

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO RIO GRANDE DO SUL  
UNIDADE EM CACHOEIRA DO SUL – RS  
CURSO SUPERIOR DE BACHARELADO EM AGRONOMIA

VANESSA DA SILVA PRUZ

**ANÁLISE QUANTITATIVA E QUALITATIVA DE FERMENTADOS DE *Bacillus subtilis* E *Bacillus thuringiensis* PRODUZIDOS EM BIORREATOR ARTESANAL**

CACHOEIRA DO SUL - RS

2022

VANESSA DA SILVA PRUZ

**ANÁLISE QUANTITATIVA E QUALITATIVA DE FERMENTADOS DE *Bacillus subtilis* E *Bacillus thuringiensis* PRODUZIDOS EM BIORREATOR ARTESANAL**

Trabalho de Conclusão de Curso II do  
Curso de Agronomia da Universidade  
Estadual do Rio Grande do Sul Unidade  
em Cachoeira do Sul.

Orientador: Profa. Dra. Janaína Tauil  
Bernardo

Co-orientadores:

Prof. Dr. Alberto Eduardo Knies

Dr. Jorge González Aguilera

Cachoeira do Sul - RS

2022

**VANESSA DA SILVA PRUZ**

**ANÁLISE QUANTITATIVA E QUALITATIVA DE FERMENTADOS DE *Bacillus subtilis* E *Bacillus thuringiensis* PRODUZIDOS EM BIORREATOR ARTESANAL**

Trabalho de Conclusão de Curso II apresentado como requisito parcial para obtenção de título de Bacharel em Agronomia na Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Janaína Tauil Bernardo

Aprovada em: 07 / 12 / 2022

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Janaína Tauil Bernardo  
UERGS Unidade em Cachoeira do Sul

---

Prof. Dr. Alberto Eduardo Knies  
UERGS Unidade em Cachoeira do Sul

---

Prof. Dr. Rafael Narciso Meirelles  
UERGS Unidade em São Luiz Gonzaga

Cachoeira do Sul - RS

2022

# **ANÁLISE QUANTITATIVA E QUALITATIVA DE FERMENTADOS DE *Bacillus subtilis* E *Bacillus thuringiensis* PRODUZIDOS EM BIORREATOR ARTESANAL**

Estudante: Vanessa da Silva Pruz

Orientador: Prof. Dr. Janaína Tauil Bernardo

## **RESUMO**

O gênero de bactérias *Bacillus* ganhou grande destaque nos últimos anos no cenário agrícola devido à possibilidade de ampla utilização no controle de pragas e doenças na agricultura, sendo uma tecnologia sustentável. Este trabalho foi desenvolvido no curso de agronomia da UERGS/Cachoeira do Sul junto a produtores participantes do grupo agricultura sustentável da região Sul que multiplicam *Bacillus* "on farm". O objetivo do estudo foi levantar resultados indicativos da qualidade dos fermentados produzidos em biorreator artesanal, a base de *Bacillus subtilis* e *Bacillus thuringiensis*. Após diluições seriadas ( $10^{-8}$  e  $10^{-7}$  respectivamente), as amostras foram incubadas em estufa bacteriológica e após 18 e 15 horas foi feita a contagem bacteriana das unidades formadoras de colônia (UFC) por ml do produto e verificado os níveis de contaminação. Para ambos os *Bacillus* avaliados os produtos comerciais foram superiores (*B. subtilis*  $> 10^{10}$  e *B. thuringiensis*  $> 10^{11}$ ) aos produzidos on farm diferenciando-se estatisticamente entre eles. A contagem de UFC para os produtos on farm foi adequada e mostra crescimento das bactérias sem contaminação. A qualidade e quantidade efetiva do produto final se apresentaram de forma positiva.

**Palavras-chave:** produção "on farm", controle de qualidade, UFC.

**QUANTITATIVE AND QUALITATIVE ANALYSIS OF *Bacillus subtilis* AND  
*Bacillus thuringiensis* FERMENTED PRODUCTS PRODUCED IN HANDMADE  
BIORACTOR**

Student: Vanessa da Silva Pruz

Advisor: Prof. Dr. Janaína Tauil Bernardo

**ABSTRACT**

The *Bacillus* genus of bacteria has gained great prominence in recent years in the agricultural scenario due to the possibility of wide use in the control of pests and diseases in agriculture, being a sustainable technology. This work was developed in the agronomy course at UERGS/Cachoeira do Sul together with producers participating in the sustainable agriculture group in the South region who multiply *Bacillus* "on farm". The objective of the study was to raise results indicative of the quality of fermented products produced in an artisanal bioreactor, based on *Bacillus subtilis* and *Bacillus thuringiensis*. After serial dilutions ( $10^{-8}$  and  $10^{-7}$  respectively), the samples were incubated in a bacteriological oven and after 18 and 15 hours the bacterial count of the colony forming units (CFU) per ml of the product was performed and the levels of contamination were checked. For both *Bacillus* evaluated, commercial products (*B. subtilis*  $> 10^{10}$  e *B. thuringiensis*  $> 10^{11}$ ) were superior to those produced on farm, statistically differing between them. The CFU count for the on farm products was adequate and shows bacterial growth without contamination. The effective quality and quantity of the final product were presented positively.

**Keywords:** on farm production, quality control, CFU.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Preparo dos materiais e processo de autoclavagem empregados no processo de controle de qualidade dos produtos a base de <i>Bacillus</i> .....	17
Figura 2: Processo de descontaminação feito ao expor as amostras a luz UV e logo ser feita a diluição seriada de cada amostra.....	18
Figura 3: Aquecimento das amostras, prévio ao resfriamento.....	19
Figura 4: Placas com 20 ml do meio de cultura para ser distribuídas as diluições dos diferentes tratamentos de <i>Bacillus</i> .....	19
Figura 5: Colônias de <i>Bacillus subtilis</i> e de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	23
Figura 6: Placas contendo colônias de <i>Bacillus subtilis</i> .....	24
Figura 7: Placas contendo colônias de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	24
Figura 8: Sistema para fermentação <i>on farm</i> em caixa d'agua, parte interna e parte externa.....	25

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados obtidos ao avaliar a quantidade de UFC do produto comercial fornecido pelos produtores.....	20
Tabela 2: Dados obtidos ao avaliar a quantidade de UFC do fermentado <i>on farm</i> de <i>Bacillus subtilis</i> fornecido pelos produtores.....	21
Tabela 3: Dados obtidos ao avaliar a quantidade de UFC do produto comercial fornecido pelos produtores.....	21
Tabela 4: Dados obtidos ao avaliar a quantidade de UFC do fermentado <i>on farm</i> de <i>Bacillus thuringiensis</i> fornecido pelos produtores.....	21
Tabela 5: Resultado da soma de quadrados obtidos no ANOVA para amostras de <i>Bacillus subtilis</i> e <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	22

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>8</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>10</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	16
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	16
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>17</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>20</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>26</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>27</b>



## 1. INTRODUÇÃO

Segundo a ABCBio (Associação Brasileira das Empresas de Controle Biológico) o Brasil vem se destacando no desenvolvimento de tecnologias sustentáveis. Dados do MAPA, 2019 (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento) apresentam que nos últimos anos a utilização de produtos biológicos cresceu 15% ao ano e já ultrapassou 23 milhões de hectares. É possível listar os principais organismos: 40 são de bactérias, 87 de fungos, 19 de vírus, 42 de insetos, 9 de ácaros e 1 de nematóides (AGROFIT, 2019). MAPA (2019) cita que apesar do número de produtos biológicos virem crescendo desde 2008 esse valor ainda é muito inferior ao comparado com defensivos químicos aplicados nas lavouras.

Segundo Zappellini, *apud* Gottems (2017), o mercado de produtos biológicos começou a crescer no Brasil em 2015, a partir desse ano houve uma grande adesão de agricultores a esses produtos e a cada ano aumenta 10% o número de produtores que estão escolhendo produzir alimentos de forma mais sustentável. Foram registrados 52 produtos biológicos em 2018 e 28 em 2019 até o momento segundo ABCBio (2019). Um fator bastante importante que pode ser apontado é a profissionalização de empresas que atuam na tecnologia e desenvolvimento de soluções biológicas, que garantem produtos de boa qualidade microbiológica permitindo o desenvolvimento de plantas saudáveis (GUIMARÃES et al., 2019).

O termo bioinsumo foi definido na legislação brasileira em 2020 pelo Decreto no 10.375 que instituiu o Programa Nacional de Bioinsumos (PNB) com intuito de padronizar e incentivar o desenvolvimento e uso destes produtos no Brasil (BRASIL, 2020).

O conceito de bioinsumos estabelecido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2021),

“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”

Dentre os principais bioinsumos produzidos estão os que contêm como ingrediente ativo a bactéria *Bacillus*. Esta bactéria possui forma de bastonete, são altamente resistentes a condições adversas presentes no meio ambiente principalmente ao calor devido a sua capacidade de formação de endósporos (BETTIOL, 2007). Dentre as bactérias mais produzidas “on farm” no Brasil estão *Bacillus subtilis* utilizada para controle de doenças fúngicas (ABCBio, 2019) e *Bacillus thuringiensis* para o controle de insetos pragas (MEYER et al., 2022).

*B. subtilis* foi descrito pela primeira vez em detalhes por Ferdinand Cohn em 1872. O organismo de Cohn era provavelmente idêntico a um organismo isolado ainda mais cedo, em 1832, por Ehrenberg. As origens da cepa de laboratório padrão são mal documentadas (ERRINGTON; AART, 2020).

*B. thuringiensis* foi descrito em 1901 no Japão, inicialmente conhecida por ser uma bactéria que estava causando a mortalidade do bicho-da seda. Já no ano de 1911 foi encontrada na Turíngia/ Alemanha causando a morte da traça da farinha, por isso o nome é uma homenagem a cidade. É uma bactéria entomopatogênica, ou seja causa doenças em insetos através da esporulação que produz cristais proteicos, cada cepa irá produzir cristais distintos e que irão atingir uma ordem de insetos. O estágio de desenvolvimento do inseto também interfere no manejo, por isso é necessário o monitoramento, quando aplicados nos estágios iniciais, fase larval, se tem maior sucesso no controle. (HORTA et al., 2017; GALZER; FILHO, 2016)

A fabricação “on farm” de insumos biológicos está se tornando uma prática conhecida entre os pequenos e grandes produtores, principalmente pelo seu custo benefício (CRUVINELL et al., 2022). Visando reduzir gastos na compra de insumos químicos, e ter uma ferramenta eficiente no controle de pragas e doenças, os inseticidas e fungicidas biológicos não oferecem nenhum risco a saúde (GALERA, 2019). Sobre a legalidade da atividade, o Decreto 6.913, de 23/07/2009, em seu Art. 10-D, parágrafo 8 indicava que: “ficam isentos de registro os produtos fitossanitários com uso aprovado para a agricultura orgânica produzidos exclusivamente para uso próprio”. Este parágrafo foi ampliado no Decreto 10.833 de 08/10/2021 para “Ficam isentos de registro os produtos fitossanitários com uso aprovado para a agricultura orgânica e convencional produzidos exclusivamente para uso próprio”. Contudo, falta regulamentações claras para a atividade, que normalmente é feita em caixas d’água que servirão de fermentadores (GALERA, 2019).

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

Há uma crescente preocupação mundial com a preservação ambiental e a produção de alimentos mais saudáveis, conceitos como agricultura regenerativa, de baixo impacto, bioinsumos, entre outros, estão cada vez mais em evidência. As práticas da agricultura convencional, que antes eram construídas em torno da produtividade e do lucro sem a preocupação com a dinâmica do agroecossistema, começam a se tornar insustentáveis (MEYER et al, 2022). Mundialmente, entre os anos de 1950 e 1992, os fertilizantes sintéticos, herbicidas e fungicidas começaram a ser utilizados de forma indiscriminada, reflexo da revolução verde, rapidamente esses produtos se tornaram o método mais utilizado para fornecer nutrientes para as plantas, controlar as plantas espontâneas e as pragas que atacavam as plantações (GLIESSMAN, 2001).

Para ser comercializado no Brasil, o produto biológico de controle precisa ser avaliado por três órgãos independentes - a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), para os riscos à saúde; o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais (IBAMA), para os riscos ao meio ambiente; e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), para a eficácia agrônômica (MEYER et al., 2022).

Nos últimos oito anos, o mercado de biológicos teve um expressivo avanço, se mostrando promissor em alternativa aos químicos (GUIMARÃES et al., 2019). O controle biológico passou por diferentes fases no Brasil, entre os anos 2014 e 2022 houve a consolidação do controle biológico, crescimento no número de empresas, crescimento no número de produtos registrados, crescimento da produção “*on farm*”, programa de Bioinsumos do MAPA, contribuindo a um sistema produtivo mais integrado e mais equilibrado (MEYER et al, 2022; CRUVINELL et al., 2022).

O solo é um organismo vivo, com ação de diversas formas de vida, nesse contexto, os insetos estão naturalmente inseridos no sistema. Quando nos referimos a pragas e doenças estamos falando de um desequilíbrio, quer dizer que aquele inseto precisa de um predador para controlar seu número populacional, é o que chamamos de inimigo natural (GLIESSMAN, 2001). A recomposição de microrganismos que promovem a biodiversidade do solo e agem como inimigos naturais é muito importante

na sustentação do sistema agrícola. Os produtos biológicos ou biorreguladores auxiliam a recuperação de áreas degradadas por manejos incorretos do sistema convencional de produção. As vantagens da utilização de produtos biológicos no tratamento das culturas agrícolas não se restringem apenas a ação direta sobre o alvo, mas o fato de serem biodegradáveis, seguros ao homem, seletivos a outros organismos e não causarem desequilíbrio (BETTIOL; MORANDI, 2009).

Existem milhares de espécies de bactérias que podem ser benéficas, neutras ou prejudiciais ao crescimento de plantas, cada uma com formas, habitats e metabolismos diferentes. Muitas possuem importância ecológica como é o caso das bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCP). Algumas de suas principais utilizações podem ser para o tratamento de sementes, incorporadas ao substrato de plantio, pulverizações na parte aérea incluindo frutos e folhagens (MARIANO et al., 2004)

“As BPCP atuam promovendo diretamente o crescimento pela produção de ácido cianídrico, fitohormônios, enzimas como a ACC-deaminase, mineralização de nutrientes, solubilização de fosfatos, fixação do nitrogênio e aumento da absorção pelas raízes, entre outros (CONN et al., 1997; LAZAROVITS; NOWAK, 1997 *apud* MARIANO et al., 2004).

### **Sistemas de fermentação**

Nos últimos anos está acontecendo no Brasil a chamada produção “*on farm*”, quando os produtores rurais fabricam, em suas próprias fazendas, caldos fermentados contendo *Bacillus* spp. e os aplicam, sem formulação, nas lavouras. A aplicação é feita em, no máximo, 2 a 3 dias após o término do processo fermentativo (MONNERAT et al., 2018). A produção “*on farm*” apresenta algumas vantagens sobre o uso de produtos comerciais. A maior delas é a diminuição dos custos para o fazendeiro, devido à fabricação própria e à inexistência dos custos de transporte e armazenagem (CRUVINELL et al., 2022). Entretanto, pode acontecer que, devido a condições inapropriadas de fabricação, o desenvolvimento das bactérias resulte em baixa concentração de unidades formadoras de colônias (UFC) por ml da calda, efetivos princípios ativos do microrganismo (MONNERAT et al., 2018).

Normalmente a produção na fazenda é feita em caixas d’água (500 a 1000 litros) ou em reatores (1000 a 5000 litros) que servirão de fermentadores. Neste processo de produção é preparado um meio de cultura ideal para a bactéria, geralmente possuem uma fonte de nitrogênio (extrato de caseína, caseína hidrolisada, peptona), outra de carbono (glicose, dextrose, amido) e sais minerais (micro e macro

elementos), também podem ser adicionados tampões (fosfato) e antiespumantes (EMBRAPA, 2020). Após a preparação do meio de cultura, é feita a esterilização do meio (luz UV ou ozônio) e logo após a bactéria é inoculada e inicia-se o processo de fermentação e crescimento, que dura aproximadamente de 24 até 48 horas dependendo da bactéria a ser multiplicada. Por não conter conservantes e estabilizantes o produto final é de aplicação imediata (GALERA, 2019).

O crescimento das bactérias do gênero *Bacillus* é descrito em quatro fases: uma fase de adaptação ao meio de cultura (fase Lag), uma fase vegetativa com crescimento exponencial (fase Log), uma fase transitória onde ocorre a formação do esporo e por último a fase de esporulação onde a célula se rompe e ocorre a liberação do esporo. No caso do *B. thuringiensis*, concomitantemente a formação do esporo, acontece a formação do cristal, que é liberado quando a célula se rompe” (EMBRAPA, 2020 p.25).

O controle de pragas e doenças pode ser feito por produtos biológicos, obtidos a partir de microrganismos capazes de manter os níveis de populações causadoras de doenças a lavoura em equilíbrio, além de serem estimulantes biológicos com grande capacidade de promover o crescimento e desenvolvimento de plantas. Para a produção caseira de bio defensivos deve-se ter grande cuidado com as contaminações, por isso é necessário que o ambiente de preparo e multiplicação tenham assepsia e esterilização para minimizar os riscos de contaminações (ALVES, 2018, *apud* EMBRAPA, 2018).

Não são facilmente encontrados na literatura formulações de bioprodutos. Geralmente as informações estão intimamente ligadas as pesquisas específicas das indústrias e ao sistema de produção massal adotado por cada uma delas. Esses bioprodutos podem ser produzidos “*on farm*” utilizando sistemas de produção em meio de cultura líquido, sólido ou semi-sólido. A fermentação líquida em biorreatores artesanais é o processo mais empregado para a multiplicação de bactérias. *Bacillus subtilis* e *B. thuringiensis* são microrganismos com grande potencial de controle desenvolvidos como bioprodutos fermentados (BETTIOL; MORANDI, 2009).

### ***Bacillus subtilis***

*B. subtilis* é uma bactéria antagonista, ou seja, que possui capacidade supressiva para determinadas doenças causadas por diferentes espécies de

patógenos em diversas culturas. Atualmente está sendo bastante estudada, por ser muito versátil e efetiva na promoção de crescimento, aumento da fixação de nitrogênio e por beneficiar as condições do solo.

As características das colônias de *B. subtilis* são: geralmente circular, com bordas irregulares e coloração creme ou branca. É uma bactéria em que suas colônias se espalham a partir do centro, por isso forma colônias com formato circular irregular e ocasionalmente dão a aparência de cultura mista. Medem aproximadamente de 2 a 4 mm de diâmetro (REALPE et al., 2002; LOPEZ, 2022; DAVIS, 2021).

*B. subtilis* atua interferindo na aderência do patógeno nas folhas e no seu desenvolvimento posterior, seus metabólitos ativam o sistema de defesa da planta (FONTES; VALADARES-INGLIS, 2020). Outro conhecido efeito da bactéria é a de interferir no ciclo reprodutivo dos nematoides através das endotoxinas produzidas por ela, que afetam principalmente na ovoposição e na eclosão de nematoides juvenis (RIBEIRO et al., 2011). *B. subtilis* forma halos de inibição sobre fitopatógenos, o qual se manifesta como uma limitação do crescimento micelial de fungos pela bactéria (GABARDO et al., 2020). Além disso, alguns autores como Figueiredo et al. (2010), constataram que isolados de diversas espécies de *Bacillus* são capazes de inibir o crescimento fúngico em várias culturas.

Segundo Katz e Demain (1977) *apud* Bettiol e Morandi (2009), cerca de 167 antibióticos são produzidos por membros do gênero de bactérias *Bacillus*. Desse total, 39,52% ou 66 são elaborados por isolados de *B. subtilis*. Os antibióticos produzidos por *B. subtilis* são: micobacilina, subtilina, bacilomicina, bacilisina, fungistamina, bulbiformina, bacilina, subsporina, bacilocina, micosubtilina, fungocina, iturina, eumicina, dentre outros.

Os metabólitos de *B. subtilis* apresentam conhecida ação contra bactérias Gram positivas e negativas e fungos. Ao longo dos anos vem sendo estudado como agente de controle biológico de diversos fitopatógenos da filosfera, rizosfera, espermosfera e em pós colheita, com relativo sucesso. Além da capacidade de antibiose, é uma bactéria que age por indução de resistência do hospedeiro (BETTIOL, MORANDI, 2009).

Há no mercado alguns produtos comerciais a base de *B. subtilis*, como por exemplo: RhizoPlus (FZB BiotechnikGmbH), Serenade 1,34 SC (AgraQuest, Inc.), Kodiak (Gustafson, Inc.), Sistem 3 (Helena ChemicalCo.) (BETTIOL; MORANDI, 2009)

“As bactérias formadoras de esporos pertencem em sua maioria à família Bacillaceae, sendo que o gênero aeróbio *Bacillus* inclui as bactérias formadoras de esporos de maior potencial para o controle biológico pelas mesmas características que lhes conferem resistência as condições adversas ambientais e de processamento industrial” (CAPALHO, 2007 p.97).

Para que esta bactéria tenha ação efetiva contra outro microrganismo é necessário que contenha grande quantidade do agente ativo no produto final da fermentação (CAPALHO, 2007).

### ***Bacillus thuringiensis***

*Bacillus thuringiensis* é uma espécie de bactéria gram-positiva, quimio heterotrófico que foi descrita por Berlinerna Alemanha no ano de 1911 (GALZER; FILHO, 2016). Contudo, no Japão em 1902 já havia sido isolada pelo pesquisador Ishiwata e associada à mortalidade de lagartas de *Bombyx mori* Linnaeus (HORTA et al., 2017). A bactéria produz cristais proteicos que é composto de toxinas proteicas Cry, sua ação depende do processo de ativação que ocorre no interior do inseto. Após a ingestão dos cristais ocorre a solubilização e outras reações que resulta na paralisia do aparelho digestivo. Produz também um grande número de exoenzimas como as quitinases e as proteases que desempenham um papel importante na patogenicidade a insetos. Além das toxinas a bactéria produz esporos para sobreviver em ambientes adversos que podem germinar no interior do inseto alvo, ocasionando septicemia (GALZER; FILHO, 2016). É uma bactéria de crescimento aeróbio, pertencente à família Bacillaceae. As principais ordens em que possuem ação inseticida são: Coleoptera, Diptera, Hymenoptera e Lepidoptera, dentre outras de menor destaque (HORTA et al., 2017).

De ocorrência cosmopolita, *B. thuringiensis* chamado também comumente como Bt é uma bactéria naturalmente encontrada no solo, água, matéria orgânica, em insetos mortos e resíduos de grãos. Se caracteriza pela produção de proteínas inseticidas durante seu processo de esporulação ao final do seu desenvolvimento. As proteínas são de duas grandes famílias, Cry e Cyt (HORTA et al., 2017).

Segundo Horta et al. (2017), *B. thuringiensis* é responsável por 70% dos bioinseticidas vendidos globalmente, porém há uma baixa persistência da bactéria no ambiente e um estreito espectro de ação, o que acaba limitando a sua utilização. Pode

ser utilizado no tratamento de sementes ou aplicado na forma de bioinseticida diretamente na cultura. O manejo integrado de pragas (MIP) tem sido desenvolvido como alternativa para a redução da utilização de inseticidas sintéticos, e o Bt possui significativa importância no controle biológico (HORTA et al., 2017).

As características das colônias de *B. thuringiensis* são utilizadas para identificação da bactéria. Suas colônias são opacas, sem pigmentação e com estrutura densa, geralmente, apresentam forma circular, bordas onduladas e consistência cremosa. Em cultivos mais velhos, as colônias apresentam aspecto seco e rugoso, podem ser de tamanho grande de 2 a 7 mm (SOSA GOMES et al., 1998 *apud* SILVA et al., 2017).



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver a técnica de avaliação quantitativa de contagem das colônias de duas espécies de *Bacillus*, assim como realizar testes de qualidade e viabilidade para a produção de fermentados na propriedade.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar os processos de multiplicação bacteriana;
- Avaliar em laboratório a qualidade de amostras de fermentados “*on farm*”;
- Viabilizar a utilização de produtos à base de biológicos;
- Disponibilizar os resultados da análise aos produtores rurais.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido na UERGS campus Cachoeira do Sul, RS. As atividades foram realizadas no laboratório da unidade no período de 2019 até 2021. Os experimentos foram desenvolvidos em delineamento inteiramente ao acaso com 20 repetições (placas de petri) por tratamentos. Os tratamentos empregados foram obtidos com amostras de *B. subtilis* e *B. thuringiensis* provenientes de quatro produtores do RS que enviaram amostras de produtos comerciais e de fermentados produzidos *on farm* nas suas propriedades. Ao todo, para cada bactéria foram comparados quatro tratamentos.

Um total de oito amostras foram recebidas, sendo duas amostras do fermentado “*on farm*” a base de *Bacillus subtilis* e duas do *Bacillus thuringiensis* e quatro amostras do produto comercial, produzidas por agricultores do Grupo Agricultura Sustentável GAAS em sistema “*on farm*” no Estado do Rio Grande do Sul. As amostras foram coletadas em frasco estéril e enviadas separadamente em caixas de isopor com gelo, permaneceram sob refrigeração até o momento das análises. Foram avaliadas quanto ao aspecto visual, características das colônias, contagem bacteriana e níveis de contaminação.



**Figura 1:** Preparo dos materiais (esquerda) e processo de autoclavagem (direita) empregados no processo de controle de qualidade dos produtos a base de *Bacillus*. Fonte: Autor, 2019

A metodologia a ser empregada é quantitativa, sendo o resultado expresso em UFC ml<sup>-1</sup> (Unidade Formadora de Colônias por ml do produto), com base no curso

teórico e prático da Embrapa Meio Ambiente “Quantificação e identificação de *Bacillus subtilis* e *B. licheniformis*” (2012).

Previamente as análises laboratoriais os materiais autoclaváveis e os meios de cultura foram preparados para uso posterior. As placas de Petri, tubos de ensaio, pipetas, ponteiras para micropipeta e Erlenmeyer contendo água destilada foram autoclavados a 121°C por 25 minutos (Figura 1) e os Erlenmeyer contendo os meios de cultura a 121 °C por 15 minutos.



**Figura 2:** Processo de descontaminação feito ao expor as amostras a luz UV (esquerda) e logo ser feita as diluições seriadas de cada amostra (direita). Fonte: Autor, 2019.

Em condições assépticas (fluxo laminar exposto a luz UV, por 15 minutos (Figura 2) foi realizada a diluição seriada. As amostras foram homogeneizadas e transferidas, com a ajuda de uma micropipeta, 1 ml do fermentado para um tubo do tipo Falcon contendo 9 ml de água destilada e autoclavada. Sendo essa a diluição  $10^{-1}$ . Dentro da câmara de fluxo laminar, os tubos são agitados no vortex, sendo colocado e tirado três vezes.

Os tubos foram tratados termicamente em banho maria a 80 °C por 12 minutos e resfriados em água gelada por 10 segundos (Figura 3). Para cada amostra preparou-se dois tubos Falcon com o produto e a água destilada e autoclavada, de cada tubo saiu duas diluições seriadas, que originaram 20 placas. Com uma micropipeta estéril, foi transferido 1 ml da diluição  $10^{-1}$  para o tubo  $10^{-2}$ , que é colocado no vortex três vezes para homogeneizar a suspensão e assim sucessivamente até a diluição adequada. Em cada diluição foi trocada a ponteira da micropipeta.



**Figura 3:** Aquecimento das amostras (esquerda) prévio ao resfriamento das amostras (direita). Fonte: Autor, 2019

Da diluição apropriada é transferido 0,1 ml para a superfície da placa de Petri contendo o meio de cultura (Figura 4). A diluição é espalhada com a ajuda de uma alça de Drigalski estéril. As amostras de *B. subtilis* foram diluídas  $10^{-7}$  e plaqueadas em meio de cultura Nutriente Ágar (NA), incubadas a  $35^{\circ}\text{C}$  por 18 horas. Para as amostras de *B. thuringiensis* a diluição apropriada é  $10^{-8}$ , plaqueadas em meio de cultura Luria Bertani (LB) enriquecido com sais, incubadas a  $32^{\circ}\text{C}$  por 15 horas.



**Figura 4:** Placas com 20 ml do meio de cultura para ser distribuídas as diluições dos diferentes tratamentos de *Bacillus*. Fonte: Autor, 2019.

Para calcular a Unidade Formadora de Colônia por mL de produto, utilizou se a formula:

$$\text{UFC} = \text{número médio de colônias nas placas} \times \text{diluição escolhida da amostra} \times 10^*$$

Os dados de UFC foram submetidos a análises de variância ANOVA para a comparação dos resultados, as médias foram comparadas pelo teste Tukey ao 5% de probabilidade. As análises foram realizadas no programa Rbio (Bhering, 2017).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

As dificuldades do mercado nacional sobre esses produtos, levam o produtor a realizar fermentações “*on farm*” através de métodos simples de produção. Porém o controle de qualidade desses fermentados é pouco realizado devido aos centros de pesquisa que realizam análises, em geral, estarem localizados distantes das propriedades. Formulações líquidas são mais frequentes no mercado e possuem tempo de prateleira menor que formulações em pó, aumentando assim riscos de perda de viabilidade das unidades formadoras de colônia dos produtos (MEYER et al., 2022). O alto preço dos produtos, pouco conhecimento do uso pelos produtores e técnicos faz esse mercado girar de forma lenta, o que pode comprometer a viabilidade do produto.

Os resultados obtidos da quantificação individual das diferentes amostras de *B. subtilis* estão descritos nas tabelas 1 e 2, e os resultados de *B. thuringiensis* estão descritos nas tabelas 3 e 4. Estes dados foram empregados para a realização do ANOVA e os resultados são apresentados na tabela 5.

**Tabela 1.** Dados obtidos ao avaliar a quantidade de UFC do produto comercial fornecido pelos produtores.

<i>Bacillus subtilis</i>									
Diluição utilizada para plaqueamento em meio Nutriente Agar 10 <sup>-7</sup>									
		Amostra n°1				Amostra n°2			
Temperatura	Tempo	Contagem 1		Contagem 2		Contagem 1		Contagem 2	
35°C	18 horas	250	242	241	227	230	220	228	216
		234	253	244	245	243	239	214	227
		243	237	229	234	215	232	219	221
		248	243	239	241	224	218	222	230
		257	251	234	228	219	221	231	238
Média		245,8		236,2		226,1		224,6	
UFC/mL		2,45 x 10 <sup>10</sup>		2,36 x 10 <sup>10</sup>		2,26 x 10 <sup>10</sup>		2,24 x 10 <sup>10</sup>	

Fonte: Autor, 2022.

**Tabela 2.** Dados obtidos ao avaliar a quantidade de UFC do fermentado *on farm* de *Bacillus subtilis* fornecido pelos produtores.

<i>B. subtilis</i>									
Diluição utilizada para plaqueamento em meio Nutriente Agar 10 <sup>-7</sup>									
		Amostra n°1				Amostra n°2			
Temperatura	Tempo	Contagem 1		Contagem 2		Contagem 1		Contagem 2	
35°C	18 horas	115	112	114	117	108	106	107	102
		118	114	116	112	106	104	101	105
		110	117	107	116	98	100	103	104
		112	110	118	115	102	97	101	106
		109	111	113	114	95	99	96	94
Média		112,8		114,2		101,5		101,9	
UFC/mL		1,12 x 10 <sup>10</sup>		1,14 x 10 <sup>10</sup>		1,01 x 10 <sup>10</sup>		1,01 x 10 <sup>10</sup>	

Fonte: Autor, 2022.

**Tabela 3.** Dados obtidos ao avaliar a quantidade de UFC do produto comercial fornecido pelos produtores.

<i>B. thuringiensis</i>									
Diluição utilizada para plaqueamento em meio Luria Bertani 10 <sup>-8</sup>									
		Amostra n°1				Amostra n°2			
Temperatura	Tempo	Contagem 1		Contagem 2		Contagem 1		Contagem 2	
32°C	15 horas	116	113	118	116	123	115	121	123
		120	119	130	121	117	127	124	119
		114	122	110	128	122	132	133	138
		119	120	123	113	136	134	118	126
		122	121	114	125	122	123	135	123
Média		118,6		119,8		125,1		126	
UFC/mL		1,18 x 10 <sup>11</sup>		1,19 x 10 <sup>11</sup>		1,25 x 10 <sup>11</sup>		1,26 x 10 <sup>11</sup>	

Fonte: Autor, 2022.

**Tabela 4.** Dados obtidos ao avaliar a quantidade de UFC do fermentado *on farm* de *Bacillus thuringiensis* fornecido pelos produtores.

<i>B. thuringiensis</i>									
Diluição utilizada para plaqueamento em meio Luria Bertani 10 <sup>-8</sup>									
		Amostra n°1				Amostra n°2			
Temperatura	Tempo	Contagem 1		Contagem 2		Contagem 1		Contagem 2	
32°C	15 horas	86	92	91	89	92	88	90	93
		94	91	87	93	87	91	89	88
		89	87	98	92	92	94	97	94
		97	90	85	90	98	96	98	99
		95	94	93	86	95	89	92	90
Média		91,5		90,4		92,2		93	
UFC/mL		9,15 x 10 <sup>10</sup>		9,04 x 10 <sup>10</sup>		9,22 x 10 <sup>10</sup>		9,3 x 10 <sup>10</sup>	

Fonte: Autor, 2022.

**Tabela 5.** Resultados da soma de quadrados obtidos no ANOVA para amostras de *Bacillus subtilis* e *Bacillus thuringiensis*.

Fonte da variação	Gl	Quadrado Médio do Resíduo	
		<i>B. subtilis</i>	<i>B.thuringiensis</i>
Tratamentos	3	106407,7***	6385,883***
Resíduo	76	41,8	25,0
Total	79		
CV (%)		3,8	4,67
Comparações de médias			
PC produtor 1		2.41 x 10 <sup>10</sup> a	1.19 x 10 <sup>11</sup> b
PC produtor 2		2.25 x 10 <sup>10</sup> b	1.26 x 10 <sup>11</sup> a
<i>On farm</i> produtor 1		1.14 x 10 <sup>10</sup> c	9.10 x 10 <sup>10</sup> c
<i>On farm</i> produtor 2		1.02 x 10 <sup>10</sup> d	9.26 x 10 <sup>10</sup> c

CV: coeficiente de variação, PC: produto comercial, Letras minúsculas na coluna representam diferenças significativas pelo teste Tukey ao 5% de probabilidade. Fonte: Autor, 2022.

Com base nos resultados estatísticos: todos os tratamentos apresentaram diferenças significativas para as médias das unidades formadoras de colônias (Tabela 5), exceto entre os grupos *on farm* 1 e 2 de *Bacillus thuringiensis*. Porém, os resultados de base estatística não devem ser analisados de forma isolada, tanto as amostras dos produtos comerciais quanto dos fermentados encontram-se dentro dos padrões para uma efetiva ação, cuja concentração mínima exigida deve ser de 1 x 10<sup>9</sup> UFC mL<sup>-1</sup> para *Bacillus subtilis* e 2,7 x 10<sup>10</sup> UFC mL<sup>-1</sup> para *B. thuringiensis*.

Em relação ao aspecto visual dos fermentados, as amostras apresentaram um padrão de coloração levemente parda, o que indica controle de qualidade e padronização na multiplicação bacteriana, tendo em vista que, é utilizado o mesmo meio de cultura e o mesmo sistema de multiplicação.

O plaqueamento das amostras em meio de cultura sólido demonstraram uniformidade no tamanho das colônias, não foram detectados possíveis agentes contaminantes (Figura 5).

O aumento do interesse pela produção de insumos biológicos nas propriedades agrícolas para uso próprio, é uma realidade e sua fermentação é realizada através de métodos simples de produção. Porém, ainda não existe nenhuma obrigatoriedade quanto ao controle de qualidade desses fermentados nas propriedades (EMBRAPA, 2021). Recentes relatos mostram que a prática é intensa em propriedades produtoras de grãos da região Centro-Oeste e em Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, em pomares de frutas da região de Petrolina/Juazeiro, chegando

fortemente à região chamada Matopiba, que envolve também o estado do Tocantins (EMBRAPA, 2021).



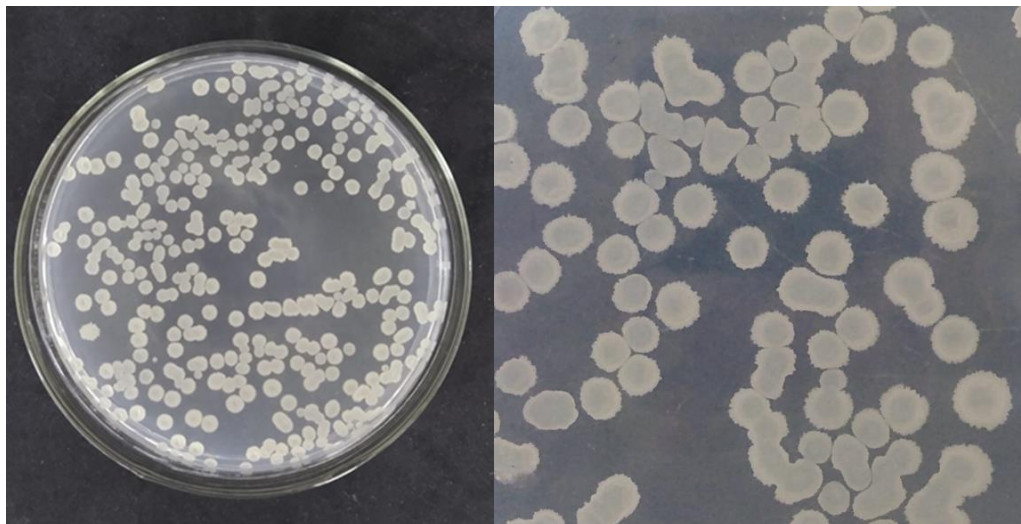
**Figura 5:** Colônias de *Bacillus subtilis* (esquerda) e de *Bacillus thuringiensis* (direita).  
Fonte: Autor, 2020.

Ainda que relatos da EMBRAPA (2021) apontem principalmente problemas de contaminação em produções *on farm* para *Bacillus*, *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* produzidos em fazendas de várias regiões do Brasil, nossos resultados indicam que é possível produzir bactérias em condições artesanais e obter um produto de qualidade seja com valores de UFC apropriados como ausência de contaminantes (Figuras 6 e 7). Estes resultados indicam também que a forma e cuidado que o produtor adotar é determinante no resultado ao produzir os produtos *on farm* influenciando assim a qualidade do produto final. Assim como outros produtos usados na agricultura, a qualidade do produto biológico é essencial para que possa promover os efeitos desejados, tanto para a promoção de crescimento vegetal, quanto para o controle de insetos-praga e doenças (EMBRAPA, 2021).

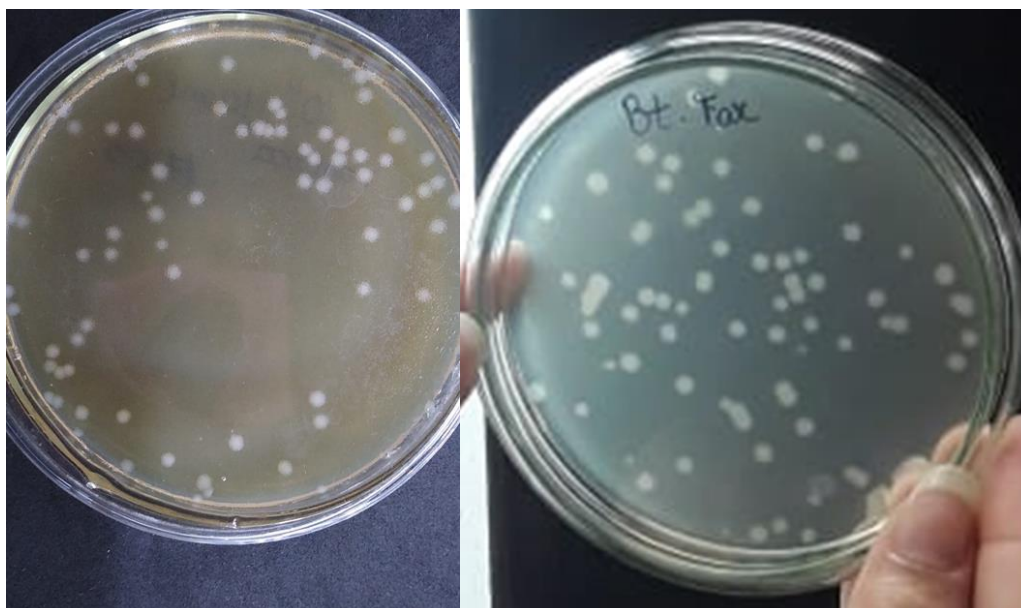
O monitoramento da multiplicação bacteriana em biorreator artesanal deve visar garantir os parâmetros ótimos de cultivo dos microrganismos, como por exemplo, aeração, rotação e pH, durante o processo de produção é primordial o cuidado com contaminações e as condições de cultivo (MEYER et al., 2022). A fermentação *on farm*, por não ser comercializada, não necessita atingir um determinado número de UFC mL<sup>-1</sup>, mas o ideal é que tenham um mínimo de 30 colônias por placa e que não apresentem contaminações, a partir desse resultado os agricultores decidem o volume de produto que será aplicado considerando a finalidade e frequência de aplicação. (BETTIOL et al., 2022). Desta forma, fica claro a importância de amostragens durante o processo de multiplicação, que confirmem a pureza do caldo fermentado e a



concentração bacteriana produzida, os testes de qualidade podem ser feitos na propriedade a partir de estruturas mínimas de laboratório.



**Figura 6:** Placas contendo colônias de *Bacillus subtilis*. Fonte: Autor, 2019.



**Figura 7:** Placas contendo colônias de *Bacillus thuringiensis*. Fonte: Autor, 2019.

Para a montagem de uma biofábrica são necessários: caixa d'água; tubos e conexões para a instalação hidráulica e bomba d'água (Figura 8). O custo com esses materiais é, em média, 600,00 reais. É necessário também algum equipamento para realizar a assepsia da água, podendo ser tubos com luz UV (ferramenta utilizada na piscicultura) ou aparelho de ozônio.



**Figura 8:** Sistema para fermentação *on farm* em caixa d'água, parte interna (esquerda) e parte externa (direita). Fonte: Janaína T. Bernardo, 2022.

Os produtos biológicos comerciais tem um valor bastante alto, sendo muitas vezes um entrave para que o produtor utilize dessa tecnologia. Com o objetivo de contribuir para um sistema produtivo mais sustentável, a fermentação na propriedade reduz em até 97% os custos. O preço por litro do *Bacillus subtilis* no mercado está em torno de 140,00 reais e do *B. thuringiensis* 230,00 reais, enquanto que, o valor do litro produzido na propriedade fica 6,00 reais. A redução dos custos é significativa e os resultados sobre a qualidade dos bioprodutos não deixa em nada a desejar, portanto, com os cuidados necessários, é uma pratica que pode ser realizada pelo produtor.

O retorno aos produtores sobre os trabalhos efetuados foram feitos através de um dia de campo na estação agrônômica de Cachoeira do Sul-RS, que contou com a presença de agricultores (as) e alunos de escolas agrícolas, com o viés de aproximar a comunidade acadêmica dos produtores (as). Também foi ministrado um minicurso pela orientadora Prof. Dra. Janaina Tauil Bernado, para produtores interessados em conhecer os processos de análise de qualidade e apresentar os resultados do presente trabalho.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O sistema de fermentação simplificado produzido na propriedade tem como objetivo diminuir os custos de produção, sendo assim, os resultados obtidos com as análises são indicadores de viabilidade da prática de multiplicação bacteriana “*on farm*”, assim como, a qualidade e quantidade efetiva do produto final se apresentam de forma positiva.

## 7. REFERÊNCIAS

- ABCBio. Associação Brasileira das Empresas de Controle Biológico. **Agricultura tropical: um case de sucesso do Brasil na produção de alimentos.** Disponível em: <<https://www.abcbio.org.br/blog/agricultura-tropical/>>. Acesso em: 16 de maio de 2020.
- ABCBIO. Associação Brasileira das Empresas de Controle Biológico. **On Farm: os riscos de fazer uma produção caseira de biodefensivos e bioestimulantes.** Disponível em: <<https://www.abcbio.org.br/blog/on-farm/>>. Acesso em: 16 de maio de 2020.
- ABCBIO. Associação Brasileira das Empresas de Controle Biológico. **Associação brasileira das empresas de controle biológico projeta expansão do mercado.** Disponível em: <https://www.abcbio.org.br/conteudo/publicações/>. Acesso em 25 de outubro de 2019.
- AGROFIT. [http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons). Acesso em 25 de outubro de 2019
- ALVES, Roberto Teixeira, apud, EMBRAPA. **Controle biológico de pragas é tema de palestra.** Disponível em: <[https://www.agrolink.com.br/noticias/control-biologico-de-pragas-e-tema-de-palestra\\_407517.html](https://www.agrolink.com.br/noticias/control-biologico-de-pragas-e-tema-de-palestra_407517.html)>. Acesso em: 08 de julho de 2019
- BHERING, L.L. Rbio: **A Tool For Biometric And Statistical Analysis Using The R Platform.** Crop Breeding and Applied Biotechnology, v.17: 187-190p, 2017
- BETTIOL, Wagner; MORANDI, Marcelo A.B. **Biocontrole de Doenças de Plantas: Uso e Perspectiva.** Jaguariúna-Embrapa Meio Ambiente, 2009. Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/579954>>. Acesso em: 15 de agosto de 2019.
- BETTIOL, Wagner et al., 2022. **Controle de qualidade e conformidade de produtos e fermentados à base de Bacillus spp.:** proposta metodológica. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/239978/1/Bettioli-Controle-qualidade-2022-2.pdf>>. Acesso em 15 de novembro de 2022.
- BETTIOL, Wagner. **Métodos Utilizados no Biocontrole de Fitopatógenos.** Bento Gonçalves – RS, Embrapa, 2007. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/13753/1/2007CL008.pdf>>. Acesso em: 15 de agosto de 2019.
- BRASIL. Decreto no 10.375, de 26 de maio de 2020. Programa Nacional de Bioinsumos. Diário Oficial da União, seção 1, edição 100, p. 105, 27 maio 2020. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/decreto-n-10.375-de-26-de-maio-de-2020-258706480>>. Acesso em 23 de outubro de 2021.

CAPALHO, Deise Maria Fontana, 2007. **Produção de bactérias para uso no controle biológico**. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/101632/1/2007CL-008.pdf>>. Acesso em 10 de junho de 2019.

CRUVINELL, A.; SILVA, T. M.; ROCHA, M. A. M.; AZEVEDO, M. O.; AGUILERA, J. G.; BERNARDO, M. L. T.; BERNARDO, J. T.; ALMEIDA, J. E. M. de. Profitability in soybean production on the Bom Jardim Lagoano farm with on-farm biological management. *Research, Society and Development*, [S. l.], v. 11, n. 14, p. e135111436112, 2022. DOI: 10.33448/rsd-v11i14.36112. Disponível em: <<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/36112>>. Acesso em 28 de outubro de 2022.

DAVIS, Jonita. 2021. **Características das colônias de *Bacillus subtilis***. Disponível em: <[https://www.ehowenespanol.com/caracteristicas-colonizacion-del-bacillus-subtilis-info\\_82308/](https://www.ehowenespanol.com/caracteristicas-colonizacion-del-bacillus-subtilis-info_82308/)>. Acesso em 21 de setembro de 2022.

EMBRAPA, 2020. **Manual de produção e controle de qualidade de produtos biológicos à base de bactérias do gênero *Bacillus* para uso na agricultura**. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1122563/1/documento-s-36916.pdf>>. Acesso em 09 de dezembro de 2022.

EMBRAPA. 2012. **Quantificação e identificação de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis***. Disponível em: <[http://www.cnpma.embrapa.br/down\\_site/forum/2012/bacillus/ApostilaCursoBacillus2012.pdf](http://www.cnpma.embrapa.br/down_site/forum/2012/bacillus/ApostilaCursoBacillus2012.pdf)>. Acesso em 29 de março de 2019.

EMBRAPA. 2021. **Produção de microrganismos para uso próprio na agricultura (on-farm) - Esclarecimentos Oficiais**. Disponível em: <[https://www.embrapa.br/esclarecimentos-oficiais/-/asset\\_publisher/TMQZKu1jxu5K/content/nota-tecnica-producao-de-microrganismos-para-uso-proprio-na-agricultura-on-farm-?inheritRedirect=false](https://www.embrapa.br/esclarecimentos-oficiais/-/asset_publisher/TMQZKu1jxu5K/content/nota-tecnica-producao-de-microrganismos-para-uso-proprio-na-agricultura-on-farm-?inheritRedirect=false)>. Acesso em 22 de novembro de 2022.

ERRINGTON J, Aart LTV. 2020. **Perfil do micróbio: *Bacillus subtilis*: organismo modelo para desenvolvimento celular e cavalo de trabalho industrial**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7376258/>>. Acesso em 23 de outubro de 2022.

FIGUEIREDO, José E. F. et al., 2010. **Atividade antagonista in vitro de *Bacillus subtilis* contra fungos fitopatogênicos do milho e sorgo**. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/25047/1/0053.pdf>>. Acesso em 05 de agosto de 2019.

FONTES, Eliana Maria Gouveia; VALADARES-INGLIS, Maria Cleria. **Controle biológico de pragas da agricultura**. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/212490/1/CBdocument.pdf>>. Acesso em: 12 de dezembro de 2022.

GABARDO, Gislaine et al., 2020. ***Trichoderma asperellum* e *Bacillus subtilis* como antagonistas no crescimento de fungos fitopatogênicos in vitro.**

Disponível em:

<<https://brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/download/14663/12145>>.

Acesso em 10 de março de 2021.

GALERA, Vinicius. **Insumos biológicos estão em alta.** Globo Rural, 2019.

Disponível em:

<<https://revistagloborural.globo.com/Noticias/Agricultura/noticia/2019/01/insumos-biologicos-estao-em-alta.html>>. Acesso em: 18 de agosto de 2019

GALZER, Elisângela; FILHO, Wilson. **Utilização do *Bacillus thuringiensis* no controle biológico de pragas.** Rica: Revista Interdisciplinar de Ciência Aplicada V.1, no 1, 2016. Disponível em:

<[https://www.researchgate.net/publication/307167833\\_Utilizacao\\_do\\_Bacillus\\_thuringiensis\\_no\\_controle\\_biologico\\_de\\_pragas](https://www.researchgate.net/publication/307167833_Utilizacao_do_Bacillus_thuringiensis_no_controle_biologico_de_pragas)>. Acesso em: 01 de setembro de 2019

GLIESSMAN, Stephen R. **Agroecologia: processos ecológicos em agricultura sustentável.** 2.ed. Porto Alegre: Editora da Universidade/UFRGS, 2001. Acesso em 03 de julho de 2019.

GUIMARÃES, Rafaela Araújo; da Silva, Julio Carlos Pereira; de Medeiros, Flávio Henrique Vasconcelos (2019). **Mercado de produtos biológicos: uma visão atual da aplicação no território brasileiro.** In: International Symposium on Plant Disease Management Plant Health in Tropical Agribusiness. Cap. 13, 162-170. Disponível em:

<[https://www.researchgate.net/publication/337840277\\_MERCADO\\_DE\\_PRODUTOS\\_BIOLOGICOS\\_UMA\\_VISAO\\_ATUAL\\_DA\\_APLICACAO\\_NO\\_TERRITORIO\\_BRASILEIRO](https://www.researchgate.net/publication/337840277_MERCADO_DE_PRODUTOS_BIOLOGICOS_UMA_VISAO_ATUAL_DA_APLICACAO_NO_TERRITORIO_BRASILEIRO)>. Acesso em 28 de outubro de 2022.

HORTA, André et.al, 2017. **Toxinas inseticidas de *Bacillus thuringiensis*.**

Disponível em:

<[https://www.researchgate.net/publication/313251240\\_Toxinas\\_inseticidas\\_de\\_Bacillus\\_thuringiensis](https://www.researchgate.net/publication/313251240_Toxinas_inseticidas_de_Bacillus_thuringiensis)>. Acesso em: 10 de julho de 2019

LÓPEZ, Beatriz. 2022. ***Bacillus subtilis*: características, morfologia, enfermidades.**

Disponível em: <<https://www.lifeder.com/bacillus-subtilis/>>. Acesso em: 23 de outubro de 2022.

MAPA. Agrofit: consulta aberta. 2022. Disponível em:

<[https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 15 de outubro de 2022.

MAPA. Conceitos. 2021. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inovacao/bioinsumos/o-programa/conceitos>>. Acesso em: 15 de outubro de 2022.

MAPA, Ministério da Agricultura e Pecuária. Disponível em:

<<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sustentabilidade/organicos/legislacao/portugues>>. Acesso em: 09 de junho de 2022.

MAPA (2019). Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/noticias/cresce-numero-de-registros-de-produtos--biologicos-para-uso-agricola>>. Acesso em: 09 de junho de 2022.

MARIANO, Rosa et al. **Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável**. Academia Pernambucana de Ciência Agronômica V.1, 2004. Disponível em: <<http://journals.ufrpe.br/index.php/apca/article/view/70>>. Acesso em: 01 setembro de 2019.

MEYER, Maurício Conrado et al. Bioinsumos na cultura da soja. 1ªed. Brasília, DF: Embrapa, 2022. Acesso em: 13 de setembro de 2022.

MONNERAT, Rose et al. **Produção e controle de qualidade de produtos biológicos à base de *Bacillus thuringiensis* para uso na agricultura**. Embrapa, 2018. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1098050/1/documentos360Final.pdf>>. Acesso em: 01 de setembro de 2019.

REALPE, María Elena; HERNÁNDEZ, Carlos Arturo; AGUDELO, Clara Inés. 2002. **Especies del género *Bacillus*: morfología macroscópica y microscópica**. Disponível em: <<https://revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/1148/1263>>. Acesso em: 20 agosto de 2019.

RIBEIRO, Rodrigo; SEI, Fernando; LEITE, Maria. ***Bacillus subtilis*: Agente de controle biológico e promotor de crescimento em plantas**. Disponível em: <<http://www.diadecampo.com.br/zpublisher/materias/Materia.asp?id=24104&secao=Colunas%20e%20Artigos>>. Acesso em: 21 de agosto de 2019.

SANHUEZA, Rosa; MELO, Itamar. **Métodos utilizados no biocontrole de fitopatógenos**. Embrapa Uva e Vinho. Bento Gonçalves, 2007. Acesso em: 02 de setembro de 2019.

SOSA GOMES et al., 1998 apud SILVA et al., 2017. **Preservação de linhagens de *Bacillus thuringiensis* por ultracongelamento e incorporação ao acervo da Coleção de Microrganismos Multifuncionais e Fitopatogênicos da Embrapa Milho e Sorgo**. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/163119/1/Preservacao-linhagens.pdf>>. Acesso em: 07 de agosto de 2021.

ZAPPELINI, Luciano Olmos, apud, GOTTEMS, Leonardo. Agrolink, 2017. **Mercado de biológicos deve chegar a US\$ 3 bilhões: Média anual de crescimento em torno de 10%, diz Koppert**. Disponível em: <[https://www.agrolink.com.br/agrolinkfito/noticia/mercado-de-biologicos-deve-chegar-a-us--3-bilhoes\\_401975.html](https://www.agrolink.com.br/agrolinkfito/noticia/mercado-de-biologicos-deve-chegar-a-us--3-bilhoes_401975.html)>. Acesso em: 04 de abril de 2020.