

Universidade de Brasília
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária
Agronomia

Ítalo Alves Freire

Produção e controle de qualidade de *Bacillus thuringiensis* em biofábricas *On Farm* em diferentes níveis de aeração e seu efeito em *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)

Brasília
2024

Ítalo Alves Freire

Produção e controle de qualidade de *Bacillus thuringiensis* em biofábricas *On Farm* em diferentes níveis de aeração e seu efeito em *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Agronomia

Orientador(a):

Prof. Dr. Nicolau Brito da Cunha

Coorientador(a):

Dr.ª Izabela Nunes do Nascimento

Brasília

2024

CIP - Catalogação na Publicação

AF866p

Alves Freire, Ítalo.
Produção e controle de qualidade de Bacillus thuringiensis em biofábricas On Farm em diferentes níveis de aeração e seu efeito em Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) / Ítalo Alves Freire; orientador Nicolau Brito da Cunha; co-orientador Izabela Nunes do Nascimento. -- Brasília, 2024.
39 p.

Monografia (Graduação - Agronomia) -- Universidade de Brasília, 2024.

1. Inseticida microbiológico. 2. Fermentação aeróbica. 3. Lagarta-do-cartucho-do-milho. 4. Bioensaio. I. Brito da Cunha, Nicolau, orient. II. Nunes do Nascimento, Izabela , co-orient. III. Título.

Ítalo Alves Freire

Produção e controle de qualidade de *Bacillus thuringiensis* em biofábricas *On Farm* em diferentes níveis de aeração e seu efeito em *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Agronomia.

Data da aprovação: 24/09/2024

Nicolau Brito da Cunha— Orientador
Doutor em Agronomia
Professor da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (UnB)

Izabela Nunes do Nascimento — Coorientadora
Doutora em Agronomia
SoluScience/Solubio Tecnologias agrícolas

Alessandra Monteiro de Paula — Membro da Banca
Doutora em Agronomia
Professora da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (UnB)

Rose Gomes Monnerat— Membro da Banca
Doutora em Agronomia
SoluScience/Solubio Tecnologias Agrícolas

Dedico este trabalho aos meus pais, familiares e amigos que me apoiaram na realização desse sonho.

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos a empresa SoluBio/SoluScience pelo espaço e financiamento para a realização desse trabalho, e toda a equipe da SoluScience pelo apoio técnico, especialmente a Breno Béda, pelas dietas e insetos. À Dr.ª Izabela Nunes e ao Dr. Marcelo de Castro pelo suporte na idealização, condução, orientação e revisão. Ao professor Nicolau Brito pelos ensinamentos, apoio e orientação.

A Universidade de Brasília e todo o corpo docente da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, por contribuírem com seus conhecimentos para minha profissionalização.

RESUMO

A produção *On Farm* tem sido utilizada legalmente por agricultores no Brasil, nas últimas décadas, devido à possibilidade da multiplicação em larga escala de microrganismos usados como promotores de crescimento e no controle biológico de pragas e doenças. A multiplicação de *Bacillus thuringiensis* tem alguns desafios, incluindo o fornecimento de oxigênio*,* parâmetro decisivo na fermentação. Nesse estudo, foram realizadas a produção e o controle de qualidade de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* cepa HD-1 (S1450) em sistema de biofábricas *On Farm* sob três níveis de aeração (0,2, 0,5 e 0,8 vvm) quanto à produção de esporos, cristais, presença de contaminações e determinação da concentração letal para 50% da população (CL_{50}), dos multiplicados sobre lagartas de *Spodoptera frugiperda,* em dieta artificial. Para a multiplicação, foram utilizadas três biofábricas de inox de 1000 litros com diferentes taxas de aeração, utilizando meio de cultura (SM) e inóculo, comerciais, em três repetições. Na detecção de contaminações, foram usados três meios seletivos e sequenciamento de DNA. Os meios de cultura empregados não apresentaram seletividade adequada. As amostras de biofábricas foram usadas no bioensaio contra larvas de 2° ínstar de *S. frugiperda* e determinada a CL_{50} de cada uma. Foi observada diferença significativa entre o número de esporos viáveis em 24 horas, para os três níveis. 0,2 vvm ($4,07\times10^{7}$) diferiu significativamente de 0,5 ($1,32\times10^{8}$) e 0,8 vvm ($1,48\times10^{8}$). Em 48h não houve diferença estatística entre taxas de aeração. A CL_{50} foi calculada para 0,2 vvm ($7,06\times10^{4}$), 0,5 vvm ($1,25\times10^{4}$), 0,8 vvm ($8,19\times10^{3}$) e inóculo ($3,79\times10^{3}$). A menor dose foi obtida com o produto comercial, seguido de 0,8 e 0,5 vvm que não diferiram entre si, e 0,2 vvm apresentando a maior dose, diferindo das demais. Os resultados encontrados evidenciam ser possível obter boas multiplicações de Bt e eficiência contra *S. frugiperda*, no sistema adotado*,* fornecendo base para futuros estudos com esse e outros microrganismos.

Palavras-chave*:* Inseticida microbiológico. Fermentação aeróbica. Lagarta-do-cartucho-do-milho. Bioensaio.

ABSTRACT

On Farm production has been used legally by farmers in Brazil in recent decades due to the possibility of large-scale multiplication of microorganisms used as growth promoters and in the biological control of pests and diseases. The multiplication of *Bacillus thuringiensis* has some challenges, including the supply of oxygen, a decisive parameter in fermentation. In this study, the production and quality control of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* strain HD-1 (S1450) was carried out in an *On Farm* biofactory system under three levels of aeration (0.2, 0.5 and 0.8 vvm) with regard to the production of spores, crystals, and the presence of contamination, culminating in the application of the cultures on *Spodoptera frugiperda* caterpillars (artificial diet) and the determination of the lethal concentration for 50% of the population (LC_{50}). For multiplication, three 1000-liter stainless steel biofactories with different aeration rates were used with commercial culture medium (SM) and inoculum in three replicates. The LC_{50} of each of the biofactory samples was obtained by using them in a bioassay against *S. frugiperda* larvae in their second stage. A significant difference was observed between the number of viable spores at 24 hours for the three levels. 0.2 vvm (4.07×10^7) differed significantly from 0.5 (1.32×10^8) and 0.8 vvm (1.48×10^8). At 48 h, there was no statistical difference between aeration rates. The LC_{50} was calculated for 0.2 vvm (7.06×10^4), 0.5 vvm (1.25×10^4), 0.8 vvm (8.19×10^3), and the commercial product (3.79×10^3). The lowest dose was obtained with the commercial product, followed by 0.8 and 0.5 vvm, which did not differ from each other, and 0.2 vvm presenting the highest dose, differing from the others. Based on the results, which demonstrate that good Bt multiplications and efficiency against S. frugiperda can be achieved in the system used, further research utilizing this and other microorganisms can be conducted.

Keywords: Microbiological insecticide. Aerobic fermentation. Corn fall armyworm. Bioassay.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 10
2 REVISÃO DE LITERATURA 11
2.1 Bioinsumos 11
2.2 *On Farm*: sistema para produção microbiana em larga escala 12
2.2.1 Controle de qualidade na produção *On Farm* 13
2.4 Bacillus thuringiensis 14
2.4.1 Atividade de proteínas inseticidas produzidas por *Bt* 15
2.4.2 Efeito da aeração na multiplicação de *Bt* 16
2.5 Lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*) 16
2.5.1 Contexto atual dos inseticidas microbianos para controle de *S. frugiperda* no Brasil 17
3 MATERIAIS E MÉTODOS 19
3.1 Multiplicação em biofábrica 19
3.1.1 Determinação da concentração de esporos viáveis 20
3.1.2 Determinação da presença de contaminações 21
3.2 Bioensaios de dose 22
4 RESULTADOS 25
4.1 Multiplicação em biofábricas 25
4.1.1 Concentração de esporos viáveis 25
4.1.2 Avaliação da presença de contaminações 28
4.2 Determinação da CL_{50} 29
5 DISCUSSÃO 30
6 CONCLUSÃO 33
REFERÊNCIAS 34

1 INTRODUÇÃO

A adoção do controle biológico de pragas e doenças nas lavouras cresce a cada ano no Brasil, com uma média de crescimento de 21% nos últimos três anos (CropLife Brasil, 2024). Nesse contexto, a produção *On Farm* tem sido utilizada legalmente por agricultores nos últimos 15 anos (BRASIL, 2009), possibilitando a multiplicação em larga escala de microrganismos promotores de crescimento e para o controle de pragas e doenças, com o uso de bactérias e fungos, principalmente. Há duas vertentes da produção no país, a primeira mais moderna, com equipamentos automatizados, tratamento da água, uso de meios de cultura estéril, inóculo puro, ajuste de temperatura, pH, pressão, aeração e espuma, e controle da qualidade dos bioinsumos. A segunda emprega pouca tecnologia, utiliza insumos de baixa qualidade para a multiplicação, como resíduos da própria fazenda, água não tratada, inóculo sem pureza e falta de controle de qualidade final (Faria et al., 2023; Santos; Dinnas; Feitosa, 2020). A seleção de resistência dos insetos a inseticidas e os danos causados a organismos não-alvo dos inseticidas químicos, por exemplo, isso levou a um interesse crescente em métodos biológicos, incluindo métodos de controle microbiológico (Moazami, 2011).

Os biopesticidas possuem alta seletividade para as pragas alvo e aumentam o rendimento das culturas. *Bacillus thuringiensis* (Bt) é um dos microrganismos mais utilizados no controle de pragas agrícolas. É uma bactéria gram-positiva em forma de bastonete que ocorre naturalmente no solo, em insetos mortos e outros ambientes (Lambert; Peferoen 1992, Valicente; Barreto 2003). As proteínas inseticidas de Bt são as mais utilizadas, devido à sua especificidade, são ativas mesmo em doses baixas e biodegradáveis no ambiente. *Bt* é exclusivamente ativo contra as fases larvais de diferentes ordens de insetos, especialmente Lepidoptera e Diptera (Raymond et al. 2010). A proteína tóxica liga-se especificamente aos receptores intestinais das espécies-alvos de pragas, matando as larvas por inanição e septicemia (Ndao et al., 2017).

Uma das principais pragas das grandes culturas é a lagarta-do-cartucho-do-milho, *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), um inseto-praga polífago que causa danos significativos em várias plantas, incluindo milho, algodão, arroz, soja, tomate, batata, cebola, feijão, repolho, sorgo, entre outros (Day et al.,

2017). *S. frugiperda* é um dos insetos-praga mais importantes do milho no Brasil e o controle tem sido realizado quase que exclusivamente com o uso de inseticidas químicos. Os inseticidas microbianos se tornaram uma alternativa viável de controle, considerada uma ferramenta segura e importante no Manejo Integrado de Pragas (Moscardi, 1999; Mascarin et al., 2018), incluindo o uso de *B. thuringiensis*.

A multiplicação *On Farm* de *Bacillus thuringiensis* tem alguns desafios, incluindo o fornecimento de oxigênio*,* parâmetro decisivo na fermentação (Mounsef et al., 2015), altas taxas de aeração promovem maior produção celular, esporos e delta-endotoxinas (Boniolo et al., 2012). Porém, pouco se sabe sobre a cinética do processo quando se trata de multiplicação de bactérias em biofábricas *On Farm*, tampouco sobre seu efeito na esporulação e formação de cristais proteicos, essenciais para o controle dos insetos-praga.

Esse trabalho teve como objetivos: i) produzir e realizar o controle de qualidade de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* cepa HD-1 em sistema de biofábricas *On Farm* sob três taxas de aeração (0,2, 0,5 e 0,8 vvm) quanto à produção de endósporos, cristais e presença de contaminações; ii) calcular a CL50 dos multiplicados sobre lagartas de *Spodoptera frugiperda,* em laboratório.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Bioinsumos

A adoção de bioinsumos na agricultura tem crescido nos últimos anos (CropLife Brasil, 2024). Ocasionado pelas exigências do mercado consumidor por alimentos produzidos de forma mais sustentável e pela redução do uso de agroquímicos. Inoculantes à base de *Bradyrhizobium* spp. para fixação biológica de nitrogênio (FBN), co-inoculação com *Azospirillum* spp., mobilizadores de fósforo e biofungicidas à base de *Bacillus* spp., são os principais exemplos desses bioprodutos no Brasil (Bueno et al., 2022).

De acordo com Souza; Castilho e Macedo (2022), a crise sanitária causada pelo Covid 19 afetou mundialmente a economia, e muitas empresas e produtos sofreram quedas de produtividade e vendas, afetando diversos setores. No setor agrícola, a situação não foi diferente. Entretanto, no Brasil, o incentivo público e as ações governamentais, juntamente com a eficácia dos produtos de base biológica,

devido às suas vantagens econômicas e ecológicas, alavancaram o crescimento do mercado de bioinsumos no país.

O desenvolvimento de um produto biológico é regulado por um conjunto de leis e outros tipos de instrumentos normativos nas esferas da agricultura (MAPA), do meio ambiente (IBAMA) e da saúde (ANVISA), as quais incluem também aspectos relativos ao acesso ao patrimônio genético. As etapas para a regulação dos produtos biológicos incluem a coleta do material biológico a ser pesquisado, a identificação, a experimentação no laboratório, o desenvolvimento de formulação (quando for o caso), a experimentação no campo do produto final ou do agente biológico e o registro do produto comercial (EMBRAPA, 2023).

O Decreto n.º nº 6.913, de 2009, trouxe em seu § 8º a prerrogativa da multiplicação de bioinsumos nas fazendas, sem a necessidade de registro.

> § 8º Ficam isentos de registro os produtos fitossanitários com uso aprovado para a agricultura orgânica produzidos exclusivamente para uso próprio em sistemas de produção orgânica (BRASIL, 2009).

2.2 *On Farm*: sistema para produção microbiana em larga escala

O conceito e o processo do que se entende como produção *On Farm* no Brasil evoluíram nos últimos anos. Amaral (2022) conceitua *On Farm* como a produção, na propriedade rural, de produtos de base biológica para o controle de pragas e doenças, bem como a promoção do crescimento das plantas por mecanismos nutricionais e não nutricionais.

A aplicação de resultados de pesquisas biotecnológicas realizadas nas últimas duas décadas por instituições públicas e privadas resultou no desenvolvimento de pacotes tecnológicos alinhados ao manejo *On Farm* (informação pessoal). Algumas empresas do setor de bioinsumos, como a SoluBio, a Agrobiológica e a TopBio, possuem destaque em soluções como: infraestrutura, equipamentos (biofábricas de inox automatizadas com ajuste de temperatura, aeração e outros) e os insumos utilizados em todo o processo de multiplicação de microrganismos *On Farm* (produtos para limpeza CIP, tratamento da água, regulador de pH, controlador de espuma, meio de cultura e inóculo). Na Figura 1, são exemplificados alguns modelos das chamadas

“biofábricas” ou fermentadores, que se destinam ao escalonamento de bioinsumos nas unidades de produção dos clientes dessas empresas.

Figura 1. Modelos de biofábricas automatizadas do tipo *On Farm*, adotados por empresas de bioinsumos no Brasil (Fotos obtidas dos sites das empresas descritas).



A fermentação líquida é a mais utilizada para a multiplicação de bactérias do gênero *Bacillus*, tanto nas empresas de controle biológico, como nas propriedades privadas que fazem a produção *On Farm*. Esse fato se deve às características da técnica, bem como pela versatilidade desse grupo de organismos (Bettiol et al., 2022).

2.2.1 Controle de qualidade na produção *On Farm*

Faria et al. (2023) apresentam as características contrastantes entre a produção comercial e *On Farm* de bioinseticidas no Brasil. Traz o controle de qualidade, ou avaliação da presença de microrganismos indesejados e

contaminações nos processos *On Farm*, como sendo a principal dificuldade encontrada. Os altos níveis de contaminação, superiores a concentração mínima de 5×10^2 CFU/mL (Monerat et al., 2020) são comumente encontrados na maioria das preparações feitas em tanques abertos e em condições não estéreis. O controle de qualidade nessas multiplicações não é realizado por agricultores que não adotam tecnologia em sua produção, devido principalmente aos custos de investimento com infraestrutura, equipamentos e treinamento de pessoal. Ainda, em 2024 é aguardado o estabelecimento legal de normas pertinentes à produção *On Farm* no país.

Entre os grandes agricultores, o controle de qualidade é realizado em algumas propriedades ou por laboratórios especializados, mas ainda não existe uma diretriz harmonizada que indique claramente quais são os testes necessários e os níveis de contaminação aceitáveis (Faria et al., 2023). O programa nacional de bioinsumos instituído pelo Decreto n.º 10.375, de 26 de maio de 2020, atribuiu algumas competências a seu conselho estratégico como a promoção de boas práticas de produção e uso de bioinsumos, bem como a capacitação e divulgação aos níveis nacionais e internacionais (BRASIL, 2020). Nesse ínterim, pouco tem sido feito, em se tratando da multiplicação de bioinsumos pelos próprios agricultores.

Bocatti et al. (2022) avaliaram a qualidade microbiológica de inoculantes à base de *Bradyrhizobium* spp. e *Azospirillum brasilense*, produzidos *On Farm*, observaram ausência das bactérias-alvo e uma alta contaminação por microrganismos não-alvo. Em seus dados sumarizados, é possível observar a falta de padronização entre processos de multiplicação, bem como a variabilidade de tempos de cultivo, estrutura adotada, a maioria deles tratando-se de tanques abertos.

2.4 Bacillus thuringiensis

B. thuringiensis é uma bactéria esporogênica presente em praticamente todos os ambientes e produz cristais proteináceos de prototoxinas (chamados de proteína cristal ou proteína Cry) durante a esporulação (LI et al., 2015) (Figura 2). A síntese das proteínas Cry está intimamente ligada à fase de esporulação, que ocorre quando a cultura entra na fase de crescimento estacionário. Os esporos maduros e os cristais são liberados no caldo por lise dos esporângios durante as últimas horas de fermentação (Aronson, 2002).

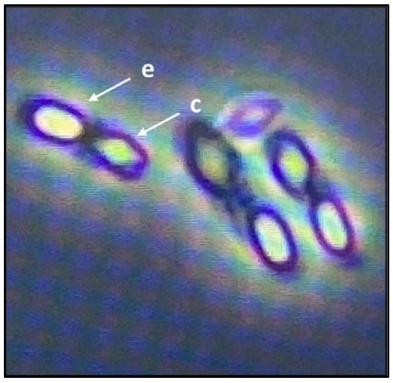


Figura 2. Célula de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* cepa HD-1, sob aumento de 1000x em microscópio de contraste de fases, mostrando a morfologia elipsoide do endósporo (e) e cristal proteico bipiramidal (c). (Autor)

O uso de Bt como inseticida microbiológico é amplamente aceito e seguro, apresentando baixa ou nenhuma toxicidade a insetos não alvos (IBAMA, 2019), também observado por Brighenti et al. (2005) em ensaio com abelhas.

2.4.1 Atividade de proteínas inseticidas produzidas por *Bt*

As delta-endotoxinas, sintetizadas como protoxinas, são produzidas em grandes quantidades durante a esporulação, sendo armazenadas em inclusões intracelulares. A ingestão das inclusões pelas larvas de insetos leva à solubilização da protoxina e à conversão em toxinas, cada uma específica para uma das várias ordens de insetos. As toxinas formam canais seletivos de cátions na membrana das células que revestem o intestino médio da larva com subsequente letalidade (Bauman e Malvar, 1995; Aronson, 2002; Raymond et al., 2008).

Alguns estudos mostram a capacidade de estirpes de *B. thuringiensis* em produzir proteínas tóxicas a insetos de ordens como Lepidoptera e Diptera. Aarthi et al. (2024) identificaram cepas de *Bt* capazes de controlar a mosca-das-frutas do meloeiro (*Zeugodacus cucurbitae*, Diptera), com taxa de mortalidade de até 92%. Os genes cry1A, cry2A, cry1C, cry19, cry11 e cry70 apresentaram uma frequência de 100, 88, 84, 74, 58 e 54%.

Silva et al. (2004) avaliaram três linhagens brasileiras de *Bt* e observaram alto potencial de mortalidade de larvas de segundo ínstar de *S. frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) e *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae), duas delas

pertencentes à subespécie *kurstaki*. Estas apresentaram um padrão proteico similar com *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* cepa HD-1.

2.4.2 Efeito da aeração na multiplicação de *Bt*

A transferência de oxigênio (aeração) no processo de multiplicação de bactérias do gênero *Bacillus* representa um fator de extrema importância no processo de esporulação e também na formação de proteínas inseticidas por cepas de *Bt.* Em estudo avaliando variações de aeração na multiplicação dessa bactéria, em biorreatores, obteve-se maior concentração de esporos, com taxas de aeração de 0,5 a 1 vvm. Em comparação, sob condições de baixa disponibilidade de O_2, a produção de esporos e δ-endotoxinas foi severamente prejudicada (Avignone-Rossa; Arcas; Mignone 1992).

Mounsef et al. (2015) relataram a falta de informação disponível sobre a cinética do processo fermentativo com *B. thuringiensis*. Em escala comercial, o objetivo é completar a fermentação num período mínimo, sem comprometer a quantidade de δ-endotoxinas produzidas, o que reduziria o custo do consumo de energia envolvido no funcionamento dos biorreatores. Esse mesmo entendimento se estende à prática de multiplicação *On Farm* em biofábricas automatizadas de grandes volumes, normalmente de 1000 a 2000 litros, que demandam relativamente alto custo energético para funcionamento.

2.5 Lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*)

Spodoptera frugiperda é considerada a principal praga do cultivo do milho nas Américas, causando perdas significativas de produção (Valicente, 2015). Além disso, causa danos econômicos em outras culturas como algodão, arroz, sorgo, feijão e amendoim (Martinelli et al., 2006; Casmuz et al., 2010).

O ciclo de vida da lagarta-do-cartucho é completado em aproximadamente 35 dias, dependendo da temperatura, sendo em média 15 dias na fase de lagarta, aproximadamente 10 dias na fase de pupa, que ocorre no solo e em torno de 10 dias na fase adulta, onde os adultos emergem e novamente ovipositam nas plantas das lavouras (Oliveira et al., 2023).

2.5.1 Contexto atual dos inseticidas microbianos para controle de *S. frugiperda* no Brasil

Estão registrados no Brasil, de acordo com dados do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (Agrofit-MAPA, 2024), 78 produtos comerciais indicados para o controle de *S.frugiperda*, em 17 deles consta *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, isolado HD-1 (S1450) como ingrediente ativo (Tabela 1).

Produtos comerciais à base de *B. thuringiensis* são compostos por uma mistura de cristais, esporos, poucas células vegetativas e ingredientes relacionados à formulação dos biopesticidas (Capalbo et al., 2004).

Apresenta recomendação para o controle das pragas *Alabama argillacea* (Curuquerê-do-algodoeiro), *Spodoptera frugiperda* (Lagarta-do-cartucho), *Anticarsia gemmatalis* (Lagarta-da-soja) e *Chrysodeixis includens* (Lagarta-falsa-medideira), nas culturas que apresentarem o alvo biológico. Há ainda aqueles em que é utilizada a mesma cepa anteriormente citada, todavia, não possuem recomendação para os mesmos insetos-pragas.

Tabela 1. Inseticidas microbiológicos registrados no MAPA (2024), compostos de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, isolado HD-1 (S1450), marca comercial, concentrações do ingrediente ativo (I.A.), tipo de formulação (SC-Suspensão Concentrada; WG-Grãos Dispersíveis em Água; WP-Pó Molhável) e empresa detentora do registro.

Marca Comercial	Conc. I.A.	Tipo	Empresa
Agbti	940 g/L	-	BINOVA AGRO INDUSTRIAL LTDA
Bacillus Thuringiensis Bom Futuro	36 g/L	SC	Bom Futuro Agrícola Ltda. - Campo Verde/MT
Bacmix BTKSC	34 g/L	SC	Cooperativa Mista de Desenvolvimento do Agronegócio/COMDEAGRO - Primavera do Leste/MT
Bettus Org; Vitales Gratto Turi; BT-Ouro;	40 g/L	SC	Nooa Ciencia e Tecnologia Agrícola Ltda

Biagro Cristalles	70 g/L	SC	Simbiose Indústria e Comércio de Fertilizantes e Insumos Microbiológicos Ltda.
BioBac T	40 g/L	SC	Vital Brasil Chemical Industria e Comercio de Produtos Quimicos Ltda - ME
BT Protection	491 ml/L	SC	Bioma Indústria Comércio e Distribuição Ltda - Fazenda Rio Grande/PR
Btkill JCO	126,1 ml/L	SC	JCO Indústria e Comércio de Fertilizantes Ltda.
BT-Turbo Max; BT-Guard; BT-Turbo; Power BAC BT;	165 g/L	SC	Vittia S.A. - São Joaquim da Barra 01
Cryper	120 ml/L	SC	Hubio Biopar Agro Indústria e Comércio de Produtos Químicos e Biológicos Ltda. – Alvorada/MG
Dipel	33,6 g/L	SC	Sumitomo Chemical Brasil Indústria Química S.A. - Maracanaú/CE
Dipel ES-NT; Biobit; Quark; Bactospeine;	250 g/L	SC	Sumitomo Chemical Brasil Indústria Química S.A. - Maracanaú/CE
Dipel WG	540 g/kg	WG	Sumitomo Chemical Brasil Indústria Química S.A. - Maracanaú/CE
Ecobaci T	40 g/L	SC	Vital Brasil Chemical Industria e Comercio de Produtos Quimicos Ltda - ME
Tec Catp Pro	300 g/L	SC	Solubio Tecnologias Agricolas S.A. – Jataí/GO
Thuricide	32 g/kg	WP	Bio Controle - Métodos de Controle de Pragas Ltda.
Turin-Cry S	33 g/L	SC	Prophyto Comercio e Serviços Ltda. – São Paulo/SP

Fonte: Agrofit-MAPA, 2024.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O ensaio foi conduzido no centro de pesquisa SoluScience da empresa SoluBio Tecnologias Agrícolas S.A., em Brasília-DF. As biofábricas, meio de cultura (SM, a dieta artificial e larvas de *S. frugiperda*, e demais reagentes utilizados, foram fornecidos pela empresa. Como inóculo, foi utilizado um produto comercial, produzido em biorreatores industriais, contendo *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, isolado HD-1 (S1450) na concentração de 5,80 x 10^8 UFC/mL.

3.1 Multiplicação em biofábrica

Três biofábricas de inox automatizadas com capacidade de 1000 L e diferentes níveis de aeração (0,2, 0,5 e 0,8 vvm (volume de ar/ volume de meio/ minuto) foram utilizadas para o cultivo de Bt. Inicialmente, as peças removíveis foram retiradas e higienizadas para a remoção de biofilme, em seguida montadas e conduziu-se a limpeza interna do tanque com produto composto por peróxidos, na concentração de 1% em 250 litros de água, por uma hora. O passo seguinte, foi o descarte de água do processo de limpeza.

Para a multiplicação, adicionaram-se 1000 litros de água e 3 litros de um produto à base de peróxidos para tratamento da água, mantido sob agitação por 30 minutos, foi então utilizado um neutralizador do composto. A temperatura da água no tanque foi ajustada para 28 °C (± 2°C), adicionaram-se 2% (p/v) de meio de cultura estéril, e o pH foi ajustado para 7,0 (± 0,2) utilizando hidróxido de sódio (NaOH) e/ou ácido cítrico ($C_6H_8O_7$). A última etapa consistiu na adição de 1% (v/v) do inóculo puro da bactéria, avaliado previamente por microscopia de contraste de fases (aumento 1000x). Durante a colocação do meio e do inóculo, foram tomados os cuidados necessários para evitar a contaminação, como a aplicação de álcool 70% nas embalagens e tampas das biofábricas, mantendo-as abertas pelo menor tempo possível durante o manuseio. Além da utilização de todos os EPIs recomendados durante o processo de manuseio dos produtos.

Foi coletada uma amostras de cada etapa do processo (água do tanque antes da limpeza, água do tanque limpo, água tratada e a água com meio de cultura), para rastrear a presença de contaminações e a esterilidade dos produtos empregados. Estas foram semeadas em placas de Petri contendo meio de cultura TSA (Tripticase

de Soja Agar, Himedia) utilizando-se alça de inoculação e mantidas a 28 °C/60% UR em estufa de crescimento, por 24 horas.

Em 24 e 48h de multiplicação nas biofábricas, foram retiradas duas amostras em tubos Falcon estéreis, para a utilização no plaqueamento visando determinar o número de esporos viáveis/ mL, na avaliação de contaminações e no ensaio de letalidade contra *S. frugiperda*. O estudo foi conduzido em três repetições para as multiplicações em cada taxa de aeração.

3.1.1 Determinação da concentração de esporos viáveis

Um microscópio de contraste de fases com aumento de 1000x foi usado para a visualização da presença de esporos e cristais, e escolha das diluições a serem plaqueadas conforme a concentração, sendo três diluições selecionadas para cada amostra de biofábrica 24 e 48h, variando da terceira a sexta diluição.

Na avaliação dos endósporos de Bt produzidos em cada nível de aeração, adotou-se choque térmico nas amostras para separação dos esporos e células vegetativas. Foi utilizado o procedimento descrito por Alves et al. (2001), com adaptações. De cada uma das repetições dos diferentes tratamentos, 1 mL foi transferido para um microtubo de 2 mL. Em seguida, foram submetidas ao choque térmico: primeiro em chapa aquecedora a 80 °C por 12 minutos e depois disso, em placa de gelo para microtubos, por 5 minutos.

O número de esporos viáveis por mL foi quantificado com a utilização da técnica de espalhamento das amostras em placas de meio TSA, por diluição seriada decimal, utilizando-se amostras de 24 e 48h das biofábricas, com e sem choque térmico (quando detectada a formação de endósporos), para cada taxa de aeração, em triplicata de cada diluição, para acompanhamento do processo de multiplicação.

Após o tratamento térmico nas amostras, 100 µL das diluições decimais selecionadas foram transferidos para a superfície do ágar (TSA), o espalhamento se deu com utilização de uma alça tipo “T” estéril, até completa secagem do líquido. Aproximadamente 24h depois da incubação, em BOD a 30 °C, na ausência de luz, foi realizada a contagem nas diluições que apresentaram entre 30 e 300 colônias de Bt, normalmente a quinta ou sexta diluições. Para a determinação, utilizou-se da fórmula:

Esporos viáveis /mL = número médio de colônias nas três placas x diluição da amostra x 10 (fator de correção para ml).

A análise de variância para os dados de multiplicação nos três níveis de aeração foi obtida utilizando-se Software de Análises Estatísticas (SAS, versão 3.8). Os dados de esporos viáveis/mL foram transformados para logaritmo. Os valores médios são apresentados em exponencial.

3.1.2 Determinação da presença de contaminações

Na ausência de critérios definidos para avaliação da presença de contaminações em bioinsumos produzidos no sistema *On Farm*, foram adotadas as recomendações estabelecidas na Portaria Conjunta SDA/MAPA - IBAMA - ANVISA nº 1, de 10 de abril de 2023 (Brasil, 2023), que estabelece procedimentos e requisitos a serem adotados para o registro de produtos microbiológicos para uso na agricultura, produzidos industrialmente. Na Figura 3 e Tabela 2, estão apresentados e descritos os meios de cultura seletivos empregados e as contaminações avaliados, assim como as concentrações máximas permitidas, segundo a Portaria. Devido à limitação na seletividade desses meios, amostras de possíveis contaminações foram enviadas para análise por sequenciamento de DNA (16S rRNA) para investigação. Além disso, foi analisada a presença de outras contaminações durante a multiplicação, na microscopia em 24h e 48h e nos plaqueamentos em TSA. Não foi realizada a contagem de colônias, por não se apresentarem dentro da faixa de 30 a 300 colônias

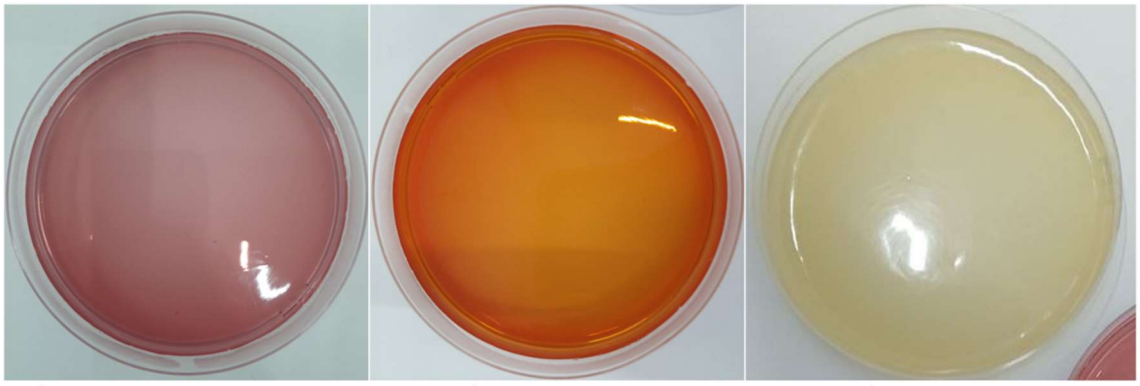
Para tanto, 100 µl da 3ª diluição de cada amostra foram transferidos para uma placa de Petri, contendo o meio de cultura seletivo referente, em duplicata de cada um. Com uma alça de Drigalski, foi feito o espalhamento até completa secagem. Mantiveram-se as placas invertidas e isoladas com filme PVC, em estufa de crescimento por 24 h, seguindo-se os requisitos de incubação adequados aos meios de cultura. Após 24 horas, foram avaliadas a presença das contaminações referidos na Tabela 2.

Tabela 2. Meios de cultura para a detecção da presença de contaminações em bioinsumos multiplicados *On Farm*. Os meios de cultura adotados não constam na referida Portaria.

Microrganismo	Especificação	Meio de cultura adotado
Coliformes termotolerantes	≤ 103 UFC/g ou ml	Ágar Bile Cristal-Violeta Vermelho
Salmonella spp.	Ausente em 25g ou mL	Ágar Verde-Brilhante
Staphylococcus coagulase +	≤ 103 UFC/g ou ml	Ágar Baird-Parker

Fonte: Adaptado de Portaria Conjunta SDA/MAPA - IBAMA - ANVISA nº 1, de 10 de abril de 2023.

Figura 3. Meios de cultura seletivos utilizados na avaliação da presença de contaminações microbianas, em amostras de multiplicação em biofábricas *On Farm*, nesse trabalho.



Fonte: Autor

3.2 Bioensaios de dose

Os insetos utilizados para o bioensaio foram provenientes do laboratório de criação da empresa SoluBio Tecnologias Agrícolas S.A., onde é feita a criação massal, mantida conforme descrito por Schmidt et al. (2001). Para o bioensaio, adotou-se a metodologia de Silva-Werneck e Monnerat (2001). O inóculo do produto

comercial contendo a cepa de *Bt* subsp. *kurstaki* cepa HD-1*,* foi utilizado como controle positivo.

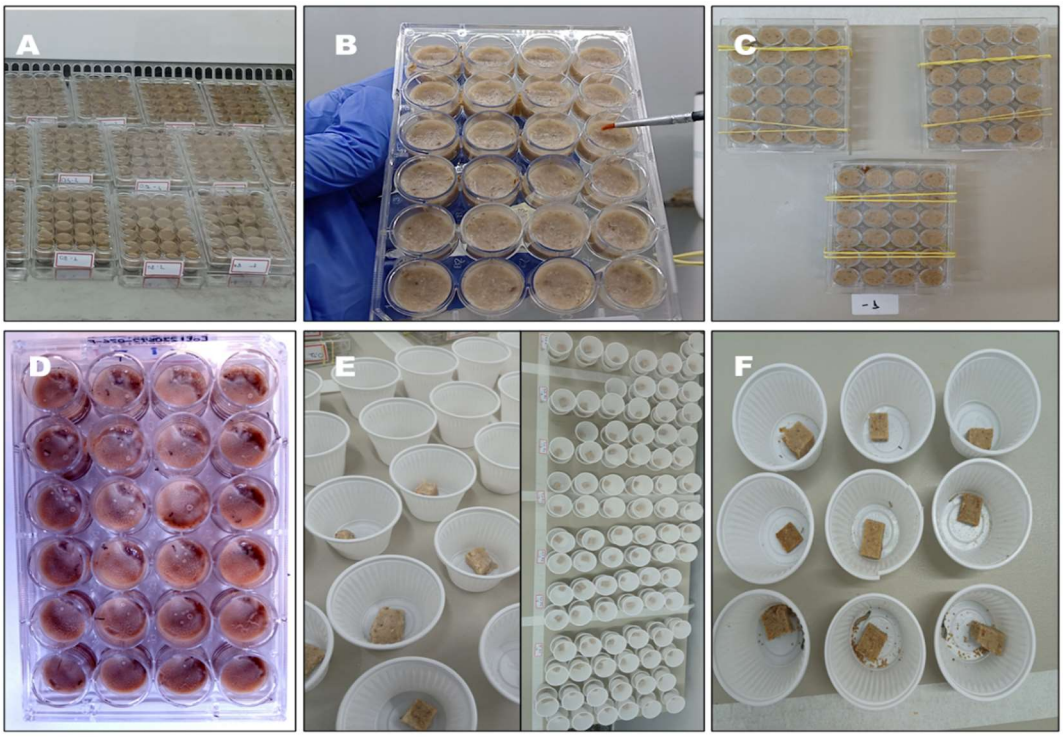
A avaliação da mortalidade de *S. frugiperda* foi conduzida utilizando-se placas de cultura de células de 24 poços e tampas em acrílico, com dieta artificial estéril, composta de feijão-carioca, levedo de cerveja, germe de trigo, ágar e água destilada, preparadas anteriormente e mantidas a 5 °C.

Prepararam-se dez diluições seriais de cada amostra de biofábrica (48 h, totalmente esporulada) (três repetições). Com uma placa para cada diluição e uma controle (submetidas a UV/ 20 min), em cada poço com dieta foram incorporados 35 µl da suspensão bacteriana diluída (exceto controle), mantidas sem a tampa por 30 min em fluxo laminar para a secagem. Uma lagarta de 2° instar foi transferida para cada poço, com o auxílio de um pincel de cerdas macias embebido em água destilada estéril, a tampa de acrílico foi presa com ligas de borracha. As placas permaneceram invertidas, em sala climatizada a 26 °C com fotoperíodo de 12h.

As larvas sobreviventes, após 48 h, foram transferidas para copos plásticos de 50 ml com tampa acrílica, contendo um bloco (aproximadamente 1 cm^3) da dieta artificial, de mesma composição, enriquecida de conservantes e antimicrobianos (Nipagin, formol, ácido ascórbico e ácido sórbico), para a observação do efeito residual dos tratamentos. Após sete dias, foram contabilizadas as larvas mortas e determinado o percentual de mortalidade final em cada diluição. A Figura 4 ilustra os procedimentos descritos anteriormente, bem como, os aspectos observados no experimento. O ensaio foi conduzido em três repetições, uma para cada amostra de multiplicação em biofábrica.

O valor da dose letal para eliminar 50% da população (CL_{50}) e o intervalo de confiança de cada tratamento (0,2, 0,5 e 0,8 vvm) foram estimados com a análise de probit (Finney, 1971) utilizando o pacote estatístico “drc” no software R (R Core Team, Vienna, Austria).

Figura 4. Esquema do processo de bioensaio com *Spodoptera frugiperda* utilizando diferentes concentrações de *Bacillus thuringiensis*. (A) placas Elisa com dieta artificial, inoculadas com Bt; (B) Transferência de larvas para os poços; (C) Acondicionamento das placas inoculadas; (D) Placas com lagartas mortas após 48 h; (E) Copos com dieta para avaliação do efeito residual; (F) Larvas mortas e vivas após 7 dias.



Fonte: Autor

4 RESULTADOS

4.1 Multiplicação em biofábricas

As placas inoculadas com as amostras coletadas antes do início do processo de multiplicação foram avaliadas qualitativamente quanto à presença ou ausência de microrganismos, após 24h de incubação a 30 °C e UR 60%. Em todas as amostras de água antes da limpeza do tanque, houve aparecimento de bactérias. Nas amostras de água do tanque após limpeza com peróxidos, ocorreu pouco ou nenhum crescimento microbiano entre as repetições na mesma biofábrica. Para a água de multiplicação tratada e adicionada de neutralizante, não foram detectadas contaminações, assim como as do meio de cultura, evidenciando sua esterilidade.

4.1.1 Concentração de esporos viáveis

O efeito da aeração no crescimento de Bt em biofábricas *On Farm* foi observado. Na Tabela 3 estão mostrados os valores médios de esporos viáveis (log) obtidos nas três taxas de aeração (0,2, 0,5 e 0,8 vvm), em 24 e 48 horas de multiplicação, assim como os valores de probabilidade ($p<0,05$) encontrados. Foi observada diferença significativa entre o número de esporos viáveis em 24 horas, para os três níveis. 0,2 vvm ($4,07\times10^7$) diferiu significativamente de 0,5 ($1,32\times10^8$) e 0,8 vvm ($1,48\times10^8$), entretanto, não se observou diferença entre as duas últimas.

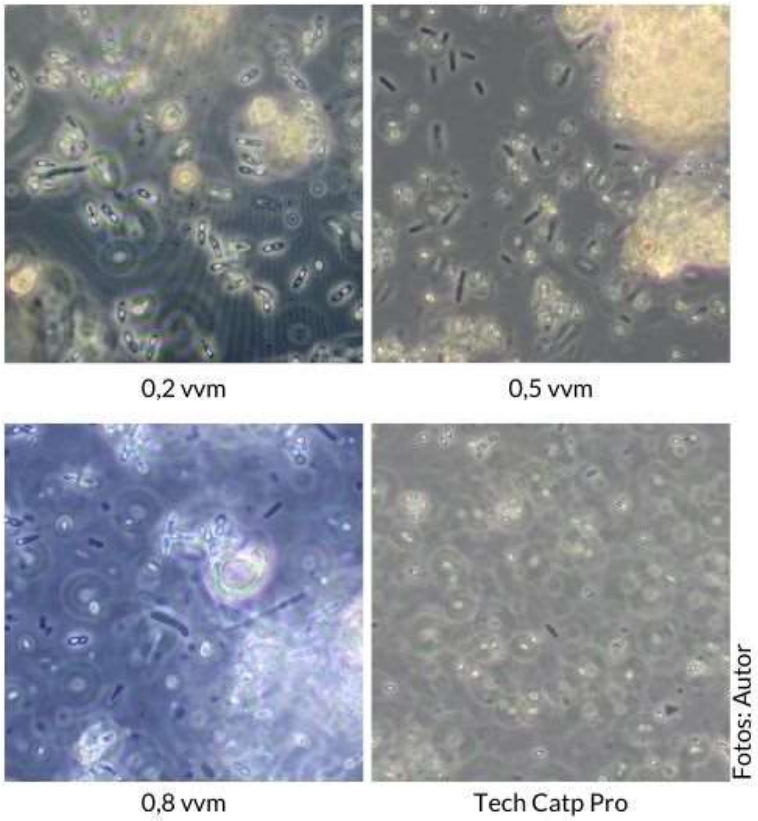
Na Figura 5, são apresentadas imagens obtidas da microscopia (contraste de fases, aumento de 1000x) das amostras de biofábrica e do inóculo, bem como das placas de meio de cultura TSA, utilizadas na determinação do número de esporos viáveis/ mL (Figura 6).

Tabela 3. Número médio de esporos viáveis por mL, após 24 e 48h de multiplicação em biofábrica tipo *On Farm*, sob três taxas de aeração (média de três repetições).

Taxa de aeração (vvm)	N.° de esporos viáveis por mL		
	24h (CV)	48h (CV)	*p*
0.2	$4,07x10^{7}$aA (3,83)	$5,75x10^{7}$aB (0,97)	0,0008*
0.5	$1,32x10^{8}$bA (0,05)	$2,29x10^{8}$aA (0,45)	0,2581
0.8	$1,48x10^{8}$bA (2,45)	$2,82x10^{8}$aA (5,90)	0,4303
p	0,0213*	0,0729	

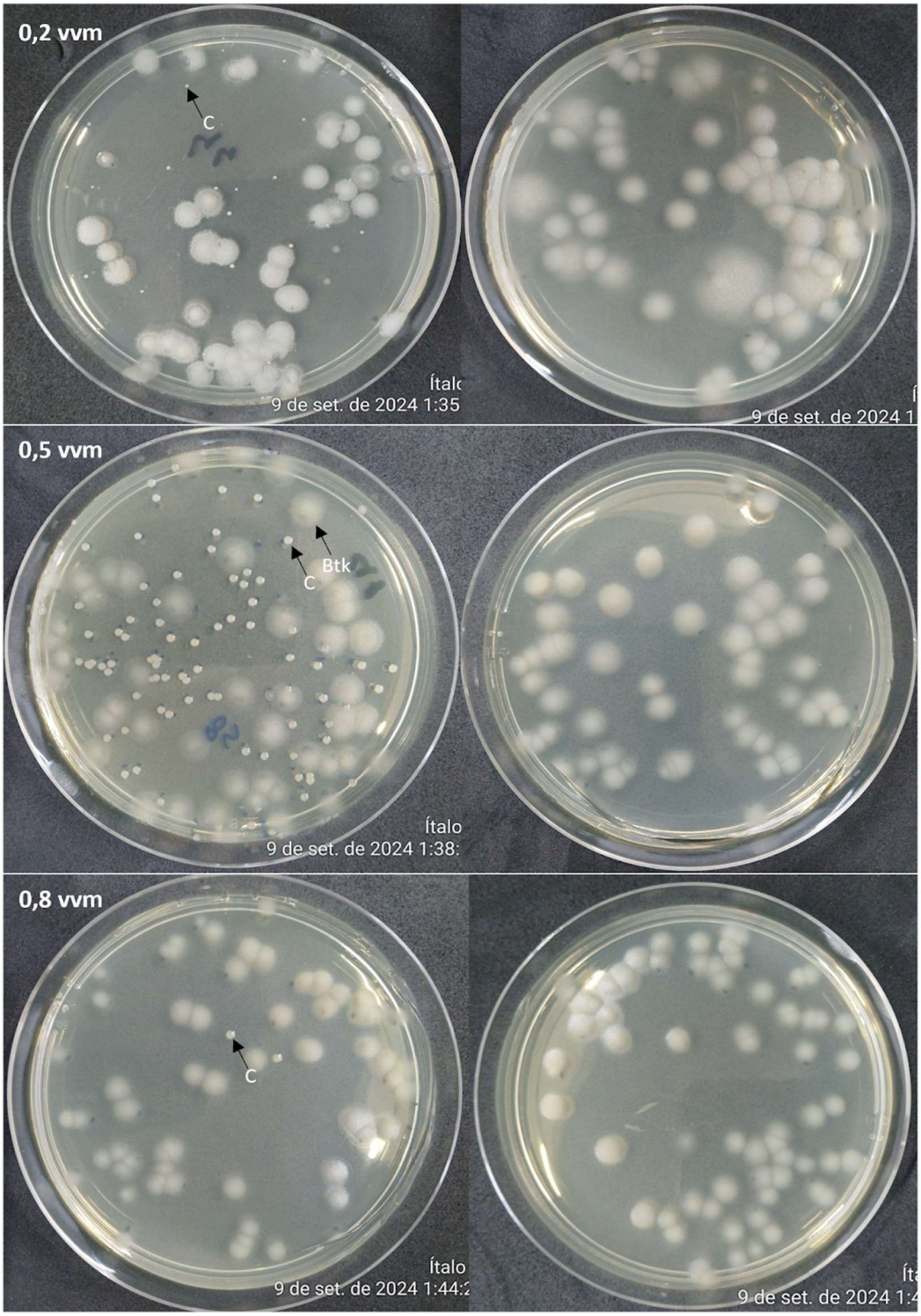
* Letras minúsculas iguais na mesma coluna e letras maiúsculas iguais na mesma linha não indicam diferença significativa pelo teste de Tukey (p<0,05).

Figura 5. Esporos e cristais de *B. thuringiensis* após 48h de multiplicação em biofábricas *On Farm*, vistos em microscópio de contraste de fases (aumento de 1000x).



Fonte: Autor

Figura 6. Colônias de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Btk), obtidas com plaqueamento de diluição serial (-5 e -6) das amostras de biofábricas após 48h de crescimento. (c) indica colônias de, crescidas na amostra sem choque térmico. No lado esquerdo, estão mostradas as colônias de Btk oriundas de esporos viáveis nas amostras.

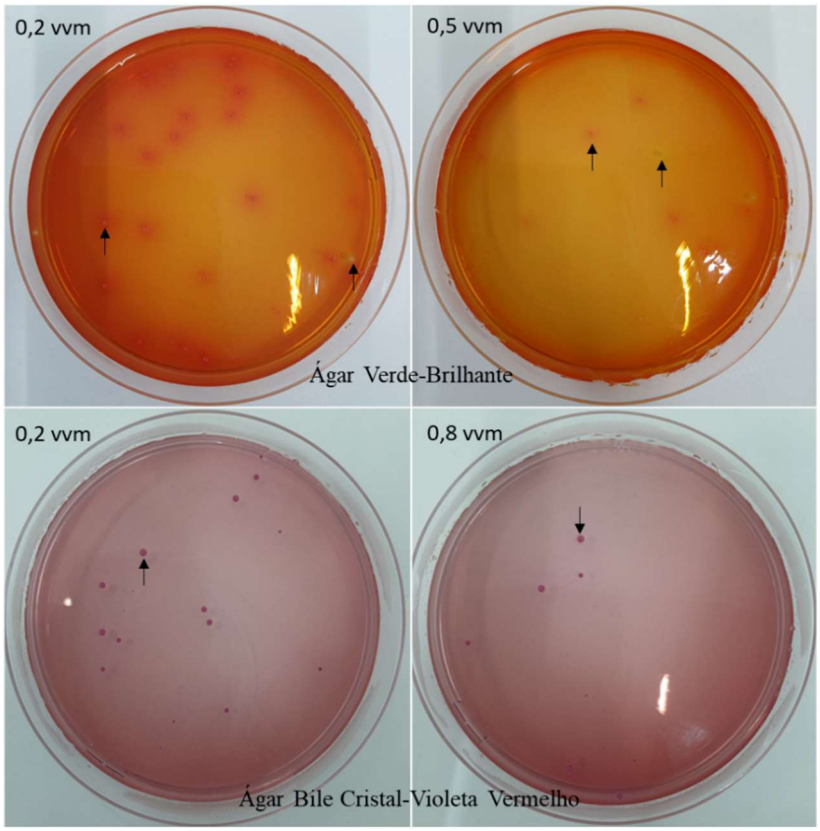


Fonte: Autor

4.1.2 Avaliação da presença de contaminações

Na avaliação da presença de possíveis contaminações, utilizando os meios de cultura seletivos para aquelas descritas pela Portaria (Brasil, 2023) (Tabela 2), não foi detectada sua presença no plaqueamento da diluição seriada (-3) e crescimento nas condições estabelecidas após 24h. Contudo, foi constatada a presença de bactérias indesejadas (Ágar Verde-Brilhante e Ágar Bile Cristal-Violeta Vermelho), e seu perfil genético foi determinado por sequenciamento de DNA (16S rRNA). Tratando-se de cepas de bactérias pertencentes as espécies *Enterobacter hormaechei e Ralstonia pickettii*, ambas não causadoras de doenças em humanos. Estão expostos na Figura 7 os meios e os microrganismos indesejados (setas pretas), com referências às amostras coletadas em biofábricas (0,2; 0,5 e 0,8 vvm), para as quais foram constatadas. Não foi observado o crescimento microbiano no meio de cultura Ágar Baird-Parker**.**

Figura 7. Colônias de bactérias indesejadas (setas pretas) presentes em amostras de biofábricas *On Farm*, após 48 de multiplicação de Bt, utilizando meios de cultura seletivos.



Fonte: Autor

4.2 Determinação da CL_{50}

Os valores de CL_{50} entre taxas de aeração (0,2, 0,5 e 0,8 vvm) e o controle foram significativamente diferentes. Isso fica evidente ao se observar que não ocorre sobreposição entre os limites para o intervalo de confiança (IC) determinado (Tabela 4), exceto para 0,5 e 0,8 vvm. Embora na mesma escala (10^3), o tratamento com 0,5 e 0,8 vvm não resultaram em efeito similar ao produto comercial, com uma CL_{50} significativamente maior, ou seja, menos eficiente no controle. Mostrando que a taxa de aeração adotada na multiplicação em biofábrica após o tempo de 48 horas tem efeito significativo na mortalidade de *S. frugiperda*, e menores valores para CL_{50} resultam em maior mortalidade. Todas diferiram significativamente do controle, utilizando Bt puro e em maior concentração de esporos.

No ensaio controle usando o produto comercial, assim como os demais, não houve mortalidade após a sétima diluição seriada. Nesse caso, não foi necessário adotar diluições maiores. Na avaliação após 7 dias das larvas na dieta de troca sem Bt, foram observados efeitos residuais que a ingestão da dieta inoculada promoveu, mesmo não ocorrendo mortalidade. A mudança de ínstar foi afetada, assim como o baixo consumo de dieta, comparado com os demais. Além disso, várias apresentaram comportamento letárgico.

Tabela 4. CL_{50} de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* cepa HD-1 (S1450), resultante da multiplicação após 48h em biofábrica *On Farm*, em três taxas de aeração, contra *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae).

Amostra de Bt (Biofábrica)	48h	CL_{50}	Intervalo de Confiança
0,2 vvm	$5,75 \times 10^7$	$7,06 \times 10^4$ a	$4,61 \times 10^4$ - $9,51 \times 10^4$
0,5 vvm	$2,29 \times 10^8$	$1,25 \times 10^4$ b	$4,75 \times 10^3$ - $2,03 \times 10^4$
0,8 vvm	$2,82 \times 10^8$	$8,19 \times 10^3$ b	$4,62 \times 10^3$ - $1,17 \times 10^4$
Controle (Produto comercial)	$5,00 \times 10^8$	$3,79 \times 10^3$ c	$3,66 \times 10^3$ - $4,29 \times 10^3$

*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pela sobreposição do Intervalo de Confiança na análise de Probit.

5 DISCUSSÃO

Os resultados da concentração de esporos viáveis de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* cepa HD-1, obtida para as três taxas de aeração avaliadas neste trabalho (0,2; 0,5 e 0,8 vvm), mostraram diferença significativa no crescimento após 24 horas de multiplicação em biofábrica *On Farm*. O sistema com 0,2 vvm se mostrou inferior aos demais, para esse tempo. Enquanto 0,5 e 0,8 vvm apresentaram resultados similares, nos dois tempos analisados (24 e 48h). Na análise por microscopia de 24h, foram encontradas células de Bt com a presença de endósporos e cristais em 0,2 vvm, entretanto, para as demais, já havia ocorrido a liberação de grande parte dessas estruturas (lise celular). Estudos anteriores também observaram efeitos similares da aeração na esporulação de *B. thuringiensis*, foi encontrado que Bt se desenvolve e esporula melhor sob altas taxas de aeração (Foda et al.,1985; Avignone-Rossa; Arcas; Mignone, 1992; Boniolo et al., 2012; Mounsef et al., 2015). No entanto, para as biofábricas *On Farm* em 48h de multiplicação, não se observou diferença estatística entre os tratamentos. Nesse caso, 0,5 e 0,8 vvm podem ser considerados como melhores resultados, uma vez que a finalização do processo em menor tempo reduz significativamente o custo energético de funcionamento do sistema e o possível aparecimento de microrganismos indesejados, sabendo-se que após a esporulação de Bt, não há competição.

Quanto à presença de microrganismos indesejados detectados em algumas das amostras das biofábricas mostradas anteriormente, apesar de crescerem nos meios de cultura Ágar Verde-Brilhante (AVB) e Ágar Bile Cristal-Violeta Vermelho (CVV), não se tratam daqueles descritos na Portaria (Brasil, 2023). As características morfológicas das colônias no AVB foram diferentes daquelas especificadas pelo fabricante, para as espécies a que se destinam (himedialabs.com). No meio CVV, a cor das colônias foi similar ao descrito nas suas referências (merckmillipore.com), contudo, não apresentou formação de halos nem de precipitados de bile, característicos de *E. coli*. Devido à limitação na seletividade desses meios, amostras de cada colônia foram enviadas para análise por sequenciamento de DNA (16S rRNA) para investigação. Os resultados confirmaram se tratar de bactérias das espécies: *Enterobacter hormaechei* (Enterobacteriaceae), essa família de bactérias apresenta uma variedade de cepas, que podem ser simbióticas presentes no intestino de mosca-doméstica (Zhang et al., 2021), no rúmen de vacas (Zhong et al., 2023) e outras,

podem ainda colonizar os tecidos internos das plantas (Tshishonga; Serepa-Dlamini, 2019), e *Ralstonia pickettii* (Burkholderiaceae), que de acordo com trabalhos anteriores, pode ser associada a infecções hospitalares em pacientes imunocomprometidos, por via de materiais usados nos tratamentos, e a infecções por outros microrganismos (Moreira et al., 2005; Ryan; Pembroke; Adley, 2006). No geral, não apresentam riscos à saúde humana em outros ambientes, ao apresentar baixa virulência. Outros estudos também identificaram alto potencial biotecnológico para a biorremediação, pela degradação de substâncias tóxicas como tolueno e tricloroetileno, por essa bactéria (Ryan; Pembroke; Adley, 2007). Há, nesse caso, limitação para o uso dessa metodologia de análise nas amostras provenientes de multiplicações em biofábricas *On Farm*. Outros testes seriam necessários para a confirmação, como os bioquímicos (coloração diferencial, fermentação de carboidratos, produção de indol e H_2S, atividade de urease e gás) e sorológicos (importância médica). Goo, Ching e Gooch (1973) observaram que AVB não apresenta seletividade apenas para *Salmonella* spp., Ávila e Gallo (1996) também identificaram baixa seletividade nesse meio, em suas análises, houve o crescimento de bactérias não pertencentes ao gênero *Salmonella*. O meio CVV também não apresenta estrita seletividade (Ramos e Nascimento, 2020), também apontado em suas recomendações (Corry, 2003).

O bioensaio demonstrou que as taxas de mortalidade de *S. frugiperda* encontradas para os tratamentos, utilizando as amostras de Bt produzidas em biofábrica *On Farm* com 48h de multiplicação, e a do produto comercial usado como controle, diferiram significativamente, o produto comercial apresentou menor CL_{50} ($3{,}79 \times 10^3$), 0,5 ($1{,}25 \times 10^4$) e 0,8 ($8{,}19 \times 10^3$) vvm não apresentaram diferença entre si, e 0,2 ($7{,}06 \times 10^4$) vvm resultou em maior dose necessária. Isso sugere que o escalonamento de Bt nesse tipo de sistema é possível e que apresenta eficácia, em maiores doses, contra *S. frugiperda*. Além disso, fornece evidências para a relação positiva que maiores níveis de aeração têm sobre a multiplicação de *B. thuringiensis* var *kurstaki* cepa HD1 em biofábrica *On Farm*, relacionando-se a concentração de esporos viáveis e os cristais proteicos produzidos.

As descobertas feitas nesse estudo contrapõem as informações apresentadas em trabalhos como o de Faria et al. (2023), que consideram a produção *On Farm* paradoxal. Confirmando os relatos de que alguns biopesticidas microbianos são

eficazes, apesar de terem sido produzidos em condições não estéreis, e ainda que em maiores doses. É importante considerar o limite de contaminantes definidos pela legislação para os produtos comerciais como o mínimo a ser seguido nesse tipo de multiplicação de insumos biológicos. Microrganismos indesejados podem advir da água utilizada para o crescimento, do ar do ambiente, das embalagens dos insumos, dos EPIs e de insetos, como moscas, por exemplo. Para a produção desses bioinsumos, é vital serem adotadas estratégias para reduzir ao máximo a possível entrada de contaminações, principalmente no início do processo.

Poucos estudos tratam da multiplicação *On Farm* no Brasil, aqueles que o fazem normalmente focam seus esforços na avaliação de contaminações nesse sistema (Bocatti et al., 2022; Santos; Dinnas; Feitosa, 2020), não no processo como aqui descrito, e sem aprofundamentos. Como apontado por Bocatti (2022), a multiplicação de microrganismos deve assegurar vários procedimentos microbiológicos mínimos para garantir que o microrganismo alvo prevaleça no meio de cultura e que essas preparações não carreguem consigo contaminações de importância à saúde pública e ambiental. A implantação dos equipamentos utilizados nesse trabalho, em fazendas, demanda de alto investimento em comparação com sistemas de produção feitos de maneira rústica, geralmente em caixas d'água. Infraestrutura adequada, investimentos em insumos para cada produção, equipe técnica treinada e controle de qualidade, figuram entre as principais exigências. Isso, pode restringir esse tipo de produção a médios e grandes empreendimentos rurais. No entanto, quando comparados a sistemas industriais, em biorreatores, resulta em economia para os agricultores, sabendo que há um ganho de volume do multiplicado microbiano de 99%, como mostrado no presente trabalho.

6 CONCLUSÃO

Foi encontrado que, utilizando 0,5 e 0,8 vvm após 24 horas de multiplicação, as produções de esporos e cristais foram significativamente maiores que em 0,2 vvm. Quanto à dose letal, houve diferença entre todos os tratamentos, e o produto comercial resultou em menor CL_{50}, seguido de 0,8 e 0,5 vvm, que não diferiram entre si, e 0,2 vvm apresentando o resultado menos satisfatório. Os meios de cultura empregados no controle de qualidade não foram seletivos para as espécies de bactérias encontradas.

A produção *On Farm* em biofábricas automatizadas, demanda de infraestrutura adequada, investimentos em insumos para cada produção, equipe técnica treinada, cuidados sanitários durante o processo e rigoroso controle de qualidade do que é multiplicado.

Esses resultados implicam diretamente na produção de Bt em biofábricas *On Farm,* evidenciando ser possível a multiplicação dessa bactéria no sistema adotado e conseguir eficiência, ainda que em maiores doses, sobre *S. frugiperda,* gerando embasamento para estudos futuros com esse e outros microrganismos. Este é o primeiro estudo, com foco em realizar e descrever esse processo de produção em sua totalidade, com aplicação prática.

REFERÊNCIAS

Alves, L. F. A.; Alves, S. B.; Lopes, R. B.; Augusto, N. T. **Estabilidade de uma formulação de Bacillus sphaericus armazenada sob diferentes temperaturas.** Scientia Agricola, 58(1), 21–26. (2001). Disponível em: https://doi.org/10.1590/S0103-90162001000100004. Acesso em: set. de 2024.

Amaral, D. F. S. **Produção on farm de insumos biológicos no Brasil: Benefícios, Riscos e Tendências**. Trabalho de conclusão de curso. (Graduação em Agronomia). Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2022. Acesso em: set. de 2024.

Aronson, A. **Sporulation and delta-endotoxin synthesis by Bacillus thuringiensis**. Cell Mol Life Sci. 2002 Mar; 59(3): 417–25. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s00018-002-8434-6 . Acesso em: set. de 2024.

Avignone-Rossa, C.; Arcas, J.; Mignone, C. **Bacillus thuringiensis growth, sporulation and δ-endotoxin production in oxygen limited and non-limited cultures**. World J Microbiol Biotechnol 8, 301–304,1992. Disponível em: https://doi.org/10.1007/BF01201884. Acesso em: set. de 2024.

Ávila, C. R. de.; Gallo, C. R.. **Pesquisa de Salmonella spp. em leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo "minas frescal" comercializados no município de Piracicaba- SP**. Scientia Agricola, 53(1), 159–163, 1996. Disponível em: https://doi.org/10.1590/S0103-90161996000100023. Acesso em: set. de 2024.

Baum, J. A.; Malvar, T. **Regulation of insecticidal crystal protein production in Bacillus thuringiensis.** Molecular Microbiology, 18(1), 1–12, 1995. Disponível em: https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.mmi_18010001.x. Acesso em: set. de 2024.

Bettiol, W.; Morandi, M.A.B.; Pinto, Z.V.; Lucon, C. M. M. **Comunicado técnico: Controle de qualidade e conformidade de produtos e fermentados à base de *Bacillus* spp.: Proposta metodológica**. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna–SP, 2022. Disponível em: https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1146275 . Acesso em: set. de 2024.

Boniolo, F. S.; Rodrigues, R. C.; Prata, A. M.; López, M. L.; Jacinto, T.; da Silveira, M. M.; Berbert-Molina, M. A. **Oxygen supply in Bacillus thuringiensis fermentations: bringing new insights on their impact on sporulation and δ-endotoxin production.** Applied microbiology and biotechnology, 94(3), 625–636, 2012. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s00253-011-3746-9. Acesso em: set. de 2024.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **AGROFIT: sistema de agrotóxicos fitossanitários**. Brasília–DF, 2024. Disponível em: https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: set. de 2024.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **PORTARIA CONJUNTA SDA/MAPA - IBAMA - ANVISA n.º 1, DE 10 DE ABRIL DE 2023. Estabelece procedimentos a serem adotados para o registro de produtos microbiológicos.** Diário Oficial da União: Brasília–DF, seção 1, pág. 07, maio de 2023. Disponível em: https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-conjunta-sda/mapa-ibama-anvisa-n-1-de-10-de-abril-de-2023-480871674. Acesso em: set. de 2024.

BRASIL. **DECRETO Nº 10.375, DE 26 DE MAIO DE 2020.** Brasília, 2020. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2020/decreto/d10375.htm. Acesso em: set. de 2024.

BRASIL. **DECRETO Nº 6.913, DE 23 DE JULHO DE 2009**. Brasília,2009. Disponível em:https://www.gov.br/agricultura/ptbr/assuntos/sustentabilidade/organicos/legislacao/portugues/decreto-no-06-913-de-23-de-julho-de-2009.pdf. Acesso em: set. de 2024.

Brighenti, D. M.; Carvalho, C.F.; Carvalho, G.A.; Brighenti, C. R. G. **Eficiência do Bacillus thuringiensis var. kurstaki (Berliner, 1915) no controle da traça da cera Galleria mellonella (Linnaeus, 1758)** (Lepidoptera: Pyralidae). Ciência e Agrotecnologia, 29(1), 60–68, 2005. Disponível em: https://doi.org/10.1590/S1413-70542005000100007. Acesso em: set. de 2024.

Capalbo, D. M. F.; Vilas-Bôas, G.T.; Arantes, O. M. N. **Bacillus thuringiensis: formulações e plantas transgênicas** . EMBRAPA, 2004. Disponível em: https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/124940/1/2005AP-043.pdf. Acesso em: set. de 2024.

Casmuz, A.; Juárez, M. L.; Socías, M. G.; Murúa, M. G.; Prieto, S.; Medina, S.; Willink, E.; Gastaminza, G. **Revisión de los hospederos del gusano cogollero del maíz, Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae).** Revista de la Sociedad Entomológica Argentina, 69(3–4), 209–231, 2010. Acesso em: set. de 2024.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Boletim Safra de Grãos**. Brasília–DF, 2024. Acesso em: 11 de agosto de 2024. Disponível em: https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos. Acesso em: set. de 2024.

Corry, J.E.L. et al.**Violet Red Bile (VRB) Agar** (SYN. VIOLET RED BILE LACTOSE AGAR). In: Progress In Industrial Microbiology. [S. l.]: Elsevier, 2003. v. 37, p. 629–631. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079635203801042. Acesso em: 3 set. 2024.

CropLife Brasil. **Cresce a adoção de produtos biológicos pelos agricultores brasileiros** -. [S. l.], 2024. Acesso em: 14 set. 2024. Disponível em: https://croplifebrasil.org/noticias/mercado-de-bioinsumos-cresceu-15-na-safra-2023-2024. Acesso em: set. de 2024.

Day,R.; Abrahams, P.; Bateman, M.; Beale, T.; Clottey,V.; Cock, M.; Colmenarez,Y.; Corniani, N.; Early, R.; Godwin, J.; Gomez, J.; Moreno, P.J.; Murphy, S.T.; Mensah,

B.O.; Phiri, N.; Pratt, C.; Silvestri, S.; Witt, A. **Fall armyworm: impacts and implications for Africa.** Outlooks Pest Manag 28:196–201, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.1564/v28_oct_02. Acesso em: set. de 2024.

EMBRAPA. **Bioinsumos: Tendência de crescimento no Brasil**. 2023. Disponível em: https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/85620702/bioinsumos-tendencia-de-crescimento-no-brasil. Acesso em: set. de 2024.

Faria, M.; Mascarin, G.M.; Butt, T. et al.**On-farm Production of Microbial Entomopathogens for use in Agriculture: Brazil as a Case Study**. Neotrop Entomol 52, 122–133, 2023. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s13744-023-01033-5. Acesso em: set. de 2024.

Finney, D. **Probit Analysis.** Cambridge: Cambridge University Press, 1971. Acesso em: set. de 2024.

Goo, V.; Ching, G.; Gooch, J. **Comparison of brilliant green agar and Hektoen enteric agar media in the isolation of salmonellae from food products.** Applied microbiology, 26 3, 288-92, 1973. Disponível em: https://doi.org/10.1128/AEM.26.3.288-292.1973. Acesso em: set. de 2024.

IBAMA. **Perfil Ambiental de Bacillus thuringiensis, var. kurstaki, cepa HD-1 (S1450)* (CCT 1306)***. 2019. Brasília. Disponível em: https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/arquivos/perfis-ambientais/2019/Perfil%20Ambiental%20Bacillus%20thuringiensis_02_10_2019.pdf. Acesso em 10 de setembro de 2024.

Lambert, B.; Peferoen, M. **Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis***. Bioscience 42: 112-122, 1992. Acesso em: set. de 2024.

Li, J.; Zou, C.; Xu, J.; Ji, X.; Niu, X.; Yang, J.; Zhang, K. Q. **Molecular mechanisms of nematode-nematophagous microbe interactions: basis for biological control of plant-parasitic nematodes**. Annual review of phytopathology, 53, 67-95, 2015. **Em**: Anchieta de Melo, T., Nascimento, I., Serra, I. **O gênero Bacillus aplicado ao controle biológico de doenças de plantas.** *Research Society and Development*, *10*, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.33448/rsd-v10i9.17817. Acesso em: set. de 2024.

Martinelli, S.; Barata, R.; Zucchi, M.; Silva-Filho, M.; Omoto, C. **Molecular variability of Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) populations associated to maize and cotton crops in Brazil**. Journal of economic entomology, 99 2, 519-26, 2006. Disponível em: https://doi.org/10.1093/jee/99.2.519. Acesso em: set. de 2024.

Mascarin, G. M.; Lopes, R. B.; Delalibera, Í.; Fernandes, É. K. K.; Luz, C.; Faria, M. **Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil**. *Journal of Invertebrate Pathology*, *165*, 46–53, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.01.001. Acesso em set. de 2024.

Moazami, N. **Biological Control.** Comprehensive Biotechnology, 731–739, 2011. Disponível em: https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00235-X. Acesso em: set de 2024.

Monnerat, R.; Montalvão, S.C.L; Martins, E.S; Queiroz, P.R.M; Silva, E.Y.Y; Garcia, A.R.M; Castro, M.T; Rocha, G.T; Ferreira, A.D.C.L; Gomes, A.C.M.M. **Manual de produção e controle de qualidade de produtos biológicos à base de bactérias do gênero Bacillus para uso na agricultura**. Documentos 369. EMBRAPA, Brasília, p 46, 2020. Disponível em: http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1122563. Acesso em: set. de 2024.

Monnerat, R. G.; Silva, S. F.; Silva-Werneck, J.**Catálogo do banco de germoplasma de bactérias entomopatogênicas do gênero Bacillus**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 65 p, 2001. Acesso em: set. de 2024.

Moreira, B.; Leobons, M.; Pellegrino, F.; Santos, M.; Teixeira, L.; Marques, E.; Sampaio, J.; Pessoa-Silva, C. **Ralstonia pickettii and Burkholderia cepacia complex bloodstream infections related to infusion of contaminated water for injection**. The Journal of hospital infection, 60 1, 51-5. 2005. Disponível em: https://doi.org/10.1016/J.JHIN.2004.09.036. Acesso em: set. de 2024.

Moscardi, F. **Assessment of the application of Baculovirus for control of Lepidoptera.** Annu. Rev. Entomol. 44: 257-89, 1999. **In**: Valicente, F. H.; Barreto, M. R. **Bacillus thuringiensis survey in Brazil: geographical distribution and insecticidal activity against Spodoptera frugiperda (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)**. Neotropical Entomology, 32(4), 639–644, 2003. Disponível em: https://doi.org/10.1590/S1519-566X2003000400014. Acesso em: set. de 2024.

Mounsef, J. R.; Salameh, D.; Louka, N.; Brandam, C.; Lteif, R. **The effect of aeration conditions, characterized by the volumetric mass transfer coefficient K(L)a, on the fermentation kinetics of Bacillus thuringiensis kurstaki.** Journal of biotechnology, 210, 100–106, 2015. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.06.387. Acesso em: set. de 2024.

Ndao, A.; Sellamuthu, B.; Gnepe, J. R.; Tyagi, R. D.; Valero, J. R. **Pilot-scale biopesticide production by Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki using starch industry wastewater as raw material.** Journal of Environmental Science and Health, Part B, 52(9), 623–630, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.1080/03601234.2017.1330071. Acesso em: 22 de ago. 2024.

Oliveira, I. R. de; Mendes, S. M.; Viana, P. A.; de Resende, Á. V.; Alvarenga, R. C.; Borghi, E. **Manejo de lagarta-do-cartucho em sistemas de produção integrados com braquiária**. Comunicado Técnico 260, Embrapa, Sete Lagoas, MG, 27p. 2023. Disponível em: https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/doc/1159228/1/Manejo-de-lagarta-do-cartucho-em-sistemas-de-producao-integrados.pdf. Acesso em 3 de set. 2024.

Ramos, G.L.P.A; Nascimento, J. S. **Avaliação da especificidade do ágar Violeta Vermelho Bile Glicose para o isolamento de Enterobacteriaceae em leite de cabra cru.** Vigilância Sanitária em Debate, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 91–96, 2020.

Disponível em: https://visaemdebate.incqs.fiocruz.br/index.php/visaemdebate/article/view/1340. Acesso em: 3 set. 2024.

Raymond, B.; Lijek, R.S.; Griffiths, R.I.; Bonsall, M.B. **Ecological consequences of ingestion of Bacillus cereus on Bacillus thuringiensis infections and on the gut flora of a lepidopteran host.** Journal of Invertebrate Pathology. 2008 Sep;99(1):103-111. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.04.007. Acesso em: set. de 2024.

Raymond, B.; Johnston, P.R.; Nielsen-LeRoux, C.; Lereclus, D.; Crickmore, N. **Bacillus thuringiensis: an impotent pathogen?**Trends in Microbiology, [*s. l.*], v. 18, n. 5, p. 189–194, 2010. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.tim.2010.02.006. Acesso em: set. de 2024.

Ryan, M.; Pembroke, J.; Adley, C. **Ralstonia pickettii: a persistent gram-negative nosocomial infectious organism.** The Journal of hospital infection, 62 3, 278-84. 2006. Disponível em: https://doi.org/10.1016/J.JHIN.2005.08.015. Acesso em: set. de 2024.

Ryan, M.; Pembroke, J.; Adley, C. **Ralstonia pickettii in environmental biotechnology: potential and applications.** Journal of Applied Microbiology, 103. 2007. Disponível em: https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03361.x. Acesso em: set de 2024.

Santos, A.F. J; Dinnas, S.S.E; Feitoza, A.F.A .**Microbiological quality of bioproducts multiplied on farm in the São Francisco valley: preliminary data.** Enc Biotr 17:429–443, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.18677/EnciBio_2020D33. Acesso em: set. de 2024.

Schmidt, F. G. V.; Monnerat, R. G.; Borges, M.; Carvalho, R. Da S. **Metodologia de criação de insetos para avaliação de agentes entomopatogênicos** (2001). 20p. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, (EMBRAPA-CENARGEN, Circular Técnica, 11). Acesso em: set. de 2024.

Silva, S. M. B.; Silva-Werneck, J. O.; Falcão, R.; Gomes, A. C.; Fragoso, R. R.; Quezado, M. T.; Neto, O. B. O.; Aguiar, J. B.; De Sá, M. F. G.; Bravo, A.; Monnerat, R. G. **Characterization of novel Brazilian Bacillus thuringiensis strains active against Spodoptera frugiperda and other insect pests.** Journal of Applied Entomology. 128(2),102–107, 2004. Disponível em: https://doi.org/10.1046/j.1439-0418.2003.00812.x. Acesso em set. de 2024.

Souza, F. P.; Castilho, T. P. R.; Macedo, L. O. B. **Um marco institucional para os bioinsumos na agricultura brasileira baseado na economia ecológica**. Sustain Debate Brasília, v. 13, n. 1, p. 266-285, 2022. Acesso em: set. de 2024.

Tshishonga, K.; Serepa-Dlamini, M. H. **Draft Genome Sequence of Enterobacter hormaechei Strain MHSD6, a Plant Endophyte Isolated from Medicinal Plant Pellaea Calomelanos**. Microbiology resource announcements, 8(48), e01251-19. 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1128/MRA.01251-19. Acesso em: 10 de set. de 2024.

Valicente, F. H.; Barreto, M. R. ***Bacillus thuringiensis*** **survey in Brazil: geographical distribution and insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda*** (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Neotropical Entomology, 32(4), 639–644, 2003. Disponível em: https://doi.org/10.1590/S1519-566X2003000400014. Acesso em: set. de 2024.

Zhang, Q.; Wang, S.; Zhang, X.; Zhang, K.; Liu, W.; Zhang, R.; Zhang, Z. ***Enterobacter hormaechei*** **in the intestines of housefly larvae promotes host growth by inhibiting harmful intestinal bacteria.** Parasites & vectors, 14(1), 598, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1186/s13071-021-05053-1. Acesso em 10 de set. 2024.

Zhong, H.; Zheng, N.; Wang, J.; Zhao, S. **Isolation and pan-genome analysis of Enterobacter hormaechei Z129, a ureolytic bacterium, from the rumen of dairy cow.** Frontiers in microbiology, 14, 1169973. 2023. Disponível em: https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1169973. Acesso em: 10 de set.