\_crc=46CFDE1F&hash\\_download=0b44d058831f35c1cfab9d232490449b737b5980514b70d011b7a6ed809bdd9d1a1ba9cb9001ab1b5b5efaa40fe6738e19849177764424ead77568c025884df6&visualizacao=1&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ibama.gov.br/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&codigo_verificador=7966315&codigo_crc=46CFDE1F&hash_download=0b44d058831f35c1cfab9d232490449b737b5980514b70d011b7a6ed809bdd9d1a1ba9cb9001ab1b5b5efaa40fe6738e19849177764424ead77568c025884df6&visualizacao=1&id_orgao_acesso_externo=0)>. Acesso em: 9 jul. 2022.

ISLAM, A.; KABIR, M. S.; KHAIR, A. Molecular Identification and Evaluation of Indigenous Bacterial Isolates for Their Plant Growth Promoting and Biological Control Activities against Fusarium Wilt Pathogen of Tomato. **The Plant Pathology Journal**, v. 35, n. 2, p. 137–148, 1 abr. 2019.

KHARDZIANI, T. et al. Elucidation of *Bacillus subtilis* KATMIRA 1933 Potential for Spore Production in Submerged Fermentation of Plant Raw Materials. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 9, n. 4, p. 435–443, 1 dez. 2017.

KILANI-FEKI, O. et al. Improvement of antifungal metabolites production by *Bacillus subtilis* V26 for biocontrol of tomato postharvest disease. **Biological Control**, v. 95, p. 73–82, 1 abr. 2016.

LANA, U. et al. **Avaliação da qualidade de biopesticidas à base de *Bacillus thuringiensis* produzidos em sistema “on farm”**. , 1 out. 2019. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1116654/avaliacao-da-qualidade-de-biopesticidas-a-base-de-bacillus-thuringiensis-produzidos-em-sistema-on-farm>>. Acesso em: 17 dez. 2022

LOBO, K. DOS S. et al. Isolation and molecular characterization of *Bacillus thuringiensis* found in soils of the Cerrado region of Brazil, and their toxicity to *Aedes aegypti* larvae. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 62, n. 1, p. 5–12, jan. 2018.

MONNERAT, R. et al. Produção e controle de qualidade de produtos biológicos à base de *Bacillus thuringiensis* para uso na agricultura. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 360). 2018.

MONNERAT, R. et al. Controle de artrópodes-praga com bactérias entomopatogênicas. Em: **Controle biológico de pragas da agricultura**. 1. ed. Brasília - DF: Embrapa, 2020a. p. 167–200.

MONNERAT, R. et al. **Manual de produção e controle de qualidade de produtos biológicos à base de bactérias do gênero *Bacillus* para uso na agricultura**. , 1 maio 2020b.

MONNERAT, R. G. et al. Screening of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatalis*. **Biological Control**, v. 41, n. 3, p. 291–295, jun. 2007.

MONTALVÃO, S. C. L. et al. Biocontrol of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* With *Bacillus* spp. Strains. **Journal of Agricultural Science**, v. 13, n. 9, p. p1, 15 ago. 2021.

NIELSEN, P.; SØRENSEN, J. Multi-target and medium-independent fungal antagonism by hydrolytic enzymes in *Paenibacillus polymyxa* and *Bacillus pumilus* strains from barley rhizosphere. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 22, n. 3, p. 183–192, 1 mar. 1997.

- PARRA, J. R. P. Biological Control in Brazil: an overview. **Scientia Agricola**, v. 71, n. 5, p. 420–429, out. 2014.
- POSADA-URIBE, L. F.; ROMERO-TABAREZ, M.; VILLEGAS-ESCOBAR, V. Effect of medium components and culture conditions in *Bacillus subtilis* EA-CB0575 spore production. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, n. 10, p. 1879–1888, out. 2015.
- RAO, Y. K. et al. Medium optimization of carbon and nitrogen sources for the production of spores from *Bacillus amyloliquefaciens* B128 using response surface methodology. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 4, p. 535–541, abr. 2007.
- ROTOLO, C. et al. A TaqMan-based qPCR assay for quantitative detection of the biocontrol agents *Bacillus subtilis* strain QST713 and *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* strain D747. **BioControl**, v. 61, n. 1, p. 91–101, 1 fev. 2016.
- STAMENKOVIC-STOJANOVIC, S. et al. *Bacillus* based microbial formulations: Optimization of the production process. **Hemijaska industrija**, v. 73, n. 3, p. 169–182, 2019.
- VALICENTE, F. et al. **Riscos à Produção de Biopesticida à Base de *Bacillus thuringiensis* - CIRCULAR TÉCNICA 239**. 1. ed. [s.l.: s.n.].
- VAN LENTEREN, J. C. et al. Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. **BioControl**, v. 63, n. 1, p. 39–59, fev. 2018.
- VAN LENTEREN, J. C.; BUENO, V. H. P. Augmentative biological control of arthropods in Latin America. **BioControl**, v. 48, n. 2, p. 123–139, 1 abr. 2003.
- VEHAPI, M. et al. Optimization of Growth Conditions for the Production of *Bacillus subtilis* Using Central Composite Design and Its Antagonism Against Pathogenic Fungi. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, 10 jan. 2022.
- VIDAL, M. C. et al. Bioinsumos: a Construção de um Programa Nacional pela Sustentabilidade do Agro Brasileiro. **Economic Analysis of Law Review**, v. 12, n. 3, p. 557, 20 fev. 2022.
- VLAJKOV, V. et al. Medium for the Production of *Bacillus*-Based Biocontrol Agent Effective against Aflatoxigenic *Aspergillus flavus*: Dual Approach for Modelling and Optimization. **Microorganisms**, v. 10, n. 6, p. 1165, jun. 2022.
- WANG, X. et al. Biological control efficacy of *Bacillus licheniformis* HG03 against soft rot disease of postharvest peach. **Food Control**, v. 145, p. 109402, 1 mar. 2023.
- XAVIER, V. L. PROGRAMA NACIONAL DE BIOINSUMOS: PROPOSIÇÃO DE UM SISTEMA DE MONITORAMENTO DE BIOFÁBRICAS. p. 87, 12 out. 2022.
- YANG, L. et al. Broad-spectrum resistance mechanism of serine protease Sp1 in *Bacillus licheniformis* W10 via dual comparative transcriptome analysis. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 2022.

ZHANG, X. et al. Isolation, identification and optimization of fermentation conditions against *Sclerotinia sclerotiorum* strains in high salt Doenjang. **Food Science and Human Wellness**, v. 10, n. 2, p. 205–213, 1 mar. 2021.