

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

SAIHONARA PEREIRA

**MONITORAMENTO DA QUALIDADE DE BIOINSUMOS PRODUZIDOS EM
SISTEMA *ONFARM***

PONTA GROSSA

2022

SAIHONARAPEREIRA

**MONITORAMENTO DA QUALIDADE DE BIOINSUMOS PRODUZIDOS EM
SISTEMA *ONFARM***

Quality monitoring of bioinputs produced in the *onfarm* system

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador: Prof. Dr. Ivo Mottin Demiate

Coorientadora: Prof. Dra. Sabrina Ávila Rodrigues.

PONTA GROSSA

2022



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es). Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



SAIHONARA PEREIRA

MONITORAMENTO DA QUALIDADE DE BIOINSUMOS PRODUZIDOS EM SISTEMA ONFARM

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestra Em Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Biotecnologia.

Data de aprovação: 09 de Agosto de 2022

Dr. Ivo Mottin Demiate, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Juliana Vitoria Messias Bittencourt, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dr. Luiz Gustavo Lacerda, Doutorado - Universidade Estadual de Ponta Grossa (Uepg)

Dra. Sabrina Avila Rodrigues, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 25/10/2022.

Dedico este trabalho a meu Pai, que sempre me
incentivou e motivou.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente sou grata a Deus pelo dom da vida e pelo amor que tem por mim, sem Ele jamais conseguiria nada. Agradeço aos meus pais por tudo o que fizeram e fazem por mim e por sempre ter me incentivado na educação. Em especial ao meu Pai que já não está entre nós e ficaria imensamente feliz com mais uma conquista minha.

Agradeço ao meu marido, meu companheiro que sempre me apoia e me incentiva e me encoraja.

Agradeço a professora Sabrina Ávila Rodrigues por acreditar em mim no desenvolvimento deste trabalho e sempre estar me orientando.

Agradeço aos professores Ivo Mottin e Luciano Fernandes pelo incentivo e apoio no desenvolvimento deste trabalho, e ao professor Eduardo Bittencourt Sydney por disponibilizar o laboratório tornando possível a realização da pesquisa.

Agradeço aos companheiros de laboratório e colegas do mestrado em Biotecnologia, pelo auxílio, conversas e momentos de convívio, especialmente no Laboratório de Fermentações.

Enfim agradeço a todos que já passaram por minha vida e me passaram algum ensinamento e motivação, cada pessoa teve e tem um papel importante na minha jornada.

“Posso todas as coisas em Cristo que me
fortalece”.

Filipenses 4:13

RESUMO

A necessidade de proteger as culturas agrícolas das pragas resistentes e de combater vetores de doenças endêmicas fez com que ocorresse o uso indiscriminado de agrotóxicos no Brasil. Tal uso de agrotóxicos gerou preocupação sobre a saúde e meio ambiente e desencadeou o surgimento de inovações no controle biológico de pragas, como a produção *onfarm* de bioinsumos em propriedades agrícolas. Neste trabalho foi realizado um estudo sobre o controle de qualidade de bioinsumos de uma empresa de produção *onfarm*, analisando a concentração mínima de células de cada microrganismo e discutindo sobre a contaminação cruzada de um lote específico. A partir das análises microbiológicas e análise das contaminações o enfoque do trabalho se voltou para a otimização do processo fermentativo da *Chromobacterium subtsugae*. A maioria dos bioinsumos analisados tinham a concentração mínima de células ideal para ser aplicada no campo pelos produtores. A contaminação do lote 13 que foi escolhido aleatoriamente foi uma contaminação cruzada entre os próprios microrganismos produzidos na empresa *onfarm* e não teve ocorrência de contaminações externas ou contaminações patogênicas. Na otimização do processo fermentativo da *C.subtsugae* as variáveis testadas foram: a temperatura, NaCl e glicose; a temperatura e o NaCl foram as variáveis que tiveram mais influência na otimização do processo fermentativo da *C.subtsugae*, sendo interessante em trabalhos futuros fazer mais análises com essas variáveis.

Palavras-chave: bioinsumos; produção '*onfarm*'; *Chromobacterium subtsugae*.

ABSTRACT

The need to protect agricultural crops from pesticides and end-combat diseases has led to the indiscriminate use of pesticides in Brazil. Such an environment generated and triggering of pesticide health use and innovation of non-biological pest environment, such as *onfarm* production on agricultural properties. In this work, a study was carried out on the quality control of bioinfection of a production company on the concentration of cells of each one and discussing a study of analysis of a specific study of a lot and specific cells. From the various microbiological contaminations and the focus of the fermentation work turned to the optimization of the analysis process of *Chromobacterium subtsugae*.¹³ that was chosen randomly for a cross temperature between the individuals and non-fermented processes in the *onfarm* company, having occurred contamination or external pathogenic contamination. temperature and NaCl were variables as variables that had more influence on the optimization of the fermentation process of *C.subtsugae*, being interesting in future works to do more analysis with these variables.

Keywords: bioinputs; '*onfarm*' production; *Chromobacterium subtsugae*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Organograma das etapas experimentais do presente trabalho.....	32
Figura 2 - Campo de leitura de uma câmara de Neubauer	36
Figura 3 - a) <i>C. subtsugae</i> isolada; b) Parte 1 isolada contendo <i>B. amyloliquefaciens</i> , c) Parte 2 isolada contendo <i>B. bassiana</i>	61
Figura 4 -a) Trichoderma isolado em duas partes, b) Parte 1 isolada contendo <i>C. subtsugae</i> ou <i>Azospirillum ssp</i> , c) Parte 2 isolada contendo <i>B. megaterium</i> e Trichoderma.	63
Figura 5 - a) <i>A. brasiliense</i> isolado em 2 partes , b) Parte 1 isolada contendo <i>B. amyloliquefaciens</i> , c) Parte 2 isolada contendo <i>B. amyloliquefaciens</i> e o Tricoderma.	63
Figura 6 -a) Bactéria <i>B. amyloliquefaciens</i> isolada em três partes, b) Primeira parte isolada contendo <i>B. bassiana</i> , c) Segunda parte isolada contendo <i>B. bassiana</i> e <i>B. amyloliquefaciens</i> , d) Terceira parte isolada contendo o próprio microrganismo <i>B. amyloliquefaciens</i>	64
Figura 7 - a) <i>B. megaterium</i> isolada em duas partes, b) Parte 1 isolada contendo o próprio microrganismo <i>B. megaterium</i> , c) Parte 2 isolada contendo <i>B. amyloliquefaciens</i>	65
Figura 8 - a) <i>B. bassiana</i> isolada em duas partes, b) Parte 1 isolada contendo <i>B. amyloliquefaciens</i> , c) Parte 2 isolada contendo <i>B. megaterium</i>	65
Fotografia 1- Incubadora de agitação orbital	40

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Principais Bactérias entomopatogênicas.....	24
Quadro 2 - Ocorrência e distribuição por lote recebido das espécies de microrganismos	33
Quadro 3 - Composição de espécies de microrganismos do lote 13	37
Quadro 4 - Resumo das contaminações.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Delineamento Composto Central Rotacional para avaliação das variáveis T°C, NaCl e Glicose no processo fermentativo para obtenção de <i>C. subtsugae</i>	40
Tabela 2 - Resultado dos números de Unidades Formadoras de Colônias.....	44
Tabela 3 - Resultado dos números de Unidades Formadoras de Colônias da <i>B.pumilus</i>	45
Tabela 4 - Resultado dos números de Unidades Formadoras de Colônias e de células na câmara de Neubauer de <i>B.subtilis</i>	46
Tabela 5 - Resultado dos números de Unidades Formadoras de Colônias e de células na câmara de Neubauer de <i>B.meggaterium</i>	48
Tabela 6 - Resultado dos números de Unidades Formadoras de Colônias e de células na câmara de Neubauer de <i>B.thurgiensis</i>	51
Tabela 7 - Resultado dos números de Unidades Formadoras de Colônias e de câmara de Neubauer de <i>B. aryabhatai</i>	52
Tabela 8 - Resultado dos números de Unidades Formadoras de Colônias e de células na câmara de Neubauer de <i>P. fluorescens</i>	54
Tabela 9 - Resultado dos números de Unidades Formadoras de Colônias e de células na câmara de Neubauer de <i>S. spinosa</i>	55
Tabela 10 - Resultado dos números de Unidades Formadoras de Colônias e de células na câmara de Neubauer de <i>C.subtsugae</i>	56
Tabela 11 - Resultado dos números de Unidades Formadoras de Colônias e de células na câmara de Neubauer de <i>A.brasiliense</i>	58
Tabela 12 - Resultado dos números de Unidades Formadoras de Colônias e de células na câmara de Neubauer de <i>T. Harzianum</i>	60
Tabela 13 - Resultado dos números de Unidades Formadoras de Colônias e de células na câmara de Neubauer de <i>B. bassiana</i>	62
Tabela 14 - Matriz do DCCR para o resultado de 96 horas da fermentação da <i>C.subtsugae</i>	71
Tabela 15 - Efeitos e interações calculadas para as variáveis de <i>C.subtsugae</i> em UFC	72
Tabela 16 - Análise da variância para as variáveis da <i>C.subtsugae</i> em UFC	73
Tabela 17 - Efeitos e interações calculadas para as variáveis de <i>C.subtsugae</i> em D.O.....	76
Tabela 18 - Análise da variância para as variáveis da <i>C.subtsugae</i> em D.O.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
D.O	Densidade ótica
LB	Lúria Bertani
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
YPD	<i>Yeast extract, Peptone ,Dextrose</i>
EPA	<i>Environmental protection agency</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MIP	Manejo integrado de pragas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	OBJETIVOS.....	18
2.1	Objetivo geral.....	18
2.1.1	Objetivo específicos.....	18
3	REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
3.1	Bioinsumos e agrotóxicos.....	19
3.2	Biopesticidas.....	23
3.3	Gênero <i>Chromobacterium</i>.....	25
3.3.1	Processo de produção de biológicos onfarm versus comercial.....	27
3.3.2	Fatores limitantes do processo de produção.....	30
4	METODOLOGIA.....	32
4.1	Local.....	32
4.2	Delineamento experimental.....	32
4.3	Avaliação microbiológica.....	33
4.3.2	Preparo do meio do Cultura.....	34
4.3.3	Determinação do número de bactérias.....	34
<u>4.3.3.1</u>	<u>Contagem em Placas.....</u>	<u>35</u>
4.3.5	Contagem na Câmara de Neubauer.....	35
4.4	Análise das contaminações.....	37
4.5	Produção da <i>C.subtsugae</i>.....	39
4.5.1	Preparo do Inóculo.....	40
4.5.2	Determinação do número de bactérias.....	41
4.5.3	Densidade óptica.....	41
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	43
5.1	Avaliação microbiológica do controle de qualidade das amostras....	43
5.1.1	Controle de qualidade das bactérias do gênero Bacillus.....	43
5.1.2	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	43
5.1.3	<i>Bacillus pumilus</i>	45
5.1.4	<i>Bacillus subtilis</i>	46
5.1.5	<i>Bacillus megaterium</i>	48
5.1.6	<i>Bacillus thuringiensis</i>	49

5.1.7 <i>Bacillus aryabhatai</i>	51
5.2 Bionseticidas e inoculantes que não são do gênero bacillus.....	52
5.2.1 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	53
5.2.2 <i>Saccharopolyspora spinosa</i>	54
5.2.3 <i>Chromobacterium subtsugae</i>	56
5.2.4 <i>Azospirillum brasiliense</i>	58
5.3 Biofungecidas.....	59
5.3.1 <i>Trichoderma harzianum</i>	59
5.3.2 <i>Beauveria bassiana</i>	62
6 ANÁLISE DAS CONTAMINAÇÕES	72
7 Otimização do processo fermentativo da <i>C.subtsugae</i>.....	75
7.1 Resultados estatísticos para as variáveis da fermentação da <i>C. subtsugae</i> em 96 horas em UFC.....	76
7.1.1 Análise do modelo e gráfico de Pareto.....	76
7.2 Resultados estatísticos para as variáveis da fermentação da <i>C. subtsugae</i> em 96 horas em D.O.....	77
7.2.1 Análise do modelo e gráfico de Pareto.....	79
8 CONCLUSÃO.....	81
REFERÊNCIAS.....	82

1 INTRODUÇÃO

Segundo Arthurs *et al.* (2019) controle microbiológico de insetos vem ganhando mercado, em todo mundo, nos últimos anos. Prática utilizada desde meados do século XX, o interesse pelo uso de produtos biológicos é consequência de vários fatores, entre os quais podem ser apontados: a crescente resistência dos insetos-praga aos agrotóxicos, os custos da aplicação dos produtos químicos, os impactos negativos que esses produtos têm sobre o meio ambiente e os trabalhadores rurais.

Uma alternativa sustentável de controle microbiológico de insetos que cada vez mais vem crescendo no mercado brasileiro é o uso e a produção de bioinsumos, e os bioinsumos são descritos segundo o MAPA como:

“Produto, processo ou 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 envolvam AMC que interfira positivamente no crescimento, no desenvolvimento e no mecanismo de defesa de animais, de plantas, de microrganismos e de substâncias derivadas, e que interaja com os produtos e os processos físico-químicos e biológicos, inclusive no controle de uma população ou de atividades biológicas de um outro organismo considerado nocivo”(MAPA,2021).

Os bioinsumos são produzidos tanto em escala industrial e também através da produção *onfarm* que se define segundo o MAPA como:

“Atividades realizadas pelos produtores rurais relacionadas à multiplicação de isolado, linhagem, cepa ou estirpe de AMC, ou à multiplicação de bioinsumo pré-fermentado, a partir de processo de fermentação em biofábricas instaladas em seus estabelecimentos rurais, visando a produção de biofermentados para uso próprio exclusivamente em seus estabelecimentos rurais”(MAPA,2021).

Muitos produtores rurais estão adotando esse sistema *onfarm* em suas propriedades, pois a principal vantagem desse processo é a redução de custos e o uso em maiores quantidades (MEYER *et al.*, 2022).

No processo de produção *onfarm*, apesar de ter ocorrido melhorias nos sistemas de produção, ainda é um problema a presença de contaminantes, seja por falta de equipamentos adequados, matéria prima com pouca qualidade ou da carência de profissionais especializados (MEYER *et al.*, 2022).

Neste trabalho foi realizado um monitoramento da qualidade de bioinsumos

provenientes de uma empresa *onfarm* dos Campos Gerais. Onde diversas espécies de microrganismos foram analisadas, mas o enfoque no processo fermentativo foi da bactéria *Chromobacterium subtsugae*.

C. subtsugae é uma bactéria gram-negativa que possui mobilidade flagelar e foi registrada em 2007; e sua produção comercial iniciou em 2011 (MARTIN *et al.*, 2007).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral do presente estudo foi monitorar a qualidade de produção *onfarm* dos bioinsumos.

2.1.1 Objetivos específicos

- Verificar a concentração de células através da contagem de células em placas e em câmara de Neubauer de cada bioinsumo proveniente de uma empresa *onfarm* da região dos Campos gerais.
- Avaliar contaminação cruzada de um dos lotes analisados.
- Otimizar o processo fermentativo de *C.subtsugae* quanto temperatura, NaCl e glicose.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Bioninsumos e agrotóxicos

De acordo com Fontes (2020) as pragas exercem um papel economicamente negativo na vida do homem. Por exemplo, alguns insetos atuam como vetores de certas doenças que afetam o homem, enquanto outros estão diretamente envolvidos na destruição de culturas agrícolas, bem como das plantas cujos produtos são armazenáveis; e plantas para alimentação animal.

Ao longo dos anos, vários esforços têm sido realizados para controlar as pragas, incluindo o uso de inseticidas químicos. Entretanto, esses compostos matam uma ampla faixa de organismos incluindo aqueles que são úteis para o homem. Além disso, a longa exposição das pragas a esses inseticidas químicos frequentemente leva à seleção de organismos resistentes. Assim, esses produtos são melhorados ou alternados, com um enorme custo, de forma a superar o desenvolvimento da resistência de pragas (FONTES, 2020).

Segundo Hungria *et al.* (2020) O uso excessivo ou indiscriminado de agrotóxicos e seus impactos negativos estão se tornando cada vez mais causa de preocupação mundial, mostrando a necessidade de desenvolvimento de métodos ambientalmente mais seguros para o controle de pragas. Mesmo os países em desenvolvimento estão conscientes e preocupados com esses impactos e se mostram interessados no desenvolvimento e implantação de programas de manejo integrado de pragas (MIP).

Muitas práticas agrícolas podem ser prejudiciais aos seres humanos e aos ecossistemas circundantes e seus benefícios potenciais devem ser comparados a esses danos. Uma prática agrícola amplamente adotada que é conhecida por ter impactos prejudiciais ao homem e ao meio ambiente é o uso de pesticidas. Embora muitos pesticidas sejam eficazes contra pragas agrícolas e amplamente usados para evitar danos às plantações, os danos às espécies não-alvo e aos humanos podem ser generalizados e graves (NOGUEIRA *et al.*, 2020).

Segundo Nogueira *et al.* (2020) dentre os principais insumos químicos utilizados na agricultura têm-se os agrotóxicos, definidos como qualquer substância ou mistura de substâncias químicas ou biológicas empregados com o objetivo de repelir, destruir ou controlar pragas ou regular o crescimento da planta, podendo ser

classificados segundo a finalidade como inseticidas, fungicidas, rodenticidas e herbicidas, entre outras. No entanto, por possuírem toxicidade intrínseca, são reconhecidos como agentes tóxicos à saúde humana e ambiental.

No Brasil, a utilização dos agrotóxicos teve início na década de 40 e o primeiro agrotóxico introduzido no mercado foi o hexaclorocicloexano – HCH, no ano de 1946, seguidos pelos DDT (Dicloro-Difenil-Tricloroetano), paration e toxafeno. Porém, só foi a partir da década de 1960 que os agrotóxicos foram definitivamente inseridos no cotidiano dos trabalhadores rurais, aumentando assim, os riscos aos quais já estavam expostos (FIGUEIREDO, 2009). Em 1975, com o surgimento do Plano Nacional de Desenvolvimento (PND), que cuidou da abertura do Brasil ao comércio internacional desses produtos surgiu uma verdadeira explosão da utilização de agrotóxicos no trabalho rural. Nos termos do PND, o agricultor era obrigado a comprar tais produtos para fins de obter recursos do crédito rural (FIGUEIREDO, 2009).

Segundo Souza *et al.* (2018) um marco regulatório da Anvisa de 2019, alterou a classificação de toxicidade dos agrotóxicos, adotando o padrão internacional, com cinco divisões, o Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS). Por este novo padrão, são considerados venenos extremamente tóxicos apenas aqueles produtos que causarem morte horas depois do contato ou ingestão pelo indivíduo. Agrotóxicos “pouco tóxicos” não terão mais a advertência de risco no rótulo. Dessa forma, dos agrotóxicos aprovados no início do ano 2019, apenas seis produtos haviam sido classificados como extremamente ou altamente tóxicos.

Em 2017, com cerca de 550 mil toneladas de ingredientes ativos, o Brasil alcançou o título de maior consumidor de agrotóxicos em volume de produto do planeta de acordo com os dados da Comissão de Direitos Humanos e Minorias da Câmara dos Deputados apresentados em audiência de 2019 em Brasília (SOUZA *et al.*, 2018).

Os agrotóxicos devido atuarem sobre processos vitais, possui ação sobre a constituição física e de saúde do ser humano. Os efeitos na saúde podem ser intoxicações agudas, causadas por dano aparente em um período de 24 horas, ou crônicas, quando resultam de uma exposição continuada de produtos agrotóxicos. Podem ocorrer desde simples náuseas, dores de cabeça e irritações na pele até problemas crônicos, como diabetes, malformações congênitas e vários tipos de câncer. Impactos ambientais também são vários, incluindo contaminação da água,

plantas e solo, diminuição no número de organismos vivos e aumento da resistência de pestes (MORIN, 2016).

Os resíduos de agrotóxicos podem afetar a cadeia alimentar e atingir rios, lagos, mares, reservas de mananciais e lençóis freáticos, contaminando o solo e os alimentos. Estudos científicos revelaram resíduos de agrotóxicos na urina, sangue e leite humano (NOGUEIRA *et al.*, 2020).

Segundo Morin (2016) a contaminação humana pode ocorrer por três vias: ocupacional, ambiental e alimentar. A contaminação ocupacional se dá por meio do trabalho, pela manipulação dos agrotóxicos; a ambiental por meio de dispersão/distribuição dos respectivos produtos, ao longo dos diversos componentes do meio ambiente, e a contaminação alimentar decorre da ingestão de produtos contaminados.

Pesquisas pontuam que as intoxicações por agrotóxicos podem provocar outros danos, tais como diminuição das defesas imunológicas, anemia, disfunção sexual, cefaleia, insônia, alterações de pressão arterial, distimias e distúrbios de comportamento (MORIN, 2016).

Outros agravos físicos são mencionados na literatura, tais como diversos tipos de câncer, doenças cardiovasculares, hipertensão, alterações hormonais, entre outras. Quanto aos prejuízos à saúde mental pelos seus efeitos neurotóxicos ao trabalhador rural que utiliza agrotóxicos, emergem os transtornos mentais comuns (MORIN, 2016).

Para Morin (2016) o uso de microrganismos como bioprodutos seletivos tem mostrado alguns sucessos notáveis. Nos dias atuais, várias bactérias, fungos e vírus estão sendo utilizados em produtos comerciais, como resultado dos esforços para se atingir bons processos de produção e formulação.

Segundo a ABCBio (Associação Brasileira das Empresas de Controle Biológico), instituição criada em 2007 para congrega as empresas produtoras e comerciantes de produtos biológicos para controle de pragas, atualmente *Crop Life*, o mercado de bio defensivos no Brasil está estimado em US\$ 95,6 milhões (1% do mercado de agrotóxicos) e a taxa de crescimento anual prevista é de 20%. Em 2021, o mercado deverá ser de US\$ 237,8 milhões (MORIN, 2016).

Comparada à indústria de agrotóxicos convencionais, a indústria de biocontrole está crescendo 5,3 vezes mais rápido. O Brasil está acompanhando a tendência de mercado mundial, inclusive com o apoio governamental, a exemplo de

outros países. Um levantamento internacional destaca que o Brasil é o quarto país com melhor desempenho na produção de bioprodutos, respondendo por 7% da comercialização mundial. Entretanto, o setor biológico é liderado pelos Estados Unidos (37%), Espanha (14%) e Itália (10%) (COSTA *et al.*,2020).

Segundo Costa *et al.* (2020) dentre os fatores que podem explicar o rápido crescimento do mercado de bioprodutos, destacam-se: (1) o custo de desenvolvimento de um produto biológico, estimado em 2 a 10 mil dólares, comparado ao químico com custo estimado em 250 mil dólares, (2) a especificidade dos agentes de controle biológico que atuam apenas no alvo, (3) a sustentabilidade do método por apresentar menor impacto ambiental e aos seres vivos, além de não ser poluente, (4) a seleção de pragas resistentes aos produtos químicos e aos cultivos transgênicos, (5) a baixa probabilidade de seleção de insetos resistentes aos agentes de controle biológico, e (6) a exigência do mercado consumidor, preocupado com os efeitos adversos dos produtos químicos e seus resíduos.

Um outro fato muito importante, e de certa forma decisivo para a expansão do mercado de bio defensivos, foi a mudança de comportamento do agricultor. Esses agricultores começaram a aprofundar os conhecimentos e trocar informações por meio de grupos organizados em redes sociais, formando verdadeiras redes de pesquisa e informação (COSTA *et al.*,2020).

Segundo Costa *et al.* (2020) exemplo dessas iniciativas foi a criação do Grupo Associado de Agricultura Sustentável (GAAS), que de forma nacional e regional tem contribuído para o ganho e troca de informações e experiências entre profissionais de ciências agrárias e biológicas e produtores rurais, auxiliando, assim, a transmitir a importância do manejo racional de pragas e doenças, onde se insere o conceito de controle biológico no país.

Em função desta alta demanda e pela falta de produtos disponíveis no mercado, alguns microrganismos têm sido produzidos nas propriedades, muitas vezes em condições inadequadas, o que pode acarretar em um produto final de baixa qualidade, bem como proporcionar a proliferação de patógenos contaminantes indesejáveis ao meio ambiente, seres humanos e animais (COSTA *et al.*,2020).

Segundo Hungria *et al.* (2020) a produção de bioinsumos requer conhecimento, treinamento, infraestrutura adequada e um controle rígido de qualidade do produto final, garantindo a ação esperada do produto. Os equipamentos básicos para a instalação de uma infraestrutura adequada de produção de bioinsumos são: área de

utilidades, laboratório de controle de qualidade e processo, sala de fermentação, sala de estoque de insumos e sala para armazenamento de produto acabado (MONNERAT *et al.*, 2018).

3.2 Biopesticidas

Os biopesticidas são baseados em bactérias, fungos (incluindo alguns protozoários e leveduras) e vírus de ocorrência natural (Quadro 1). Esses produtos constituem uma parte importante da indústria de biopesticidas. Na verdade, os produtos microbianos são o segmento de produtos de crescimento mais rápido da indústria global de biocontrole (DURÁN *et al.*, 2016).

Tradicionalmente, os biopesticidas microbianos têm sido produzidos por um número limitado de pequenas indústrias que comercializam produtos para controlar artrópodes em mercados especializados (LACEY *et al.*, 2015). No entanto, eles estão cada vez mais sendo adotados por empresas de médio e grande porte e comercializados para uma gama mais ampla de culturas agrícolas.

Bactérias entomopatogênicas são aquelas que causam doenças em insetos, ou seja, que são patogênicas a insetos. Existem várias espécies de bactérias entomopatogênicas (ROYO, 2010). As bactérias podem ser utilizadas contra diversos tipos de culturas, já que existe uma quantidade muito grande de entomopatogênicas. Elas podem combater desde lagartas das grandes culturas como soja, milho e algodão, como matar larvas de besouros como o cascudinho da cama de frango e larvas de mosquitos e borrachudos (ROYO, 2010).

Segundo Fontes (2020) as bactérias entomopatogênicas são divididas em dois grupos: esporulantes e não esporulantes. Entre as esporulantes, existem as aeróbicas, como as pertencentes ao gênero *Bacillus* e similares, e as anaeróbicas, que pertencem ao gênero *Clostridium*.

As bactérias do gênero *Bacillus* e correlatos são as mais utilizadas em controle biológico. Nesses gêneros, estão incluídas as espécies *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis* (Bt), *Paenibacillus popilliae*, *Paenibacillus lentimorbus*, *Paenibacillus larvae*, *Paenibacillus alvei*, *Brevibacillus laterosporus* e *Lysinibacillus phaeicus*. As bactérias não esporulantes incluem os gêneros *Serratia*, *Pseudomonas*, *Streptococcus* e *Xenorhabdus* (FONTES, 2020).

As bactérias do gênero *Bacillus* e correlatos têm ocorrência cosmopolita e são encontradas em todas as partes do mundo, em vários substratos como solo, superfície

de plantas, rizosfera, grãos armazenados, insetos mortos, entre outros. São bactérias Gram-positivas e aeróbicas e podem facultativamente crescer em anaerobiose (FONTES, 2020).

A *B. thuringiensis* é a bactéria mais utilizada em controle biológico de pragas agrícolas e insetos de importância médico-veterinária em todo, que é tóxica para diferentes insetos das ordens Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera, bem como a nematoides (QUEIROZ *et al.*, 2016).

No Brasil, o uso de bioinseticidas comerciais à base de *B. thuringiensis* aumentou a partir da safra 2013/2014, devido aos prejuízos causados por *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) em diversas culturas. Entretanto, o alto custo e escassez de produtos fizeram com que os produtores iniciassem a produção de bioinseticidas na própria propriedade rural, abordagem está conhecida como produção *onfarm* (FONTES, 2020).

Quadro 1 - Principais Bactérias Entomopatogênicas

Espécie	Ordem inseto-alvo	Toxinas
<i>B. thuringiensis</i>	Lepidoptera, Hemiptera e Himenóptera	Cry, Cyt, Vip e Sip
<i>Brevibacillus laterosporus</i>	Coleoptera, Diptera e Lepidoptera	Proteínas inseticidas secretadas (semelhantes às Vip e Cry)
<i>C. subtsugae</i>	Coleoptera, Diptera, Lepidoptera e Hemiptera	Agentes Bioativos
<i>Clostridium bifermentans</i>	Diptera	Cry16A, Cry17A, Cbm17.1 e Cbm 17.2
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	Diptera	Bin, Mtx e Cry48/49
<i>Paenibacillus arvae</i>	Himenoptera	Toxinas AB (Plx2, Plx3, Plx4, gene do domínio B (TxIII) e Mtx2)
<i>Paenibacillus lentimorbus</i>	Coleoptera	Cry43Aa1 e Cry43Ba1
<i>Paenibacillus popilliae</i>	Coleoptera	CryBP1 (Cry18Aa1)
<i>Photorhabdus luminescens</i>	Ctyoptera, Hymenoptera e Lepidoptera	Ilexo de toxinas (Tc) e Pyr
<i>Pseudomonas entomophila</i>	Coleoptera, Diptera e Lepidoptera	Toxina inseticida do tipo Tc
<i>Serratia entomophila</i>	Coleoptera	SepA, SepB, SepC e Afp
<i>Serratia proteamaculans</i>	Coleoptera	SepA, SepB, SepC e Afp

Fonte: Fontes (2020)

Mais recentemente, a partir do Bts, a descoberta de várias proteobactérias gram-negativas que exibem propriedades inseticidas de amplo espectro gerou interesse comercial (RUIU, 2015). Duas espécies cepas da classe Beta proteobacteria (*Burkholderia* cepa A396 e *C. subtsugae* cepa PRAA4-1) foram desenvolvidas como bioinseticidas, nematocidas e acaracidas. Produtos contendo meio fermentado com metabólitos de pesticidas e outros sólidos dessas bactérias são comercializados como

pesticidas orgânicos para uma variedade de pragas de alimentação foliar de corpo mole, incluindo lagartas, uma grande variedade de hemípteros, tripes, ácaros e alguns besouros (ARTHURS *et al.*, 2019).

3.3 Gênero *Chromobacterium*

Segundo Borges (2018) o gênero *Chromobacterium* pertence à família Neisseriaceae e à classe Betaproteobacteria. Até 2007 achava-se que o gênero era composto apenas pela espécie *Chromobacterium violaceum*, porém a partir daquele ano outras nove espécies foram isoladas e caracterizadas: *C. subtsugae* (MARTIN *et al.*, 2007), *C. aquaticum* (YOUNG *et al.*, 2008), *C. haemolyticum* (HAN *et al.*, 2008), *C. piscinae* e *C. pseudoviolaceum* (SCHOLZ, 2005), *C. vaccinii* (SOBY *et al.*, 2013), *C. amazonense* (MENEZES *et al.*, 2015), *C. alcanivorans* (BAJAJ *et al.*, 2016) e *C. rizoryzae* (ZHOU *et al.*, 2016). A maioria foi isolada e identificada em amostras ambientais por métodos moleculares (PCR –Polymerase Chain Reaction e sequenciamento, por exemplo) e bioquímicos. Apenas *C. violaceum* e *C. haemolyticum* foram isoladas de material biológico humano. Algumas propriedades e características do microrganismo podem diferir, como a patogenicidade (DURÁN *et al.*, 2016) e a presença do metabolito secundário violaceína, importante fenótipo do grupo.

A *C. subtsugae* é uma bactéria Gram-negativa que possui mobilidade flagelar (FONTES *et al.*, 2020). A *C. subtsugae* foi descoberta, em 2007, sendo isolada do solo de Maryland, EUA. Essa espécie apresenta colônias pigmentadas de violeta com crescimento ocorrendo de 24h a 48h, sendo constituída por bastonetes de 0,7 x 2,4 µm. O crescimento ideal ocorre nas temperaturas de 25°C a 28°C, pH 6,5 a 8,0 com até 1,5% de NaCl adicionado ao meio (MARTIN *et al.*, 2007).

Possui pigmentação denominada violaceína, sua atividade é tóxica para larvas de coleópteros como *Diabrotica speciosa*, larvas de lepidópteros como a *Plutella xylostella* quando ingerida oralmente; e larvas de hemípteros, como *Bemisia Tabaci* (Mosca-Branca) e *Nezara viridula* (LACEY *et al.*, 2015).

Segundo Borges (2018), a violaceína consiste de três unidades estruturais: 5-hidroxiindol, 2-pirrolidona e 2-oxoindol, formado a partir da condensação de duas moléculas modificadas de L-triptofano. A violaceína é produzida apenas sob condições

aeróbicas, dependendo de oxigênio molecular (TOBIE,1934). Embora não seja essencial para o crescimento e sobrevivência, estudos sugerem que ela pode conferir sobrevivência a predação no ambiente (MATZ *et al.*, 2008), participe da proteção contra radiação solar e regulação do nível de triptofano (DEMOSS, 1967; DURÁN; FALJONIALARIO, 1980), além de constituir um importante mecanismo de defesa antioxidante.

Além de produzir a violaceína, ela produz substâncias como: polihidroxicanoatos, cianeto de hidrogênio, antibióticos e quitinase. Apresentando atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (LACEY *et al.*, 2015).

Também sintetiza lecitinase e hidrolisa caseína em níveis semelhantes aos apresentados pela linhagem Tipo *C. violaceum*. Sua porcentagem de G+C é de 64,51 mol% enquanto que *C. violaceum* possui 64,83 mol% de G+C e outras linhagens caracterizadas como pertencentes ao gênero *Chromobacterium* apresentam entre 64-68 mol% de G+C. A análise da sequência de RNA ribossomal 16S resultou em similaridade de 97,4% com a linhagem Tipo ATCC 12472T sugerindo a formação de um clado monofilético com taxon ancestral mais próximo sendo *Vogesella indigofera* (MARTIN *et al.*, 2007).

C. subtsugae têm a capacidade de produzir uma série de metabólitos secundários interessantes, como a *C. violaceum*. Ambas espécies parecem ter a capacidade de sintetizar um sideróforo semelhante à enterobactina e um sistema de transporte associado, permitindo a absorção de ferro férrico de seus arredores ambientais (MARTIN *et al.*, 2007).

C. subtsugae é usada na agricultura como controle biológico de pragas, por possuir atividade tóxica para algumas ordens de insetos, tais como: Coleoptera (besouros), Diptera (moscas), Hemiptera (cigarrinhas e pulgões) e Lepidoptera (mariposas e borboletas) (FONTES *et al.*, 2020).

3.3.1 Processo de produção de biológicos onfarm versus comercial

Segundo Lorencetti (2019), estamos vivenciando uma nova era no controle biológico de pragas e doenças na agricultura. No início dos anos noventa, o controle biológico utilizando bactérias era restrito ao meio acadêmico, ou em alguns poucos casos, utilizado em lavouras comerciais. Uma vez que os produtos biológicos disponíveis no mercado custavam igual ou eram mais caros que os pesticidas convencionais.

Até esse ponto, haveria poucos motivos para os produtores deixarem de usar os pesticidas convencionais. Pois, apesar dos benefícios proporcionados pelo controle biológico: menor contaminação do ambiente, redução dos resíduos nos produtos agrícolas, menor impacto em microrganismos benéficos, dentre outros, continua sendo muito mais prático e econômico, para o produtor, utilizar os pesticidas químicos (LORENCETTI, 2019).

Segundo Lorencetti (2019), desde 2013/2014 surgiram tecnologias que permitem aos produtores multiplicarem, na propriedade rural, as bactérias de interesse agrícola a baixo custo. Atualmente, o controle biológico de enfermidades em plantas não é mais uma utopia, é uma realidade. O mercado de biológicos cresce em um ritmo acelerado.

A produção *onfarm* de bactérias apresenta algumas vantagens sobre o uso de produtos comerciais. A maior delas é a diminuição dos custos para o produtor, devido à fabricação própria e à inexistência dos custos de transporte e armazenagem (LORENCETTI, 2019).

Produção *onfarm* é quando os produtores fabricam, na própria fazenda, caldos fermentados contendo microrganismos de interesse agrícola. Esse multiplicado é utilizado para o controle de doenças e pragas e a principal vantagem desse processo é a redução de custos e o uso em maiores quantidades (CUNHA *et al.*, 2020).

Segundo Meyer *et al.* (2022) enquanto o mercado convencional de defensivos agroquímicos tem apresentado sinais de estagnação, com resultado recente de queda global de 6% na produção (US\$ 64 bilhões), o saldo mundial do controle biológico em 2018 foi 17% maior que o alcançado no período anterior, de US\$ 3,8 bilhões.

A utilização de bioinsumos vem crescendo no Brasil e no mundo devido aos fatores relacionados às questões regulatórias, de mercado e de manejo das culturas.

O mercado global de biológicos para agricultura, que envolve biodefensivos,

inoculantes, bioestimulantes e biofertilizantes, foi estimado em US\$ 9,9 bilhões em 2020 e, nesse rol, apenas os produtos biológicos de controle, respondem por US\$ 5,2 bilhões (IHS MARKIT, 2021). A expectativa é a de que o mercado mundial de bioinsumos continue apresentando elevada taxa de crescimento, alcançando um valor acima de US\$ 10 bilhões para biodefensivos e US\$ 3 bilhões para bioestimulantes (MEYER *et al.*, 2022).

Segundo Monnerat *et al.* (2018) equipamentos básicos para a instalação de uma estrutura de produção de bioinsumos são: área de utilidades, laboratório de controle de qualidade e processo, sala de fermentação, sala de estoque de insumos e sala para armazenamento de produto acabado.

Área de utilidades: A área de utilidades pode-se restringir a uma cobertura sob a qual se disponham um gerador de vapor, compressor de ar e sistema de resfriamento (torre de resfriamento e/ ou água gelada) (MONNERAT *et al.*, 2018).

Laboratório de controle de qualidade e processo: este espaço deve conter capela de fluxo laminar, sistema de inoculação, microscópio de contraste de fases, placa aquecedora ou banho-maria, autoclave pequena, estufa de secagem, estufa de crescimento, incubador rotativo, pipetas de precisão. Salão de fermentação: neste ambiente, deverão ser colocados os reatores esterilizáveis, sala de estoque de insumos, nesta sala, deverão ser colocados todos os materiais que serão empregados no processo de fermentação (MONNERAT *et al.*, 2018).

Sala de armazenamento de produto acabado: nesta sala, será estocado o produto acabado e de preferência deverá ser refrigerada. Todas as áreas deverão ser passíveis de limpeza e desinfecção, com acabamento impermeável. de outras combinações de plantas em consórcio deve ser pesquisado e devidamente avaliado para que possam ser adotados com sucesso (MONNERAT *et al.*, 2018).

Para Monnerat *et al.* (2018) entretanto, essa fabricação também importa em alguns riscos, sendo o maior deles, o da contaminação do caldo fermentado com microrganismos patogênicos ao ser humano.

Segundo Cunha *et al.* (2020) para a criação de uma produção *onfarm* é necessário a instalação da biofábrica, aquisição e ou produção do meio de cultura, aquisição e ou produção do inóculo, fermentação e multiplicação, teste de qualidade e assim que resultará no produto biológico pronto para uso.

A percepção dos agricultores de vantagem para estabelecimento de biofábricas é a de que, com produção própria, esses produtos poderão ser usados intensivamente a um baixo custo (CUNHA *et al.*, 2020).

Segundo Hungria *et al.* (2020), o uso de germoplasma não certificado, de bioprocessos não adequados a cada microrganismo e de uso errôneo pelo agricultor podem levar a resultados totalmente distintos aos preconizados pela pesquisa. Como exemplo, inoculantes com *Azospirillum brasilense*, hoje com a comercialização de cerca de 10 milhões de doses anuais, exigem uma concentração precisa de células; se inferior, os efeitos promotores do crescimento não são verificados e, se superior, ocorre a inibição e não o estímulo do crescimento das plantas.

Após vários estudos de concentração de células e ajuste de dose de inoculantes comerciais de *A. brasilense*, a dose recomendada na maioria dos produtos comerciais é de apenas 100 mL por hectare de um produto contendo 1×10^8 células.mL⁻¹, não sendo necessário mais do que isso. Doses superiores inibiriam o crescimento e, mais provável ainda frente aos resultados já obtidos pela pesquisa. Doses contínuas dos patógenos que têm sido detectados nos inoculantes comerciais certamente apresentam alto risco fitossanitário, à saúde humana, ao ambiente, ao consumo nacional e às exportações (HUNGRIA *et al.*, 2020).

Segundo Cunha *et al.* (2020) diferenças entre os produtos comerciais e os produção de produção *onfarm* podem ser estabelecidas como: o produto comercial tem maior custo em relação ao custo e exige menor dose de aplicação em relação com o produto *onfarm*; produto comercial tem uma maior qualidade e também possui um maior *shelflife* (tempo de prateleira) e já o *onfarm* precisa ser de uso imediato; o produto comercial é formulado e possui maior tolerância ao stress (UR,UV,etc) e o *onfarm* não é formulado e possui menor tolerância ao stress.

O produto comercial é uma mistura de microrganismos e o produto *onfarm* é um microrganismo isolado; o produto comercial possui maior controle no processo de multiplicação (CUNHA *et al.*, 2020).

Em todo o mundo, a produção comercial de *B. thuringiensis* e também como várias proteobactérias, como por exemplo a *C. subtsugae* se dá através do cultivo líquido agitado, também conhecida como fermentação submersa descontínua ou batelada (HURTADO, 2004).

Segundo Monnerat *et al.* (2018), a fermentação em batelada consiste na disponibilização inicial de um meio de cultura para que o microrganismo aumente em

número de forma exponencial até que se esgotem os nutrientes e o substrato torne-se limitante ao crescimento. Durante o processo, pode-se acrescentar algum nutriente específico ou o meio de cultivo completo, ao que se denomina de batelada alimentada. Ambas as formas de fermentação são conduzidas em biorreatores ou fermentadores que, além de permitir o cultivo da estirpe do microrganismo selecionado, possibilitam o controle da espuma, pH, temperatura, agitação e saturação de oxigênio (MONNERAT *et al.*, 2018).

O processo de multiplicação bacteriana sempre se inicia em um laboratório com a produção do pré-inóculo, a partir de uma estirpe comprovadamente pura, geralmente em recipientes do tipo Kitazato ou Erlenmeyer, que é transferido para o pré-fermentador, cujo volume útil varia de 2 a 10% do volume do cultivo final. A principal finalidade do pré-inóculo no processo fermentativo é reduzir o período de adaptação do microrganismo ao meio de cultivo adotado, diminuindo o tempo total de fermentação (COUCH, 2000).

Alguns processos fermentativos *onfarm* têm adotado como inóculo produtos comerciais. Cabe destacar que essa é uma prática temerária, visto que algumas etapas do processo fabril podem propiciar certo grau de contaminação. Ainda que esses contaminantes não afetem a eficácia do mesmo, quando introduzidos no início do processo fermentativo, crescem mais rápido que a estirpe desejada e afetam a qualidade do produto final (MONNERAT *et al.*, 2018).

3.3.2 Fatores limitantes do processo de produção

Segundo Monnerat *et al.* (2018) o meio de cultura é uma das chaves do sucesso da produção. Na composição básica deve conter carbono (sacarose, glicose, etc), fontes orgânicas (extrato de levedura, farinha de soja, peptonas, proteínas, etc) e fontes inorgânicas (sais minerais como: fósforo, cálcio, potássio, ferro, magnésio, etc). Alguns microrganismos necessitam de meios de cultura com composição específica. O pH ideal entre 6,8 e 7,2 inicial (neutro) deve ser monitorado durante o processo, por exemplo no caso da produção de *B.thurginiensis* o controle do pH evita a baixa produção de proteínas Cry (MONNERAT *et al.*, 2018).

De acordo com Monnerat *et al.* (2018) a concentração de oxigênio dissolvido (OD), por exemplo bactérias aeróbicas como a *B.thurginiensis* não deve ser abaixo de 20%. A temperatura ideal também depende de cada microrganismo, mas geralmente faixa de temperatura ideal a qual é monitorada nos biorreatores é situada entre 28°C

a 32°C (MONNERAT *et al.*, 2018).

O tempo de crescimento dos microrganismos também é um fator limitante ao processo de produção, e varia muito para cada microrganismo, para bactérias o tempo de crescimento geralmente varia entre 24 a 48 horas e 96 horas para fungos ou bactérias com metabólitos (MONNERAT *et al.*, 2018).

Para Monnerat *et al.* (2018) controle de qualidade é essencial no monitoramento da produção; normalmente as bactérias usadas em controle biológico não são boas competidoras precisa ser realizado em todas as fases do processo, nunca deve ser produzido dois microrganismos juntos.

A estrutura básica necessária para a produção *onfarm* pressupõe dispor de uma estrutura física (energia elétrica estável, ambiente controlado, etc) adequada. Água de boa qualidade, biorreatores, meio de cultura, inóculo de qualidade e profissional qualificado e também um laboratório de controle de qualidade do processo (MONNERAT *et al.*, 2018).

O próprio inóculo é um fator limitante no processo de produção pois as fontes deles podem variar, os inóculos podem ser obtidos na própria fazenda, inóculos próprios para multiplicação que são adquiridos em empresas, inóculos adquiridos em instituições de pesquisas como por exemplo a EMBRAPA e também através de produtos comerciais que não é indicado, pois pode ocorrer contaminação e os produtores comerciais contêm estabilizantes e conservantes que podem interferir no processo fermentativo (MONNERAT *et al.*, 2018).

4 METODOLOGIA

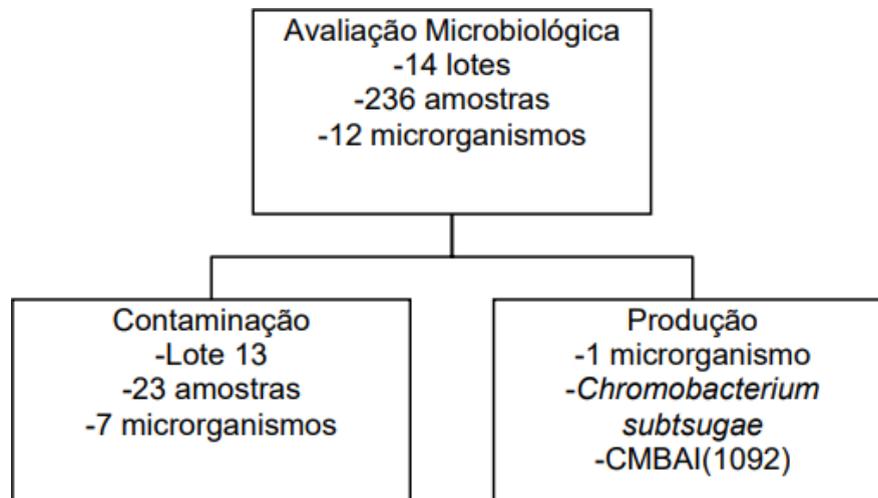
4.1 Local

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Bioprocessos I do Departamento Acadêmico de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, localizados na UTFPR - Campus Ponta Grossa.

4.2 Delineamento experimental

Este trabalho foi organizado em três etapas conforme mostra a figura 1. Na primeira foram realizadas análises microbiológicas em microrganismos diversos oriundos de produção *onfarm* para contagem de células e identificação de contaminações, em seguida para um dos lotes recebidos foram avaliadas criteriosamente as contaminações observadas no mesmo e para finalizar foi realizado um estudo de otimização do processo fermentativo para obtenção de *C. subtsugae*.

Figura 1 - Organograma das etapas experimentais do presente trabalho



Fonte: Autoria própria (2021)

4.3 Avaliação microbiológica

Foram realizadas avaliações microbiológicas de 236 amostras de microrganismos provenientes de Biofábrica com sistema *Onfarm* localizada na região dos Campos Gerais - PR. As amostras foram recebidas em 14 lotes distribuídos entre 04 de maio de 2020 e 28 de maio de 2021. Cada lote era composto por microrganismos diversos, no total foram analisadas 12 espécies (Quadro 2). O objetivo desta análise foi quantificar o número de células viáveis em cada amostra e avaliar qualitativamente possíveis contaminações.

Quadro 2 - Ocorrência e distribuição por lote recebido das espécies de microrganismos

Microrganismos	Ocorrência da amostra	Lotes
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	19	9,10,11,12,13,14
<i>Saccharopolyspora spinosa</i>	7	1,6,8,10
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	9	1,5,6,9,14
<i>Bacillus subtilis</i>	29	1,2,3,5,6,7,8,9,10,11,12,14
<i>Bacillus pumilus</i>	19	1,5,7,9,10,14
<i>Chromobacterium subtsugae</i>	37	1,2,3,4,6,9,11,12,13,14
<i>Azospirillum spp.</i>	22	1,2,3,6,9,10,11,12,13,14
<i>Bacillus megaterium</i>	13	2,3,6,8,9,10,11,12,13
<i>Trichoderma asperellum</i>	24	5,6,9,10,11,12,13,14
<i>Bacillus thurgiensis</i>	9	8,9,10,11,12
<i>Bacillus aryabhatai</i>	7	10,11,12,14
<i>Beauveria bassiana</i>	1	13

Fonte: Autoria própria (2021)

4.3.1 Coleta e Recepção das Amostras

A coleta das amostras foi realizada em tubos Falcon estéreis com capacidade de 50 mL diretamente da saída dos tanques de fermentação. A coleta foi realizada por profissional treinado na empresa. Assim que coletadas, os frascos foram vedados, identificados e armazenados sob refrigeração até o momento do transporte.

As amostras foram transportadas até a UTFPR-PG acondicionadas em embalagens de isopor com gelo. Ao chegar no laboratório as amostras foram conferidas quanto à identificação, aparência e integridade dos frascos e armazenadas em refrigerador (+ ou - 10°C) até o momento da análise. Ficavam armazenadas até no máximo 48 h para serem analisadas.

4.3.2 Preparo dos Meios de Cultura

Para a diluição e contagem dos microrganismos previamente foi realizado o preparo dos meios de cultivo e soluções, além da esterilização dos materiais a serem utilizados nas análises.

Água peptonada 1% foi utilizada para a diluição das amostras. Para o preparo da solução foi pesado 1g de peptona bacteriológica para cada 100mL de água destilada. Após diluição completa a solução foi acondicionada em frasco Erlenmeyer e esterilizada a 121°C por 15 min em autoclave.

Na contagem dos microrganismos foi utilizado o meio YPD (Yeast- extract-peptone-dextrose), contendo (g.L⁻¹) 10 de extrato de levedura 20,0 de dextrose e 10,0 de ágar bacteriológico (KANEKO *et al.*, 2019). Após a pesagem dos meios estes foram diluídos em água destilada, acondicionados em frasco erlenmeyer de 500mL e esterilizados em uma autoclave a 121°C por 15 min. Após o resfriamento parcial, aproximadamente 20 mL de meio foi vertido em cada placa de Petri de previamente esterilizada.

4.3.3 Determinação do número de bactérias

A estimativa numérica de células bacterianas foi feita por meio da contagem em placas e também da contagem de células por microscopia em Câmara de Neubauer. Para ambos os testes foi necessário realizar o preparo e diluição das amostras adequando assim o número de células na solução para possibilitar a contagem de maneira correta.

O preparo de todas as amostras foi realizado de forma similar. Foram utilizados 25 mL para realizar as diluições para contagem em placa e câmara de Neubauer, e os demais 25 mL armazenados como contraprova para os casos onde apresentou-se contaminação ou impossibilidade de contagem. Todas as análises foram feitas em duplicatas.

Na realização das diluições em cada amostra foi utilizado um erlenmeyer com 225 mL de água peptonada 1% + 25 mL da amostra (diluição 10⁻¹). Em seguida, com auxílio de micropipeta uma alíquota de 100 µl da diluição anterior foi adicionada à 900µl de água peptonada 1% acondicionada em eppendorf (diluição 10⁻²), este

processo ocorreu de maneira sucessiva até atingir a diluição de 10^{-9} (VALENÇA *et al.*, 2016).

4.3.3.1 Contagem em Placas

Neste trabalho a técnica de contagem utilizada foi a técnica da microgota. Para a inoculação das diluições das amostras, transferiu-se uma alíquota de 0,025mL (25 μ L) de cada diluição para placas de Petri já contendo meio de cultura sólido, formando uma microgota sobre a superfície do meio (VALENÇA *et al.*, 2016). Posteriormente, as placas foram deixadas em repouso sobre uma superfície plana perto do bico de bunsen até absorção da alíquota pelo meio. Em seguida, as placas contendo as microgotas foram incubadas na temperatura ótima de crescimento microbiano (30°C) durante 24 a 48 h (VALENÇA *et al.*, 2016).

Ao final deste período as placas foram retiradas da incubadora e foi realizada a contagem das colônias observadas. Foram contadas as diluições que apresentavam crescimento entre 10 e 70 colônias. Feita a média das duplicatas para a diluição escolhida.

A alíquota inoculada foi de 0,025 mL e ela foi multiplicada pela diluição escolhida, a diluição escolhida foi de 10^{-6} neste caso significa 0,0000001mL da solução.

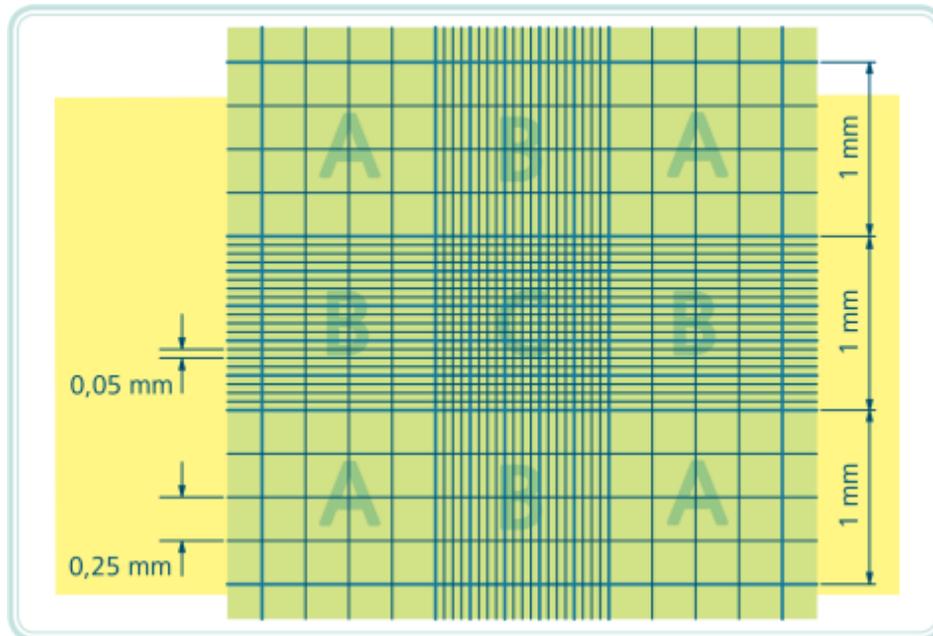
Depois desta multiplicação por intermédio de uma regra de três, transformou-se o resultado em UFC/mL, dividindo o valor do resultado da média das colônias pelo resultado da alíquota multiplicada pela diluição. O resultado foi expresso em notação científica.

4.3.4 Contagem em Câmara de Neubauer

Ao contrário da contagem em placas, a contagem em câmara de Neubauer possibilita contar todas as células presentes nas amostras, inclusive aquelas que não apresentam viabilidade. A grande vantagem deste método de contagem microbiana é o fato de obter resultado já no momento da execução da técnica. Ou seja, não é necessário incubação por um período de 24 – 48 h, como ocorre nos métodos de contagem em placas (VALENÇA *et al.*, 2016). Por isso, é um método bastante útil para contagem de microrganismos em processos de fermentação.

A câmara é dividida em nove quadrantes, cada um com 25 sub-quadrantes. Cada quadrante pode ser separado em três tipos com subdivisões de tamanhos diferentes: A, B C. As diferentes divisões dos quadrantes servem para contar microrganismos de diferentes tamanhos. Neste estudo o quadrante selecionado foi o quadrante C.

Figura 2 - Campo de leitura de uma câmara de Neubauer



Fonte: VIEIRA *et al* (2012)

Para realizar a técnica uma alíquota de 30 μ l da diluição 10^{-6} de cada amostra foi acondicionada separadamente na câmara de Neubauer. A contagem foi realizada com auxílio de um microscópio óptico utilizando a objetiva de 100x.

Cada aresta do campo de leitura da câmara mede 3mm. Portanto, a área total da placa mede 9mm². Com a lamínula, o poço de leitura fica com uma profundidade de 0,1mm. Portanto, o volume total da placa é de 0,9mm³.

Na contagem microbiana, foram selecionados apenas 1 dos 9 quadrantes, neste caso, o volume selecionado para leitura é de 0,1mm³ (0,9mm³/9).

No quadrante selecionado para contagem, foi contado 5 sub-quadrantes (os dos cantos superiores, os dos cantos inferiores e o quadrado central).

Com os valores obtidos na contagem dos 5 sub-quadrantes, foi determinado o valor do quadrado médio, que é a média aritmética dos quadrantes contados.

O valor do quadrante médio foi multiplicado por 25, que é o número total de sub-quadrantes contidos no quadrante de contagem.

O valor obtido está em um volume de $0,1\text{mm}^3$. Convenientemente, este valor deve ser transformado para cm^3 , pois 1cm^3 equivale a 1mL . Em contrapartida, 1cm^3 equivale a 1000mm^3 . Portanto, o número de células obtido na contagem, está em $0,0001\text{mL}$. Então, pode-se assumir que para expressar o resultado em células por mL , pode-se multiplicar o número de células contadas pelo fator de 10000. Assim, o resultado já estará expresso em células/ mL .

O resultado foi obtido através da multiplicação do número de células/ ml pelo fator de diluição da amostra (10^{-6}).

4.4 Análise das contaminações

Em todos os lotes avaliados foi observado algum tipo de contaminação em algumas amostras, então foi escolhido um lote específico para análise e identificação dos microrganismos contaminantes, o lote escolhido foi o lote 13 pois foi um lote que teve um número elevado de contaminações, contendo 23 amostras e 7 espécies de microrganismos. Neste lote foram selecionadas 5 amostras que estavam contaminadas, as amostras selecionadas foram: 2,8,9,10 e 13.

O método utilizado para análise foi o método de coloração de gram (DINIZ, 2018). Esta técnica para identificar através da fixação e coloração qual era a morfologia do microrganismo contaminante.

Para possibilitar a realização da técnica, em cada placa contaminada, foi realizado o repique das colônias dos microrganismos ali contidos (microrganismo alvo + contaminações).

Primeiramente para realizar a técnica de coloração foi realizado o isolamento dos microrganismos, com o auxílio de uma alça bacteriológica pegou-se um pouco do microrganismo já crescido em uma placa de petri fazendo estrias sucessivas até o esgotamento final do material em outra placa de petri contendo o meio YPD já vertido e esterilizado. A alça foi flambada sucessivas vezes para completo esgotamento do material (DINIZ, 2018).

Depois do isolamento, a placa de petri foi incubada em uma estufa á 30°C , e depois de 24 horas a placa de petri com o microrganismo isolado foi retirada para o próximo passo que é a coloração de gram.

Quadro 3 - Composição de espécies de microrganismos do lote 13, em destaque os lotes contaminados que foram encaminhados para análise.

Amostra N°	Amostra Nome
Amostra N°1	<i>Chromobacterium subtsugae</i>
Amostra N°2	<i>Chromobacterium subtsugae</i>
Amostra N°3	<i>Trichoderma spp</i>
Amostra N°4	<i>Chromobacterium subtsugae</i>
Amostra N°5	<i>Bacillus amylolichefaciens</i>
Amostra N°6	<i>Chromobacterium subtsugae</i>
Amostra N°7	<i>Chromobacterium subtsugae</i>
Amostra N°8	<i>Azospirillum spp</i>
Amostra N°9	<i>Trichoderma harzianum</i>
Amostra N°10	<i>Bacillus amylolichefaciens</i>
Amostra N°11	<i>Trichoderma harzianum</i>
Amostra N°12	<i>Beauveria bassiana</i>
Amostra N°13	<i>Bacillus meggaterium</i>
Amostra N°14	<i>Bacillus amylolichefaciens</i>
Amostra N°15	<i>Chromobacterium subtsugae</i>
Amostra N°16	<i>Bacillus amylolichefaciens</i>
Amostra N°17	<i>Trichoderma harzianum</i>
Amostra N°18	<i>Chromobacterium subtsugae</i>
Amostra N°19	<i>Bacillus amylolichefaciens</i>
Amostra N°20	<i>Chromobacterium subtsugae</i>
Amostra N°21	<i>Chromobacterium subtsugae</i>
Amostra N°22	<i>Chromobacterium subtsugae</i>
Amostra N°23	<i>Trichoderma harzianum</i>

Nota: As espécies que foram analisadas estão em negrito.

Fonte: Aatoria própria (2021)

Depois que o microrganismo estava isolado realizou-se o esfregaço do material, que foi pouco espesso e homogêneo.

Pegou-se uma alíquota do microrganismo e foi espalhado com alça bacteriológica em uma lâmina de vidro limpa, desengordurada e seca. Posteriormente, a lâmina foi deixada secar ao ar por alguns minutos. Após a secagem, a lâmina foi fixada.

A fixação evita que as células dos microrganismos sejam lavadas e perdidas durante o processo de coloração. Além disto, a fixação permite a aderência das células à lâmina, matando os microrganismos através da coagulação de seus protoplasmas, preservando suas estruturas na forma e posição originais. O calor é o método de

fixação frequentemente utilizado. Para realizar a fixação, a lâmina com o esfregaço foi voltada para cima, passada três vezes através da chama.

Depois de realizar o esfregaço foram realizados os passos para a coloração de Gram: a lâmina foi coberta com solução de cristal violeta, aguardou-se um minuto e o corante foi descartado em um recipiente.

Depois do cristal violeta, a lâmina foi coberta com lugol e aguardou-se 30 segundos e depois o corante foi descartado.

A lâmina foi inclinada e foi gotejada nela algumas gotas de acetona até que não ter desprendimento de corante, cerca de 30 segundos. Depois a lâmina foi lavada em água destilada abundante.

O último passo foi cobrir com o corante fucsina e aguardar 30 segundos. Após esses processos a lâmina foi lavada e deixada secar, depois de seca que foi observada no microscópio óptico (DINIZ, 2018).

Após a identificação microbiológica das contaminações, foi elaborado relatório e elencadas as possíveis causas da contaminação a serem combatidas.

4.5 Produção da *C.subtsugae*

Foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) para avaliar a interação entre as variáveis no processo fermentativo da *C. subtsugae* em estudo e otimizar os resultados alcançados em termos de produção de células viáveis. A linhagem escolhida foi a *C.subtsugae* pois é o microrganismo com maior número de amostras analisados e também existem poucas referências sobre o seu processo fermentativo.

O experimento foi realizado no software minitab® (versão livre experimental 30 dias) composto de 17 ensaios, sendo 8 pontos cúbicos, 6 pontos axiais e 1 ponto central por período, sendo este replicado 3 vezes (Tabela 1). A cepa *C. subtsugae*, foi produzida no meio de cultivo YPD, onde foram avaliadas três variáveis de entrada: T°C, NaCl, Glicose ao longo de 96 h. A variável de saída foi a concentração de células em 24, 48, 72 e 96 h.

Tabela 1 - Delineamento Composto Central Rotacional para avaliação das variáveis T°C, NaCl e Glicose no processo fermentativo para obtenção de *C. subtsugae*.

Ensaio	T°C	Glicose(g)			NaCl(g)	
	X ₁ (°C)	X ₁	X ₂ (g.L ⁻¹)	X ₂	X ₃ (g.L ⁻¹)	X ₃
1	31	+1	2,1	+1	2,1	+1
2	31	+1	2,1	+1	0,9	-1
3	31	+1	0,9	-1	2,1	+1
4	31	+1	0,9	-1	0,9	-1
5	25	-1	2,1	+1	2,1	+1
6	25	-1	2,1	+1	0,9	-1
7	25	-1	2,1	+1	2,1	+1
8	25	-1	0,9	-1	0,9	-1
9	23	-1,68	0,9	-1	1,5	0
10	33	+1,68	1,5	0	1,5	0
11	28	0	1,5	0	1,5	0
12	28	0	0,5	-1,68	1,5	0
13	28	0	2,5	+1,68	0,5	-1,68
14	28	0	1,5	0	2,5	+1,68
15	28	0	1,5	0	1,5	0
17	28	0	1,5	0	1,5	0

Fonte: Autoria própria (2021)

4.5.1 Preparo do Inóculo

Uma fração de 5mL do inóculo foi adicionada em quatro erlenmeyers contendo 150mL do meio YPD previamente esterilizado. Os frascos foram inoculados em incubadora com agitação orbital (f) (fotografia 1) nas seguintes temperaturas: 31°C, 25°C, 23°C, 33°C, 28°C por 96 h, com retirada de amostra para contagem de células a cada 24 h.

Fotografia 1- Incubadora de agitação orbital



Fonte: Autoria própria (2021)

4.5.2 Determinação do número de bactérias

A estimativa numérica de células bacterianas foi feita através da contagem de células por microscopia em Câmara de Neubauer e da densidade óptica, a contagem em Câmara de Neubauer já foi descrita anteriormente na seção 4.3.4.

4.5.3 Densidade Óptica

A Densidade Óptica (D.O) da cultura corresponde à absorbância, que é determinada com base na expressão $D.O = \log(I_0/I)$, onde I_0 é a intensidade da luz incidente e I é a intensidade da luz transmitida através da suspensão de células. Comprimentos de onda frequentemente usados para medição da Densidade Óptica de suspensões de células de bactérias ou leveduras incluem 540, 600, 640 ou 660 nm. Existe, dentro de certos limites, uma relação linear entre a absorbância ou D.O. da cultura e o número total de células por mililitro de suspensão, ou seja, a concentração celular. Contudo, para suspensões celulares muito densas (por exemplo, com D.O.560 superior a 0,4) é frequentemente necessário diluir as culturas de modo a que todos os valores de D.O. medidos estejam incluídos na parte linear da curva D.O. versus concentração celular (ALBIERO,2013).

A curva de calibração relaciona densidade óptica (D.O) à medida de massa. Tal curva pode ser não linear a altos valores de D.O > 0,3 e depende da extensão do estado fisiológico da célula (BORZANI *et al.*, 2001). Neste trabalho foi analisado 1 mL de cada amostra diluída na concentração de 10^{-7} no espectrofotômetro, o comprimento de onda foi ajustado em 660 nm.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Resultados da avaliação microbiológica do controle de qualidade das amostras

Os resultados apresentados nesta sessão são os resultados das contagens de células dos microrganismos, tanto em contagem em placas quanto em contagem em câmara de Neubauer.

5.1.1 Controle de qualidade das bactérias do gênero *Bacillus*

Os resultados a seguir são de 6 espécies do gênero *Bacillus*, onde foi realizado um monitoramento da qualidade microbiológica de cada microrganismo. As espécies do gênero *Bacillus* analisadas foram: *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus thurgiensis*, *Bacillus aryabhatai*.

5.1.2 *Bacillus amyloliquefaciens*

B. amyloliquefaciens também é uma rizobactéria promotora do crescimento de plantas (BPCP), ou seja, se trata de uma espécie de bactéria benéfica capaz de colonizar a rizosfera e as raízes das plantas, resultando no aumento do crescimento das plantas e/ou na proteção contra certos patógenos vegetais (MASCIA, 2016). Na tabela 2 estão os resultados dos números de Unidades Formadoras de Colônias e de células na câmara de Neubauer de *B. amyloliquefaciens* em UFC/mL.

Em consulta no mês dezembro de 2021 havia sete produtos registrados no MAPA a base de *B. amyloliquefaciens* para controle de fungos, oomicetos, bactérias e nematóides: Eficaz Nema®, PFC-Control®, Nemacontrol® e No-nema® (bionematicidas); Quartzo SC®, Serifel/Duravel® e Ecoshot® (biofungicidas).

O mínimo de esporos por mL⁻¹ ou g⁻¹ desses produtos registrados no MAPA é 1,0 x 10⁹ UFC, exceto o Serifel/Duravel® que o mínimo é de 5,5 x 10¹⁰ esporos viáveis/g.

Tabela 2 - Resultado dos números de Unidades Formadoras de Colônias e de células na câmara de Neubauer de *B. amyloliquifaciens*

		L9	L10	L11	L12	L13	L14
A1	CP	---	$4,7 \times 10^5$	$4,5 \times 10^5$	$3,1 \times 10^7$	$2,0 \times 10^9$	----
	CN	$6,7 \times 10^8$	$3,5 \times 10^8$			$2,8 \times 10^8$	$2,5 \times 10^7$
A2	CP	$4,8 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$		$1,8 \times 10^8$	$2,0 \times 10^9$	
	CN	---					
A3	CP	$1,6 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$		$1,6 \times 10^9$	$2,1 \times 10^8$	
	CN						
A4	CP	$1,8 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$				
	CN						
A5	CP		$6,9 \times 10^6$		$1,7 \times 10^9$		
	CN						

Nota: L:Lote;A:Amostra;(----) ContaminaçãoCP:Contagem em placas, CN:Contagem em câmara de Neubauer

Fonte: Autoria própria (2022)

Analisando a tabela 2, somente nos lotes 12 e 13 possuem amostras com a concentração de células dentro do mínimo esperado comparando com os produtos comercializados contendo a cepa de *B. amyloliquifaciens*. As amostras analisadas neste estudo são provenientes de diferentes fases do processo produtivo, o que pode explicar o número baixo da concentração de células viáveis

Segundo Monnerat *et al.* (2018) um procedimento importante no controle de qualidade dos bioprodutos é a identificação morfológica das bactérias.

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.

Ao receber as amostras analisadas para o controle de qualidade não era possível realizar este procedimento de análise para ver em qual fase celular as bactérias do gênero *Bacillus* se encontravam.

5.1.3 *Bacillus pumilus*

Bacillus pumilus é uma bactéria formadora de esporos, encontrada em vários tipos de ambientes, principalmente no solo, água, ar e tecidos vegetais em de composição. Essa bactéria é amplamente utilizada em processos industriais, fabricação de alimentos fermentados, tratamento de água e de ambientes contaminados (COSTA *et al.*,2020).

Segundo Costa *et al.* (2020), na agricultura, *B. pumilus* está sendo empregado para o controle de diversos fungos, além de promover o crescimento de plantas. Existe apenas um produto no MAPA a base de *B. pumilus* para controle de fungos que é o Sonata® para controle de: (*Colletotrichum lindemuthianum*, *Alternaria porri*, *Botrytis cinerea*, *Sphaerothe cafuliginea*, *Sphaerothe camacularis*, *Uncinula necator*, *Alternaria solanie* *Cryptosporiopsis perennans*). Na tabela 3 está registrado o resultado dos números de Unidades Formadoras de Colônias e de células na câmara de Neubauer *B. pumilus* em UFC/mL.

Tabela 3 - Resultado dos números de Unidades Formadoras de Colônias e de células na câmara de Neubauer de *B. pumilus*

		L 1	L 5	L 7	L 9	L 10	L 14
A1	CP	$4,8 \times 10^4$	$8,3 \times 10^7$	$2,8 \times 10^8$	$2,1 \times 10^6$	$2,3 \times 10^6$	---
	CN	$1,9 \times 10^7$	$1,4 \times 10^8$	$6,6 \times 10^8$	$7,3 \times 10^8$	$5,8 \times 10^8$	$2,1 \times 10^8$
A2	CP		$5,0 \times 10^6$	$2,3 \times 10^8$		$4,5 \times 10^5$	
	CN		$3,4 \times 10^7$	$6,3 \times 10^8$		$5,4 \times 10^8$	
A3	CP		$1,2 \times 10^7$	$2,6 \times 10^8$		$5,5 \times 10^5$	
	CN		$3,4 \times 10^7$	$6,0 \times 10^8$		$5,6 \times 10^8$	
A4	CP		$1,0 \times 10^8$	---			
	CN		$2,5 \times 10^7$	$4,2 \times 10^8$			
A5	CP		$1,4 \times 10^8$				
	CN		$2,9 \times 10^7$				
A6	CP		$1,1 \times 10^8$				
	CN		$3,0 \times 10^7$				
A7	CP		$1,2 \times 10^8$				
	CN		$2,0 \times 10^7$				
A8	CP		$1,0 \times 10^7$				
	CN		$1,2 \times 10^7$				
A9	CP		$9,1 \times 10^6$				
	CN		$1,1 \times 10^7$				

Nota: L:Lote;A:Amostra; (---) Não foi possível realizar contagem de células, concentração alta; CP: Contagem em placas, CN:Contagem em câmara de Neubauer.
Fonte: Autoria própria (2022)

O Sonata® registrado no MAPA possui a concentração mínima de células de 1×10^9 UFC/g.L⁻¹ de ativo. Analisando a tabela 3, nenhum dos lotes e amostras possui o mínimo de células necessárias segundo a instrução normativa do MAPA (2011) os produtos que contenham bactérias fixadoras de nitrogênio para simbiose com leguminosas deverão apresentar concentração mínima de $1,0 \times 10^9$ Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por grama ou mililitro de produto, mantendo a garantia registrada até a data de seu vencimento.

O baixo número de concentração de células viáveis pode estar relacionado ao meio de cultura que a bactéria foi multiplicada na empresa *onfarm*.

Para Bocatti *et al.* (2022) em muitos casos, a fonte de carbono no meio de cultura usado para produção *onfarm* não é apropriada o que explica muitas vezes a baixa concentração mínima de células dos microrganismos.

5.1.4 *Bacillus subtilis*

B. subtilis é encontrada principalmente no solo e na rizosfera, o que proporciona proteção contra vários agentes causadores de doenças em plantas. O grande interesse nessa espécie bacteriana consiste nos inúmeros metabólitos secundários que ela produz, podendo ser utilizada no âmbito agrícola e medicinal. Além disso, essa bactéria é capaz de produzir biofilmes que proporcionam uma colonização preventiva e benéfica para as raízes de inúmeras plantas.

Existem seis produtos registrados no MAPA a base de *B. subtilis* para controle de fungos, bactérias e nematoides: Rizos®, RizosOG® e Biobaci® (bionematicidas); Bio-Imune® e Biobac® (biofungicidas); e Serenade® (biofungicida e biobactericida) na tabela 4 está representado o resultado dos números de Unidades Formadoras de Colônias e de células na câmara de Neubauer de *B. subtilis* em UFC/mL.

A concentração mínima de células de três dos produtos comerciais a base de *B. subtilis* :Rizos®, RizosOG® e Bio-Imune® é de $3,0 \times 10^9$, a concentração mínima do Biobaci®,é de 1×10^8 UFC/mL, e a concentração do Biobac® e do Serenade® é de $1,0 \times 10^9$ UFC/mL.A concentração varia entre 1×10^8 a $3,0 \times 10^9$ UFC/mL. Analisando a tabela 4, sete lotes dos doze tiveram a concentração mínima de células dentro do valor esperado comparado aos produtos comerciais a base de *B. subtilis* e cinco lotes a concentração mínima de células estavam abaixo do esperado.

Tabela 4 - Resultado dos números de Unidades Formadoras de Colônias e de células na câmara de Neubauer de *B.subtilis*

		L1	L 2	L3	L 5	L 6	L7
A1	CP	$7,2 \times 10^4$	$1,2 \times 10^5$	$1,7 \times 10^5$	$9,6 \times 10^6$	$1,3 \times 10^7$	---
	CN	$9,5 \times 10^7$		$2,9 \times 10^8$			$5,0 \times 10^8$
A2	CP			$2,8 \times 10^7$			
	CN			$1,1 \times 10^8$			
		L1	L 2	L3	L 5	L 6	L7
A3	CP			$1,6 \times 10^7$			
	CN			$9,1 \times 10^7$			
A4	CP		$1,0 \times 10^8$				
	CN		$6,7 \times 10^7$				
A5	CP						
	CN						
A6	CP						
	CN						
		L 8	L 9	L 10	L 11	L 12	L14
A1	CP	$2,3 \times 10^7$	$2,8 \times 10^6$	---	$1,5 \times 10^6$	$2,8 \times 10^9$	$2,9 \times 10^9$
	CN	$6,4 \times 10^8$	$5,2 \times 10^8$	$6,0 \times 10^8$			$7,3 \times 10^8$
A2	CP		---	$9,7 \times 10^6$		---	
	CN		$7,5 \times 10^8$	$5,6 \times 10^8$			
A3	CP			$3,4 \times 10^7$		---	
	CN			$6,2 \times 10^8$			
A4	CP			$5,2 \times 10^7$		$2,8 \times 10^9$	
	CN			$5,3 \times 10^8$			
A5	CP			$4,4 \times 10^5$			
	CN			$5,4 \times 10^8$			
A6	CP			$3,5 \times 10^7$			
	CN						

Nota: L:Lote;A:Amostra;(---) Não foi possível realizar contagem , concentração alta;CP:Contagem em placas, CN:Contagem em câmara de Neubauer
Fonte: Autoria própria (2022)

5.1.5 *Bacillus megaterium*

A *B. megaterium* tem a capacidade de solubilizar fosfatos de cálcio e da rocha e produzir fosfatase. Só existe um produto registrado no MAPA a base de *B.megaterium* e ele também possui *B.subtilis* na sua composição.

O BiomaPhos® é a primeira tecnologia para a solubilização de fósforo do Brasil. É um inoculante líquido, recomendado para o tratamento de sementes ou aplicação

via jato dirigido no sulco de semeadura.

Quando utilizado via tratamento de sementes ou sulco de semeadura, o BiomaPhos® se associa à planta desde o início da formação das raízes. As bactérias presentes no produto se multiplicam e colonizam a rizosfera da planta. Durante esse processo, as cepas BRM 119 (*B. megaterium*) e BRM 2084 (*B. subtilis*) iniciam a produção de diferentes ácidos orgânicos. Esses ácidos atuam na porção do solo que se encontra em contato com as raízes das plantas, iniciando assim o processo de solubilização do fósforo que está retido ao Cálcio, alumínio e ferro presentes no solo, deixando-o prontamente disponível para a absorção e a assimilação pela planta. Além disso, o BiomaPhos® também atua na mineralização do Fósforo presente na matéria orgânica do solo (fitato), dando maior aporte desse elemento para o cultivo, na tabela 5 está o resultado dos números de Unidades Formadoras de Colônias e de células na câmara de Neubauer de *B. megaterium* em UFC/mL.

Tabela 5 - Resultado dos números de Unidades Formadoras de Colônias e de células na câmara de Neubauer de *B. megaterium*

		L 2	L 3	L 6	L 8	L 9
A1	CP	1,9 x 10 ⁶	1,0 x 10 ⁵	----	3,4 x 10 ⁶	8,8 x 10 ⁶
	CN	1,3 x 10 ⁸	2,3x 10 ⁷	3,3 x 10 ⁸	6,5 x 10 ⁸	6,0 x 10 ⁸
A2	CP				2,8 x 10 ⁶	1,2 x 10 ⁷
	CN				6,4 x 10 ⁸	6,8 x 10 ⁸
A3	CP				3,0 x 10 ⁶	
	CN				5,9 x 10 ⁸	
		L 10	L 11	L 12	L 13	
A1	CP	---	2,8 x 10 ⁵	5,0 x 10 ⁹	----	
	CN	6,6 x 10 ⁸			2,1 x 10 ⁸	
A2	CP	6,1 x 10 ⁶				
	CN	3,9 x 10 ⁷				
A3	CP					

**Nota: L:Lote;A:Amostra;(---) Não foi possível realizar contagem, concentração alta;(----) Contaminação; CP:Contagem em placas, CN:Contagem em câmara de Neubauer
Fonte: Autoria própria (2021)**

A concentração mínima a base de *B. megaterium* e *B. subtilis* é de 4,0 x 10⁹UCF/mL. Analisando a tabela 4, apenas a amostra 1 do lote 12 possui o número mínimo de concentração de células. A amostra 1 do lote 10 não foi possível realizar a

contagem de células pois a concentração estava muito alta para a diluição realizada, a diluição foi de 10^{-7} , possivelmente em uma diluição mais alta onde a contagem de células fosse viável poderia alcançar o número de concentração de células ideal comparado ao valor de concentração mínima de células do produto comercial BiomaPhos®.

5.1.6 *Bacillus thuringiensis*

B. thuringiensis é uma bactéria que produz no momento de sua esporulação inclusões proteicas cristalinas conhecidas por δ -endotoxinas. As mais conhecidas e utilizadas são as toxinas Cry, que formam um cristal proteico durante a fase de esporulação (MONNERAT *et al.*, 2018).

As vantagens da utilização de *B. thuringiensis* são a especificidade aos organismos suscetíveis, o efeito não poluente ao meio ambiente, a inocuidade aos mamíferos e invertebrados e ausência de toxicidade às plantas. *B. thuringiensis* produz diferentes tipos de toxinas: as δ -endotoxinas, α -exotoxina, β -exotoxina, VIP (*vegetative insecticidal proteins*) e SIP (*secreted insecticidal proteins*).

Segundo Monnerat *et al.* (2018) as mais utilizadas são as toxinas Cry, que estão no cristal produzido pela bactéria durante a fase de esporulação. Essas toxinas têm um amplo espectro de ação, sendo tóxicas a insetos de diversas ordens. As toxinas VIP e SIP são produzidas na fase de crescimento vegetativo e atuam sobre insetos das ordens Lepidoptera e Coleoptera. A α -exotoxina apresenta atividade citolítica e é tóxica a ratos e outros vertebrados, e a β -exotoxina, por apresentar efeito teratogênico e mutagênico, não deve ser utilizada como base de produtos comerciais. Além destas, algumas estirpes podem produzir moléculas bioestimuladoras e biofertilizadoras, como fitohormônios, proteínas solubilizadoras de fosfato e sideróforos além de proteínas parasporinas, as quais exibem atividade citotóxica específica contra células cancerígenas de humanos. A ação das toxinas Cry se inicia após a sua ingestão pelos insetos. Os sintomas de intoxicação são a perda do apetite e o abandono do alimento, paralisia do intestino, vômito, diarreia, paralisia total e, finalmente, a morte (MONNERAT *et al.*, 2018).

De acordo com Monnerat *et al.* (2018) as larvas perdem sua agilidade e o tegumento adquire tonalidade de cor marrom-escura. Após a morte, a larva apresenta cor negra, característica das infecções provocadas por este microrganismo. No Brasil, segundo dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) –

existem no mercado vinte e cinco produtos/formulações comerciais à base de *B. thuringiensis* para o controle de pragas agrícolas: Able®, Agree®, Agrofit®, Bac-Control Max EC®, Bac-Control WP®, BTControl®, BT-Turbo Max®, Costar®, Crystal®, Dipel®, Dipel ES-NT®, Dipel WG®, Dipel WP®, Helymax EC®, Helymax WP®, Javelin WG®, Stregga EC®, Super-Bt®, Tarik EC®, Tarik WP®, Thuricide®, Thuricide SC®, Winner Max EC® e Xentari®.

Estes produtos comerciais têm como princípios ativos as estirpes *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* e *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*, que são utilizados no controle de lagartas, como *Helicoverpa armigera* (lagarta-do-algodão), *Anticarsia gemmatilis* (lagarta da soja) *Spodoptera frugiperda* (lagarta-do-cartucho), *Tuta absoluta* (traça-do-tomateiro) e *Plutella xylostella* (traça-das-crucíferas) (MONNERAT *et al.*, 2018). Na tabela 6 está descrito o resultado dos números de Unidades Formadoras de Colônias e de células na câmara de Neubauer de *B. thuringiensis* em UFC/mL.

Tabela 6 - Resultado dos números de Unidades Formadoras de Colônias e de células na câmara de Neubauer de *B. thuringiensis*

		L 8	L 9	L 10	L 11
A1	CP	---	---	3,0 x 10 ⁶	
	CN	7,3 x 10 ⁸	5,4 x 10 ⁸	5,4 x 10 ⁸	
A2	CP	---	1,9 x 10 ⁶		1,8 x 10 ⁶
	CN	7,2 x 10 ⁸	6,1 x 10 ⁸		

Nota: L:Lote;A:Amostra;(---) Não foi possível realizar contagem , concentração alta;CP:Contagem em placas, CN:Contagem em câmara de Neubauer

Fonte: Autoria própria (2022)

Entre os 20 produtos comerciais registrados a base de *B. thuringiensis*, o produto de menor concentração exigida é o Agree® com 1,0 x 10⁹UFC/mL e o de maior concentração é o BT-Turbo Max® com a concentração de 3,0 x 10¹⁰ UFC/mL.

Analisando a tabela 6, em nenhum dos lotes possuem amostras com a concentração mínima exigida comparada com os produtos de *B. thuringiensis* registrados.

A função primordial de uma formulação para produtos biológicos é preservar o ingrediente ativo vivo, conferindo vida de prateleira ao produto. Especificamente para o *B. thuringiensis*, a formulação deve ser capaz de preservar a δ-endotoxina, que é uma glicoproteína. Concomitantemente, deve facilitar o armazenamento e transporte, melhorar a aplicação, aumentar o poder residual após a aplicação e, em decorrência,

a eficiência de controle. Via de regra, as formulações são segredos industriais e muito pouca informação encontra-se disponível, não obstante muitas vezes a formulação é a etapa mais cara do processo de produção podendo superar 50% do custo final do produto (MONNERAT *et al.*, 2018).

A falta do controle sobre o tempo de vida de prateleira (*Shelf life*) da *B. thuringiensis* pode ser o que resultou nos resultados tão baixos da concentração mínima de células.

5.1.7 *Bacillus aryabhatai*

A espécie *B. aryabhatai* foi isolada e identificada pela primeira vez de criotubos usados para coletar amostras de ar da estratosfera da Terra a uma altitude entre 27 e 41 km em 2009 (SHIVAJI *et al.*, 2009). É uma bactéria gram positiva, de formato bastonete, formação de endósporos, e com colônias de 5 a 8 mm de diâmetro. Desde então, algumas estirpes foram isoladas na rizosfera em vários lugares do mundo. A ação promotora de crescimento desta bactéria foi relatada inicialmente em *Xanthium italicum*, na Coréia do Sul (LEE *et al.*, 2018).

No Brasil, a bactéria promoveu o crescimento do milho sob estresse hídrico devido a sua capacidade de formar um biofilme e produção de exopolissacarídeos que protegem a planta contra o impacto da falta de água (KAVAMURA, 2012). Na tabela 7 está registrado o resultado dos números de Unidades Formadoras de Colônias e de células na câmara de Neubauer de *B. aryabhatai* em UFC/mL.

Tabela 7 - Resultado dos números de Unidades Formadoras de Colônias e de câmara de Neubauer de *B. aryabhatai*

		L10	L 11	L 12	L14
A1	CP	---	6,3 x 10 ⁶	2,1 x 10 ⁷	1,4 x 10 ⁷
	CN	4,8 x 10 ⁸			2,5 x 10 ⁸
A2	CP	3,5 x 10 ⁷		4,3 x 10 ⁶	
	CN	5,7 x 10 ⁸			
A3	CP			6,6 x 10 ⁹	
	CN				

Nota: L:Lote;A:Amostra;--- Não foi possível realizar contagem, concentração alta;CP:Contagem em placas, CN:Contagem em câmara de Neubauer

Fonte: Autoria própria (2022)

Auras[®] é um produto comercial a base de *B. aryabhatai* registrado no MAPA que sua concentração mínima é de 1×10⁸ UFC/mL. Analisando a tabela 7, nos lotes 10,12 e 14 possuem amostras dentro do mínimo da concentração exigida comparadas

ao produto comercial Auras[®]. Ou seja, três dos quatro lotes analisados possuem concentração mínima de células dentro do esperado comparado com o produto comercial Auras[®].

5.2 Bioinseticidas e inoculantes que não são do gênero bacillus

As bactérias que não são do gênero *Bacillus* em geral não formam esporos e a fases de crescimento delas é diferente. As fases de crescimento das bactérias são: fase lag, fase log, fase estacionária e fase de morte celular. Na fase lag é onde ocorre intensa atividade de preparação para o crescimento populacional, mas sem aumento da população. O aumento logarítmico ou exponencial da população ocorre na fase log. A terceira fase é a fase estacionária que é um período de equilíbrio, as mortes microbianas são equilibradas pela produção de novas células.

A última fase é a fase de morte celular onde a população reduz em uma taxa logarítmica (CUNHA *et al.*, 2020).

Uma das dificuldades da análise das amostras era sobre o tempo de armazenamento das amostras, como o acesso a essa informação era restrito ficava inviável saber em qual fase de crescimento das bactérias estavam. Isso justifica alguns números baixos nas contagens de células, principalmente das bactérias que não são do gênero *Bacillus*, pois não produzem esporos e ocorre a morte celular delas.

5.2.1 *Pseudomonas fluorescens*

Segundo Astori (2018) a produção de inoculantes de baixo custo com rizobactérias é uma alternativa para diminuir os riscos ambientais causados pela utilização inadequada, e às vezes, excessiva de insumos e agrotóxicos. Estas rizobactérias habitam a rizosfera (região do solo sob influência das raízes). Este autor propõe também que a bactéria *P. fluorescens*, apresenta-se como uma alternativa relevante para o aumento da disponibilidade de fósforo necessário para as culturas, reduzindo o custo da adubação química além de reduzir também danos ambientais.

Alguns estudos avaliaram linhagens de *P. fluorescens* no crescimento de plantas e patógenos, por exemplo, Schultz *et al.* (2012) relataram que *P. fluorescens* UM270, produziu atividade antifúngica e promotora de crescimento de plantas.

Recentemente Santos *et al.* (2015) relataram que 13-tetradecadien-1-ol, 2-butanona e 2-metil-n-1-tricedeno, produzidos por *P. fluorescens* SS101, aumentou o

resultado dos números de Unidades Formadoras de Colônias e de células na câmara de Neubauer de *P. fluorescens* em UFC/mL.

Tabela 8 - Resultado dos números de Unidades Formadoras de Colônias e de células na câmara de Neubauer de *P. fluorescens*

		L 1	L 5	L 6	L 10	L 14
A1	CP	$5,4 \times 10^4$	$1,6 \times 10^6$	$3,3 \times 10^7$	$2,9 \times 10^7$	$3,8 \times 10^9$
	CN	$7,9 \times 10^6$	$5,0 \times 10^6$	$4,1 \times 10^8$	$6,0 \times 10^8$	$2,3 \times 10^8$
A2	CP		$3,1 \times 10^8$		----	
	CN		$2,3 \times 10^7$			
A3	CP		$3,1 \times 10^6$			
	CN		$2,1 \times 10^7$			
A4	CP	$3,2 \times 10^8$				
	CN	$1,2 \times 10^7$				
A5	CP	$3,8 \times 10^6$				
	CN	$1,7 \times 10^7$				

Nota: L:Lote;A:Amostra;(---) Não foi possível realizar contagem ,
concentração alta;CP:Contagem em placas,
CN:Contagem em câmara de Neubauer

Fonte: Autoria própria (2022)

Existe um produto comercial a base de *P. fluorescens* , Accelerate® se sua concentração é de 1×10^7 bactérias ml^{-1} , na dosagem de 0,125 L/25 kg de sementes.

Analisando a tabela entre os valores que são viáveis do crescimento das células de *P. fluorescens*, os lotes 5, 6, 10 e 14, ou seja, dos cinco lotes analisados quatro possuem valores dentro do estimado.

Comparando a concentração de células mínimas de *P. fluorescens* com os demais inoculantes registrados no mapa, sua concentração mínima é a mais baixa exigida, o que garante ao produtor uma melhor rentabilidade na aplicação do produto.

A produção de *P. fluorescens* ainda está sendo bastante analisada e discutida, mas é uma alternativa muito boa para os produtores.

5.2.2 *Sacchoropolyspora spinosa*

Spinosad é o primeiro representante do grupo de inseticidas chamadas spinosinas, que são produtos naturais com estrutura única, ele é conhecido como Natulyte®, que originalmente foi produzido pela fermentação de uma bactéria de solo, *S. spinosa* composto principalmente por duas moléculas, spinosinas A (85%) e D (15%). O inseticida possui efeito em uma grande variedade de insetos pragas, especialmente das ordens Diptera e Lepidoptera (DOURADO, 2009). Na tabela 9 está descrito o resultado dos números de Unidades formadoras de Colônias

e de células na câmara de Neubauer de *S. spinosa* em UFC/mL.

Tabela 9 - Resultado dos números de Unidades Formadoras de Colônias e de células na câmara de Neubauer de *S. spinosa*

		L1	L6	L 8	L 10	L 12
A1	CP	$2,0 \times 10^3$	$1,9 \times 10^7$	--	$2,9 \times 10^7$	$2,9 \times 10^7$
	CN	$7,2 \times 10^8$	$4,6 \times 10^8$	$6,1 \times 10^8$	$6,0 \times 10^8$	
	CP	$9,0 \times 10^4$			--	
A2	CN	$7,2 \times 10^8$			$3,8 \times 10^8$	

Nota: L: Lote; A: Amostra; (---) Não foi possível realizar contagem, concentração alta; CP: Contagem em placas, CN:Contagem em câmara de Neubauer
Fonte: Autoria própria (2022)

O único produto comercial registrado a base de *s.spinosa* é em formato de pastilha para aplicar na água e não é líquido e sua concentração não é em UFC/mL e sim em CLKU/mg. Como não tem um valor em UFC do produto comercial para comparar os resultados da *s.spinosa*, a comparação foi realizada com os outros bioinseticidas, como por exemplo o *P. fluorescens* que sua concentração é 1×10^7 g/mL. Comparando com a concentração do *P. fluorescens* todos os lotes de *s.spinosa* possuem o mínimo de concentração de células exigido.

Na amostra 1 e 2 do lote 1 a contagem em placas foi baixa e no lote 8 e 10 teve amostras que não tiveram crescimento nenhum de colônias.

Na produção *onfarm* um dos desafios é a padronização do tempo de incubação dos microrganismos, e também os meios de cultura podem não ser apropriados e a mudança de fornecedores diferentes das matérias primas pode interferir na multiplicação dos microrganismos.

Bocatti *et al.* (2022) fizeram uma pesquisa em uma empresa *onfarm* onde eles afirmam que em muitos casos, a fonte de carbono no meio de cultura usado para produção na fazenda não é apropriada. Por exemplo, o uso de sacarose fornecida como melaço para o crescimento de *Bradyrhizobium* não é apropriado, pois as fontes de carbono preferidas são glicerol ou manitol.

5.2.3 *Chromobacterium subtsugae*

C. subtsugae é usada na agricultura como controle biológico de pragas, por possuir atividade tóxica para algumas ordens de insetos, tais como: Coleoptera (besouros), Diptera (moscas), Hemiptera (cigarrinhas e pulgões) e Lepidoptera (mariposas e borboletas) (FONTES *et al.*, 2020).

No Brasil foi registrado no MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) em 2014 um produto comercial à base de *C. subtsugae* Grandevo®, pelas empresas Kooort do Brasil Holdina Ltda e Prophvto Comércio e Serviços Ltda, tornando assim legalizado a comercialização do produto a base da *C. subtsugae*.

O único produto comercial registrado no Brasil o Grandevo® não é divulgado o número da sua concentração mínima de células viáveis. Na apresentação do produto contém outra unidade de medida da sua concentração: 1000 CLKU/mg. Na tabela 10 está o Resultado dos números de Unidades Formadoras de Colônias e de células na câmara de Neubauer de *C. subtsugae* em UFC/mL.

Tabela 10 - Resultado dos números de Unidades Formadoras de Colônias e de células na câmara de Neubauer de *C. subtsugae*
(continua)

		L 1	L 2	L 3	L 4	L 6
A1	CP	$1,0 \times 10^6$	$1,9 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$2,3 \times 10^7$
	CN	$5,1 \times 10^7$	$5,3 \times 10^7$	$3,5 \times 10^7$	$1,6 \times 10^7$	$4,1 \times 10^8$
A2	CP	$1,9 \times 10^6$			$1,0 \times 10^4$	
	CN	$6,7 \times 10^7$			$9,3 \times 10^7$	
A3	CP				$2,1 \times 10^4$	
	CN				$6,7 \times 10^7$	
A5	CP					
	CN					
A6	CP					
	CN					
A7	CP					
	CN					
A8	CP					
	CN					
A9	CP					
	CN					

Tabela 10- Resultado dos números de Unidades Formadoras de Colônias e de células na câmara de Neubauer de *C. subtsugae* (conclusão)

		L 9	L 11	L 12	L 13	L 14
A1	CP	---	$1,9 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$	$2,0 \times 10^9$	$1,2 \times 10^8$
	CN	$5,7 \times 10^8$			$5,2 \times 10^8$	$6,2 \times 10^8$
A2	CP	$2,3 \times 10^7$	$2,6 \times 10^6$	$1,8 \times 10^7$	$2,6 \times 10^8$	$2,5 \times 10^9$
	CN	$1,4 \times 10^7$			$6,2 \times 10^8$	$2,4 \times 10^8$
A3	CP	$7,3 \times 10^8$	$1,5 \times 10^6$	$2,1 \times 10^6$	$2,1 \times 10^7$	
	CN	$7,7 \times 10^8$			$3,5 \times 10^8$	
A4	CP		$1,5 \times 10^6$		$2,2 \times 10^6$	
	CN				$2,1 \times 10^8$	
A5	CP				---	
	CN				$2,2 \times 10^8$	
					$3,1 \times 10^7$	
A6	CP					
	CN				$2,1 \times 10^8$	
A7	CP				$4,0 \times 10^9$	
	CN				$2,6 \times 10^8$	
A8	CP				$2,0 \times 10^9$	
	CN				$2,4 \times 10^8$	
A9	CP				---	
	CN				$2,4 \times 10^8$	

Nota: L:Lote;A:Amostra;(---) Não foi possível realizar contagem ,
concentração alta;CP:Contagem em placas,
CN:Contagem em câmara de Neubauer

Fonte: Autoria própria (2022)

Como não tem registrado a concentração mínima de células da *C. subtsugae* será utilizado como valor de comparação a concentração mínima do bioinseticida *B. thurginiensis* que é de $1,0 \times 10^9$ UFC/ml. Analisando a tabela 12, somente nos lotes 13 e 14 possuem amostras com a concentração mínima de células esperadas.

A baixa concentração de células pode ser explicada por vários fatores, o fator de não saber quanto tempo as amostras estavam armazenadas antes de serem analisadas, a falta de controle de temperatura na empresa *onfarm* e também não foi possível identificar em qual fase de crescimento as bactérias estavam.

Bocatti *et al.* (2022) corrobora sobre a questão da falta de padronização no tempo de incubação é outro problema nas amostras colhidas da produção *on farm*.

Neste trabalho o enfoque na produção foi da bactéria *C. subtsugae*, porque o

número de amostras analisadas dela foi um número considerado e foram poucas que atingiram o mínimo de concentração de células exigida, e por existir pouquíssimas publicações sobre o processo fermentativo desta bactéria.

5.2.4 *Azospirillum brasiliense*

O gênero *Azospirillum* é membro de um grupo filogenético subgrupo na subclasse de Proteobacteria. Compreende bactérias diazotróficas de vida livre capazes de colonizar tecidos internos e externos das raízes das plantas. *Azospirillum* é um dos gêneros mais estudados dentro das rizobactérias promotoras de crescimento vegetal devido à sua capacidade de melhorar o crescimento e o rendimento de grãos de muitas agronomicamente culturas importantes. *A. brasiliense* estão distribuídos em todo o mundo e foram isolados da superfície da raiz e rizosfera de várias plantas, incluindo cereais, gramíneas e cactos na tabela 11 estão os resultados dos números de Unidades Formadoras de Colônias e de células na câmara de Neubauer de *A. brasiliense* em UFC/mL.

Tabela 11 - Resultado dos números de Unidades Formadoras de Colônias e de células na câmara de Neubauer de *A. brasiliense*

		L1	L2	L3	L6
A1	CP	$6,9 \times 10^4$	---	$1,2 \times 10^7$	$5,1 \times 10^7$
	CN	$1,9 \times 10^7$	$9,2 \times 10^7$	$2,1 \times 10^7$	$4,2 \times 10^8$
A2	CP		$2,0 \times 10^6$	$2,1 \times 10^5$	
	CN		$8,4 \times 10^7$	$4,4 \times 10^6$	
A3	CP		$8,3 \times 10^5$	$2,2 \times 10^5$	
	CN		$7,0 \times 10^7$	$2,7 \times 10^7$	
A4	CP		$1,6 \times 10^6$		
	CN				
		L 9	L 10	L 13	L 14
A1	CP	---	$3,4 \times 10^6$	$1,4 \times 10^9$	$4,6 \times 10^9$
	CN	$5,9 \times 10^8$	$6,2 \times 10^8$	$1,9 \times 10^8$	$3,0 \times 10^8$
A2	CP		$7,2 \times 10^6$		$2,9 \times 10^9$
	CN		$5,9 \times 10^8$		$4,3 \times 10^8$
A3	CP		$6,4 \times 10^6$		
	CN		$6,8 \times 10^8$		

Nota: L:Lote;A:Amostra;--- Não foi possível realizar contagem ,
concentração alta;CP:Contagem em placas,
CN:Contagem em câmara de Neubauer
Fonte: Autoria própria (2022)

Como descrito anteriormente segundo a instrução normativa do MAPA (2011) os produtos que contenham bactérias fixadoras de nitrogênio para simbiose com leguminosas deverão apresentar concentração mínima de $1,0 \times 10^9$ Unidades

Formadoras de Colônias (UFC) por grama ou mililitro de produto, mantendo a garantia registrada até a data de seu vencimento., e inoculantes a base de *A. brasiliense* devem ter concentração mínima de 1×10^8 células/g ou mL de inoculante.

Existem diversos inoculantes comerciais a base de *A. brasiliense*, entre eles: Azokop® , Rizospirillum®, BiomaMais®, Biocompost®, Biogain®, Inoculante Grap NodAL®, Azomil®, Fixaron Azos®, Simbiose Maiz®.

A maioria destes produtos tem a concentração mínima de células de 2×10^8 UFC/mL, com exceção do BiomaMais® que possui a concentração de $4,0 \times 10^8$ UFC/mL.

Analisando a tabela 8, dos oito lotes analisados sete possuem amostras de *A. brasiliense* com a concentração de células mínima exigida comparado aos produtos comerciais e nos lotes 13 e 14 possui amostras com concentração de células dentro do esperado pelo MAPA.

5.3 Biofungicidas

Os Biofungicidas possuem uma dificuldade maior de serem produzidos no sistema *onfarm*, pois os fungos requerem um pH mais ácido mais o menos 3,5, o meio de cultura requer mais nutrientes, demoram mais tempo para a multiplicação entre 72 horas a 96 horas por causa da formação dos conídios, eles ficam menor tempo na prateleira ou seja menos tempo de armazenagem (CUNHA *et al.*, 2020).

Segundo Cunha *et al.* (2020) apesar das desvantagens de sua produção em sistema *onfarm*, eles também possuem vantagens como: produção em larga escala, maior produção de metabólitos , menor mão-de-obra por causa da maior automatização, menor exigência de estrutura física e menor custo de produção.

5.3.1 *Trichoderma harzianum*

Os biofungicidas à base de *Trichoderma* são utilizados no Brasil para as culturas da soja, algodão, milho, feijão, morango, citros, cana-de-açúcar, café, tabaco, hortaliças, ornamentais, frutíferas e espécies florestais. Em diversas situações produtos à base de *Trichoderma* são utilizados para promoção de crescimento. Inclusive no Brasil tem um produto registrado com esta finalidade.

O primeiro registro de um produto comercial à base de *Trichoderma* foi em 2006 (ABBAS *et al.*, 2017). Em 2008 produtos à base de *Trichoderma* foram aplicados

em aproximadamente 600.000 ha de soja para o controle do mofo branco causado por *Sclerotinia sclerotiorum*. A importância de produtos à base de Trichoderma para o Brasil, pode ser avaliada pela área tratada já em 2010 que foi superior a 1,2 milhões, tendo chegado a mais de 5 milhões de ha em 2015. Analisando os biofungicidas à base de Trichoderma, no ano 2019, o número total de produtos registrados no Mapa, à base de espécies deste bioagente, foi de 21. Destes, 66% dos produtos registrados são a base de *T. harzianum* (MEYER *et al.*, 2019). Na tabela 12 está registrado o Resultado dos números de Unidades Formadoras de Colônias e de células na câmara de Neubauer de *T. harzianum* em UFC/mL.

Tabela 12 - Resultado dos números de Unidades Formadoras de Colônias e de células na câmara de Neubauer de *T. Harzianum*

		(continua)			
		L5	L6	L9	L10
A1	CP	$1,4 \times 10^7$	$8,1 \times 10^6$	$3,9 \times 10^6$	$5,1 \times 10^5$
	CN	$8,7 \times 10^6$	$3,5 \times 10^8$	$6,9 \times 10^8$	$5,9 \times 10^8$
A2	CP	---	$2,6 \times 10^6$	$1,9 \times 10^6$	$2,7 \times 10^7$
	CN	$8,0 \times 10^7$	$1,3 \times 10^9$	$6,2 \times 10^8$	$5,7 \times 10^8$
A3	CP	$3,5 \times 10^8$			$4,9 \times 10^6$
	CN	$1,4 \times 10^8$			$4,3 \times 10^8$
A4	CP	$3,7 \times 10^8$			
	CN	$1,4 \times 10^8$			
A5	CP	$2,4 \times 10^8$			
	CN	$1,4 \times 10^8$			
A6	CP	---			
	CN	$1,7 \times 10^8$			
A7	CP	$2,6 \times 10^6$			
	CN	$7,6 \times 10^7$			
A8	CP	$2,2 \times 10^8$			
	CN	$6,9 \times 10^7$			
A9	CP	$3,8 \times 10^7$			
	CN	$3,9 \times 10^7$			

Tabela 12- Resultado dos números de Unidades Formadoras de Colônias e de células na câmara de Neubauer de *T. harzianum* (conclusão)

		L11	L12	L13	L14
A1	CP	4,0 x 10 ⁸	3,2 x 10 ⁶	3,0 x 10 ⁶	---
	CN			6,0 x 10 ⁸	5,6 x 10 ⁸
A2	CP		1,9 x 10 ⁹	---	
	CN			2,3 x 10 ⁸	
A3	CP		---	1,3 x 10 ⁹	
	CN			2,1 x 10 ⁸	
A4	CP			1,4 x 10 ⁶	
	CN			2,7 x 10 ⁸	
A5	CP			2,3 x 10 ⁹	
	CN			2,4 x 10 ⁸	
A6	CP				
	CN				
A7	CP				
	CN				
A8	CP				
	CN				
A9	CP				
	CN				

**Nota: L:Lote;A:Amostra;(---) Não foi possível realizar contagem, concentração alta; CP:Contagem em placas, CN:Contagem em câmara de Neubauer
Fonte: Autoria própria (2022)**

Dos 15 produtos comerciais à base de *T. harzianum* registrados no MAPA a concentração mínima de células deles varia entre 1,0 x 10⁷UFC/mL que é o Natucontrol® até 1,5 x 10¹⁰ UFC/mL que é o Quality®.

Analisando a tabela 14, dentro das concentrações mínimas registradas, todos os lotes de *T. harzianum* possuem amostras com a concentração mínima esperada.

Segundo Steffan *et al.* (2019) para as condições ótimas de crescimento de *T. harzianum*, o fungo deve ter um crescimento em ótimas condições, o meio de cultura deve ser rico em fontes de carbono e glicose. O meio de cultura utilizado para o crescimento do *T. harzianum*, foi o YPD, que é rico em carbono e glicose, isso pode ser uma das causas do sucesso do seu ótimo crescimento.

5.3.3 *Beauveria bassiana*

B. bassiana foi descrita no início do século XIX como agente causal da doença muscardina branca do bicho-da-seda. Isso demonstrou pela primeira vez que microrganismos podem ser os agentes causadores de doenças. Desde a descrição deste fungo, têm sido usados e estudados para o controle biológico de insetos-praga (VALERO *et al.*, 2014). *B. bassiana* é um fungo ascomiceto cosmopolita que é capaz de habitar uma ampla gama de ambientes, incluindo solo, insetos e plantas. O fungo é capaz de viver como saprófita no solo, como endofítico em plantas, ou como um entomopatógeno que afeta uma ampla gama de artrópodes (BOOMSMA *et al.*, 2014). Na tabela 13 está o resultado dos números de Unidades Formadoras de Colônias e de células na câmara de Neubauer de *B. bassiana* em UFC/mL.

Tabela 13 - Resultado dos números de Unidades Formadoras de Colônias e de células na câmara de Neubauer de *B. bassiana*

L 13		
A1	CP	----
	CN	2,2 x 10 ⁸

**Nota: L:Lote;A:Amostra;(---) Contaminação;
CP:Contagem em placas, CN:Contagem em câmara de Neubauer
Fonte: Autoria própria (2022)**

Existem 6 produtos comerciais registrados a base de *B. bassiana* com as respectivas concentrações mínimas de células: Metie® (1,0x10⁹), Bometil® (4,3x10⁸), Beauve control® (2,0x10⁹), Balvéria® (1,0x10⁹) e Bolverilevo® (2,0x10⁹) e Beauveria JCO ®0,6 x 10⁹ UFC/mL.

Analisando a tabela 10 só tem apenas uma amostra de *B. bassiana* e a contagem em placas não foi viável pois ocorreu contaminação, somente a contagem em câmara de Neubauer foi viável e comparado com a concentração dos produtos comerciais a amostra do lote 13 não se enquadra na concentração mínima.

Porém no lote que a amostra da *B. bassiana* foi analisada foi o lote em que teve mais contaminação cruzada, por isso foi feita uma análise deste lote, e a baixa concentração pode ser explicada por causa da contaminação que ocorreu.

Segundo Bocatti *et al.* (2022) quando ocorre contaminação vários outros contaminantes micribianos dominam o meio de cultura por apresentarem tempos de geração mais curtos, ou seja, maiores taxas de crescimento do que o microrganismo alvo.

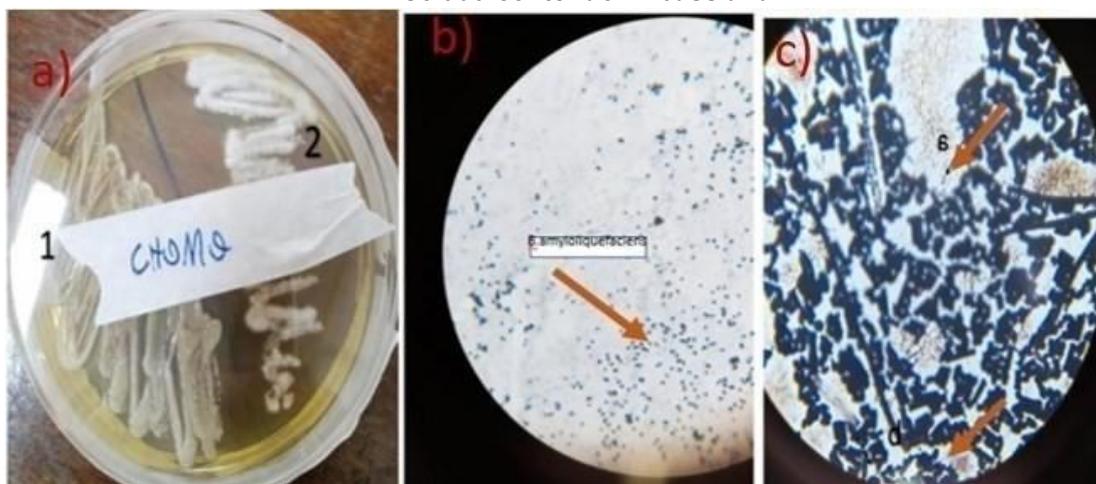
6 ANÁLISE DAS CONTAMINAÇÕES

No cotidiano da fabricação de produtos biotecnológicos que envolvam células viáveis e meios de cultivo em condições ideais de crescimento é frequente a ocorrência de contaminações. A estrutura de produção, incluindo a construção, e os equipamentos assim como os protocolos de trabalho devem ser elaborados de modo a inibir a contaminação da produção quer seja por agentes externos ou contaminações cruzadas inerentes ao processo. Apesar de todos os cuidados as contaminações acontecem e, neste caso, é fundamental estar atento ao controle de qualidade para evitar que o produto contaminado seja comercializado ou aplicado (ABRUNHOSA, 2019).

Segundo Abrunhosa (2019) uma vez observada a presença da contaminação, trabalhar na identificação dos microrganismos contaminantes é primordial para identificar a origem e tomar ações corretivas a fim de evitar a contaminação de novos lotes.

Neste estudo, alguns lotes apresentaram contaminações e o lote 13 foi selecionado para análise e apresentação dos dados. O lote escolhido foi o lote 13 pois foi um lote que teve um número elevado de contaminações, contendo 23 amostras e espécies de microrganismos das quais cinco apresentaram contaminação. À primeira amostra analisada, foi a amostra 2 contendo *C. Subtsugae* (fig3).

Figura 3 - a) *C. subtsugae* isolada; b) Parte 1 isolada contendo *B. amyloliquefaciens*, c) Parte 2 isolada contendo *B. bassiana*.



Fonte: Autoria própria (2021)

A amostra 2, conforme demonstrada na figura 3(a), foi isolada em duas partes, uma parte de aspecto leitoso e outra parte de aspecto aveludado. Na parte 1,

foi realizada a coloração de gram e depois foi observada no microscópio, e possibilitando a identificação da bactéria gram-positiva *B.amyloliquefaciens* (Fig 3,b).

Através do teste de coloração de gram,a bactéria isolada foi identificada como *B.amyloliquefaciens* pois a coloração ficou roxa, e a *B.amyloliquefaciens* é uma bactéria gram-positiva e as bactérias gram positivas ficam com a coloração roxa pois ficam da cor do corante cristal violeta.

As bactérias gram positivas são formadas por múltiplas camadas de peptidoglicano, ácidos teicóicos e fosfato. Já as bactérias gram negativas possuem uma ou poucas camadas de peptidoglicano, com ligações a lipoproteínas. Devido à pouca quantidade de peptidoglicano na membrana, ela fica mais suscetível ao rompimento mecânico. Possui carga negativa forte, o que evita fagocitose, e são consideradas mais nocivas ao ser humano por estimularem a resposta imunitária, e por isso que no teste de coloração de gram as bactérias gram negativas ficam com a coloração mais voltado para o rosa, por conta do corante fucsina ou safranina (MADIGAN, 2016; TORTORA, 2012).

Além do teste de coloração de gram, o formato da bactéria identifica é semelhante a *B.amyloliquefaciens*, formato de bastonete (LISBOA, 2006).

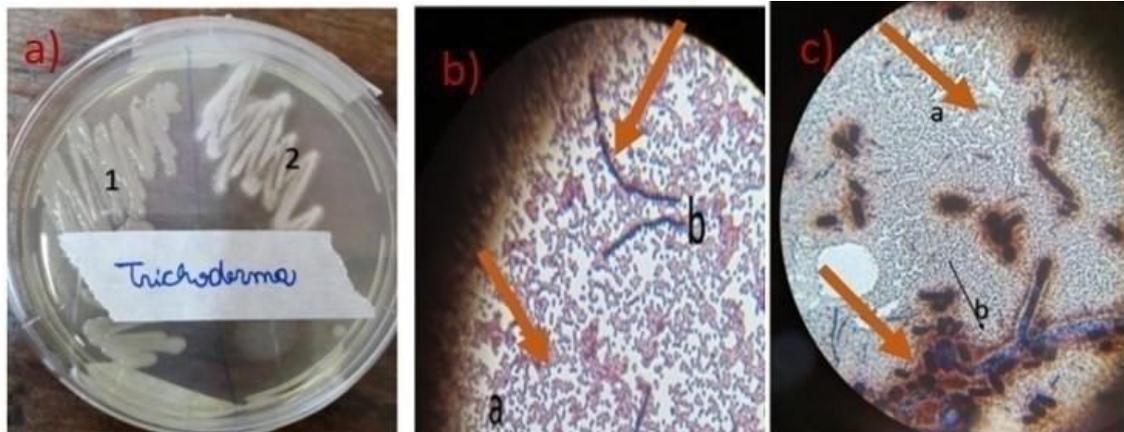
Na parte 2 isolada de *C. subtsugae* identificado mais um microrganismo, a *B. bassiana* como mostra a figura 3(c).

Na figura 3(b), tem duas setas indicando os microrganismos, a seta indicada pela letra A foi identificada como a *B.amyloliquefaciens* e a seta B o fungo *B. bassiana*. Na seta B indicada na figura ficou uma coloração bem escura, na hora do preparo da lâmina deve ter ficado muito próximo ao bico de Bunsen e acabou escurecendo muito a lâmina.

Mas analisando a morfologia do fungo, têm filamentos e sua morfologia é imperfeita, se reproduz através dos conídeos. Os conídios têm uma superfície lisa e hialina, elipsóide globosa com uma espinha ondulada. Os conidióforos são agrupados de forma compacta, constituindo os cinemas onde os conídios se originam (MEYER *et al.*, 2022).

A segunda amostra a ser analisada foi a amostra 3 que contém o fungo *Trichoderma*, o seu crescimento na placa tem um aspecto aveludado parecido com a *B. bassiana*. E também teve o crescimento com aspecto viscoso,como na amostra 2.

Figura 4 -a)Trichoderma isolado em duas partes,b)Parte 1 isolada contendo *C. subtsugae* ou *Azospirillum ssp*,c)Parte 2 isolada contendo *B. megaterium* e Trichoderma.



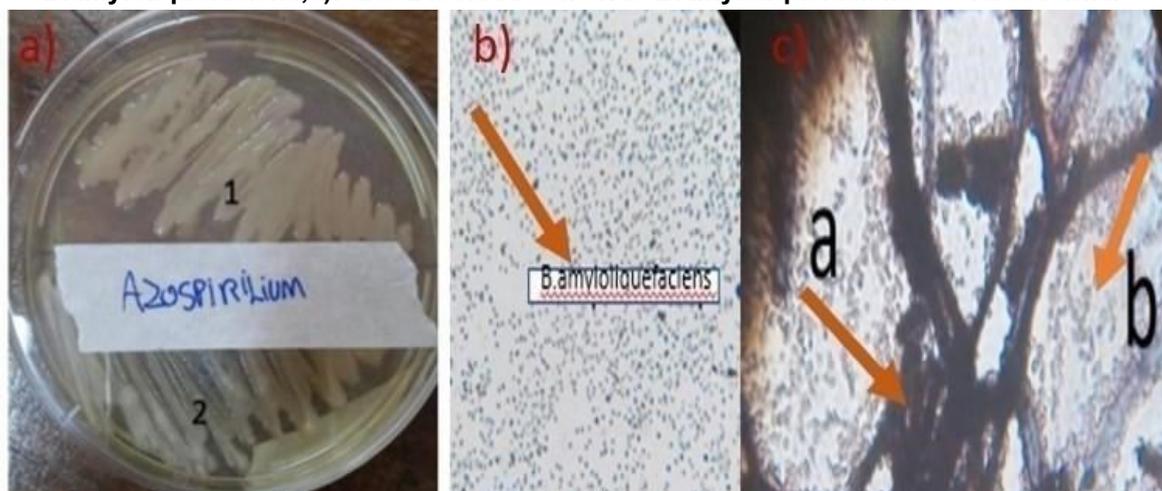
Fonte: Autoria própria (2021)

A parte 1 foi isolada e identificada dois microrganismos (Figura 4;b).Analisando o aspecto morfológico do microrganismo apontado na seta A, pode ser identificado tanto como a *C. subtsugae* quanto o *Azospirillum ssp*, ambos são bactérias gram-negativas em forma de bastonetes.

E o microrganismo indicado na seta B, possui a aparência morfológica da bactéria gram positiva *B. megaterium*.

Na parte 2 isolada como mostra na figura 4(c), dois microrganismos foram isolados também,o microrganismo indicado na seta A,também é *B. megaterium* e o microrganismo indicado na seta B parece o fungo *Trichoderma*, que sua morfologia é similar com o da *B. bassiana*,com filamentos e conídios.A terceira amostra a ser analisada foi a amostra 8,*A. brasiliense*.

Figura 5 - a) *A. brasiliense* isolado em 2 partes ,b)Parte 1 isolada contendo *B.amyloliquefaciens*,c)Parte 2 isolada contendo *B.amyloliquefaciens* e o Trichoderma.



Fonte: Autoria própria (2021)

Na primeira parte isolada foi identificado a bactéria *B.amyloliquefaciens*, como mostra na figura 5(b). Na segunda parte do *A. brasiliense* isolado, foi identificado dois microrganismos, indicado na seta A o fungo *Tricoderma* e já na seta B a bactéria *B.amyloliquefaciens* como mostra a figura 5(c). A terceira amostra analisada foi a amostra 10, a bactéria *B.amyloliquefaciens*, ela foi isolada em três partes, pois as colônias cresceram com aspecto diferente em cada uma.

Figura 6 -a) Bactéria *B.amyloliquefaciens* isolada em três partes, b)Primeira parte isolada contendo *B. bassiana*, c)Segunda parte isolada contendo *B. bassiana* e *B.amyloliquefaciens* , d)Terceira parte isolada contendo o próprio microrganismo *B.amyloliquefaciens*



Fonte: Autoria própria (2021)

Conforme a figura 6(a) a parte 1 o seu crescimento na placa apresentou aspecto aveludado, a parte 2 um pouco viscosa mas também com o aspecto aveludado e já a parte 3 aspecto mais claro e consistente.

Após o isolamento da *B.amyloliquefaciens* foi realizado a técnica de coloração de gram, e na primeira parte isolada foi identificado o fungo *Beauveria bassiana* como mostrado na figura 6(b). Na seta indicada da cor laranja escura pode-se observar uma estrutura reprodutiva do fungo que se chamada conídeos.

Na parte 2 isolada do *B.amyloliquefaciens*, após a técnica de coloração de gram e a análise no microscópio óptico, foi identificado o próprio microrganismo *B.amyloliquefaciens* e o fungo *B. bassiana* como mostra a figura 6(c).

Na parte 3 isolada de *B.amyloliquefaciens* o próprio microrganismo foi identificado após a coloração e a observação no microscópio óptico, isso pode ser observado na figura 6(d).

A quarta amostra analisada foi a amostra 13 de *B. megaterium*, foi isolado em duas partes, duas partes que tiveram o crescimento em placa diferenciado um do outro, a parte 1 com a consistência viscosa e a parte 2 menos viscosa.

Figura 7 - a) *B. megaterium* isolada em duas partes, b) Parte 1 isolada contendo o próprio microrganismo *B. megaterium*, c) Parte 2 isolada contendo *B. amyloliquefaciens*.

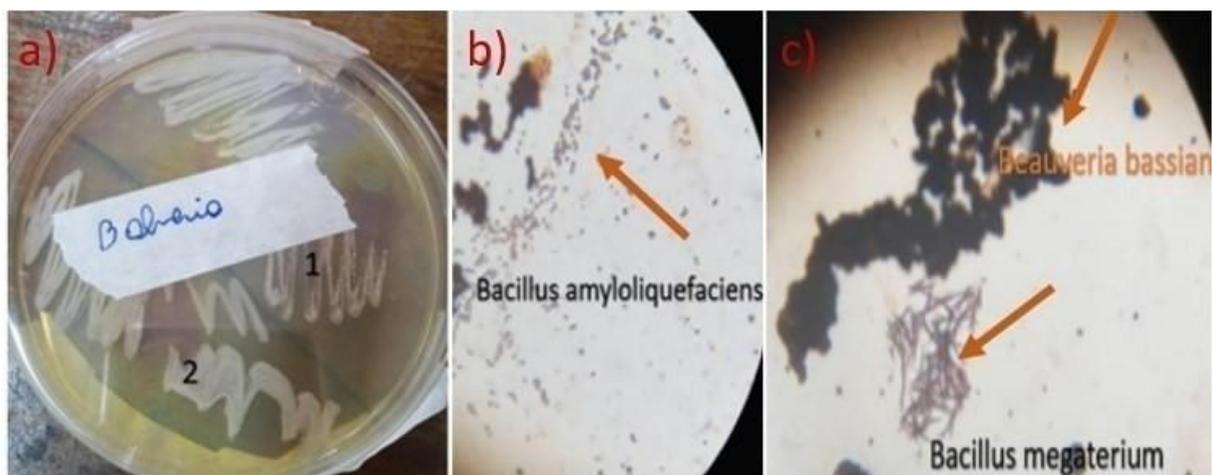


Fonte: Autoria própria (2021)

Na parte 1, figura 7(b) foi identificado o próprio microrganismo mesmo o *B. megaterium*, que é uma bactéria gram-positiva, em forma de bastão, geralmente dispostas em pares ou cadeias, o tamanho das suas células vegetativas são grandes e também seus esporos são grandes (FONSECA, 2008).

Na parte 2, figura 7(c) isolada de da *B. megaterium* foi identificada a *B. amyloliquefaciens*. A quinta amostra a ser analisada foi a amostra 12 contendo o fungo *B. bassiana*.

Figura 8 - a) *B. bassiana* isolada em duas partes, b) Parte 1 isolada contendo *B. amyloliquefaciens*, c) Parte 2 isolada contendo *B. megaterium*.



Fonte: Autoria própria (2021)

A primeira parte isolada foi identificado a bactéria *B.amyloliquefaciens* figura 8(b). Na parte 2 isolada de *B. bassiana* foi identificado a *B.megaterium* e o próprio fungo *B. bassiana* Figura 8(c).

Quadro 4 - Resumo das contaminações detectadas no lote 13

Amostra contaminada analisada	Contaminação localizada
2. <i>C. subtsugae</i>	<i>B.amyloliquefaciens</i> e <i>B. bassiana</i>
3. <i>Tricoderma</i>	<i>A. brasiliense</i> e <i>B.megaterium</i>
8. <i>A. brasiliense</i>	<i>B.amyloliquefaciens</i> e <i>Tricoderma</i>
10. <i>B.amyloliquefaciens</i>	<i>B. bassiana</i>
12. <i>B. bassiana</i>	<i>B.amyloliquefaciens</i> e <i>B.megaterium</i>
13. <i>B. megaterium</i>	<i>B.amyloliquefaciens</i>

Fonte: Autoria própria (2021)

As observações permitem concluir que as contaminações ocorrem entre os microrganismos produzidos pela empresa *onfarm* no mesmo lote, ou seja, um lote produzido está contaminado com microrganismo produzido por um outro lote, fato também chamado de contaminação cruzada. Não há evidências de contaminação externa, por microrganismos que não sejam intencionalmente produzidos na biofábrica; o que nos faz inferir que os procedimentos de boas práticas no local do cultivo são adequados para impedir a entrada de microrganismos do ambiente externo. Indicando que provavelmente a água e os insumos também não sejam fonte da contaminação (ABRUNHOSA, 2019).

Segundo Abrusonha (2019) a contaminação de uma produção *onfarm* pode originar-se das matérias-primas utilizadas, ser introduzida durante o processo produtivo ou proveniente de má estocagem e uso do produto. Dentre as principais fontes de contaminação, pode-se citar contaminação proveniente do ar, materiais de acondicionamento e embalagem, equipamentos e utensílios de produção, matérias-primas, teor de água e contaminação direta pelos manipuladores do produto.

Um equipamento que pode ser uma fonte oriunda de contaminação são os tanques de fermentação, estocagem, também os frascos de coleta das amostras. Assim como a contaminação pode ser proveniente de Superfícies contaminadas; o ar contaminado se deposita nas superfícies proporcionando ciclos de recontaminação do ar, especialmente em locais de difícil acesso para higienização (CUNHA *et al.*, 2020).

Segundo Cunha *et al.* (2020) outra fonte perigosa de contaminação é das

fontes dos inóculos serem de produtos comerciais, pois os contaminantes podem crescer mais rápido que a estirpe desejada, afetando a qualidade do produto final. Além disso, os produtos comerciais contêm estabilizantes e conservantes que podem interferir no processo fermentativo.

Durante a produção de produtos não-estéreis, diversos fatores contribuem para a contaminação microbiana. Dessa maneira, é necessária uma avaliação crítica de toda a cadeia produtiva, buscando prevenir e evitar condições que favoreçam a contaminação e proliferação de microrganismos (ABRUSONHA, 2019).

É fundamental acompanhar as diferentes etapas produtivas e conhecer as fontes e mecanismos responsáveis pela contaminação, tendo em vista que o processo de produção exerce grande influência sobre os níveis de contaminação microbiana do produto (BUGNO; BUZZO; PEREIRA, 2003).

A única metodologia utilizada nesta análise das contaminações foi a coloração de gram, é um método para identificação morfológica; mas para obter resultados mais preciosos e mais aprofundados sobre cada espécie de microrganismo que aparece nas contaminações seria necessário fazer testes de DNA, como o PCR por exemplo, foi inviável realizar estes testes neste trabalho, mas para trabalhos futuros seria interessante realizá-los.

7 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO FERMENTATIVO DA *C. SUBTSUGAE*

Depois das análises microbiológicas das amostras e as análises das contaminações a terceira parte do estudo foi realizado a otimização da produção do processo fermentativo da *C. subtsugae*. Foi escolhido para estudo a produção da *C. subtsugae* pois é o segundo microrganismo com maior número de amostras analisadas, e também pela pequena quantidade de pesquisas do processo fermentativo deste microrganismo.

Na tabela 14 apresenta a matriz do DCCR com valores reais, codificados e os resultados de concentração de células da densidade ótica e em unidades formadoras de colônias (UFC).

Tabela 14 - Matriz do DCCR para o resultado de 96 horas da fermentação da *C. subtsugae*

Ensaio	T°C		Glicose(g)		NaCl(g)		UFC	D.O
	X ₁ (°C)	x ₁	X ₂ (g.L ⁻¹)	x ₂	X ₃ (g.L ⁻¹)	x ₃		
1	31	+1	2,1	+1	2,1	+1	4,9	0,120
2	31	+1	2,1	+1	0,9	-1	4,3	0,062
3	31	+1	0,9	-1	2,1	+1	4,6	0,136
4	31	+1	0,9	-1	0,9	-1	5,0	0,092
5	25	-1	2,1	+1	2,1	+1	2,2	0,172
6	25	-1	2,1	+1	0,9	-1	2,2	0,171
7	25	-1	2,1	+1	2,1	+1	2,3	0,179
8	25	-1	0,9	-1	0,9	-1	2,1	0,019
9	23	-1,68	0,9	-1	1,5	0	2,8	0,005
10	33	+1,68	1,5	0	1,5	0	2,7	0,139
11	28	0	1,5	0	1,5	0	2,8	0,118
12	28	0	0,5	-1,68	1,5	0	2,9	0,001
13	28	0	2,5	+1,68	0,5	-1,68	2,9	0,301
14	28	0	1,5	0	2,5	+1,68	2,6	0,369
15	28	0	1,5	0	1,5	0	3,2	0,063
17	28	0	1,5	0	1,5	0	3,0	0,141

X₁=Temperatura(C°), X₂=Glicose(g/L), X₃=NaCl(g), UFC=Unidades formadoras de colônias
D.O=Densidade ótica.

Fonte : Autoria própria (2022)

Com os resultados experimentais da fermentação da *C. subtsugae* em função da relação da temperatura(X₁), Glicose(X₂), NaCl(X₃) realizou-se a otimização resultados estatísticos.

O experimento da otimização da fermentação da *C. subtsugae* de 96 horas teve os resultados mais expressivos do que as demais horas de fermentação do microrganismo, o resultado da concentração de células medida por UFC em 96 horas

de fermentação apresentou um R^2 próximo de 0,5, indicando assim que apenas 50,15% da variabilidade na resposta podem ser explicadas pelo modelo. Este valor é considerado insatisfatório para obtenção de um modelo válido e útil para fins preditivos.

Embora o modelo não seja considerado preditivo, foi dado segmento a análise para inferir os valores ótimos de cada variável a ponto de otimizar a resposta.

Equação:

$$\begin{aligned} \text{UFC} = & 3,023 - 0,042 \text{ T}^\circ\text{C} + 0,042 \text{ Glicose} - 0,769 \text{ NaCl} + \\ & 0,040 \text{ T}^\circ\text{C} * \text{T}^\circ\text{C} \\ & + 0,075 \text{ Glicose} * \text{Glicose} + 0,040 \text{ NaCl} * \text{NaCl} + 0,100 \\ & \text{T}^\circ\text{C} * \text{Glicose} \\ & + 0,000 \text{ T}^\circ\text{C} * \text{NaCl} - 0,050 \text{ Glicose} * \text{NaCl} \end{aligned}$$

7.1 Resultados estatísticos para as variáveis da fermentação da *C.subtsugae* em 96 horas em UFC

Os resultados da avaliação estatística para as variáveis da *C.subtsugae* em UFC estão apresentados na Tabela 15:

Tabela 15 - Efeitos e interações calculadas para as variáveis de *C.subtsugae* em UFC

Termo	Coef	EP de Coef	Valor- T	Valor- P	VIF
Constante	3,023	0,541	5,59	0,001	
T°C	- 0,042	0,254	-0,16	0,874	1,00
Glicose	0,042	0,254	0,16	0,874	1,00
NaCl	- 0,769	0,254	-3,03	0,019	1,00
T°C*T°C	0,040	0,280	0,14	0,891	1,16
Glicose* Glicose	0,075	0,280	0,27	0,796	1,16
NaCl*Na Cl	0,040	0,280	0,14	0,891	1,16
T°C*Glic ose	0,100	0,332	0,30	0,772	1,00
T°C*Nacl	0,000	0,332	0,00	1,000	1,00
Glicose* NaCl	- 0,050	0,332	-0,15	0,884	1,00

Fonte: Autoria própria (2022)

Os valores apresentados na tabela 15 são significativos a um intervalo de confiança de 90%. A partir das variáveis significativas, efetuou-se uma análise de variância (ANOVA) que é apresentada na Tabela 16.

Tabela 16 - Análise da variância para as variáveis da *C.subtsugae* em UFC

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	9	8,2972	0,92191	1,05	0,487
Linear	3	8,1271	2,70904	3,08	0,100
T°C	1	0,0236	0,02364	0,03	0,874
Glicose	1	0,0236	0,02364	0,03	0,874
Nacl	1	8,0798	8,07985	9,17	0,019
Quadrado	3	0,0700	0,02335	0,03	0,994
T°C*T°C	1	0,0179	0,01791	0,02	0,891
Glicose*Glicose	1	0,0638	0,06378	0,07	0,796
Nacl*Nacl	1	0,0179	0,01791	0,02	0,891
Interação com 2 Fatores	3	0,1000	0,03333	0,04	0,989
T°C*Glicose	1	0,0800	0,08000	0,09	0,772
T°C*Nacl	1	0,0000	0,00000	0,00	1,000
Glicose*Nacl	1	0,0200	0,02000	0,02	0,884
Erro	7	6,1652	0,88074		
Falta de ajuste	5	6,1385	1,22770	92,08	0,011
Erro puro	2	0,0267	0,01333	*	*
Total	16	14,4624			

Nota: $F_{tab(9,7)} P < 0,1 = 2,725$
Fonte: Autoria própria (2022)

Além disso, segundo Box *et al.* (1978) para que uma regressão seja não apenas significativa, mas também útil para fins preditivos, a relação de $F_{calculado}/F_{tabelado}$ deve ser superior a três. No caso deste estudo, a relação para a regressão apresentou um valor de 3,023%.

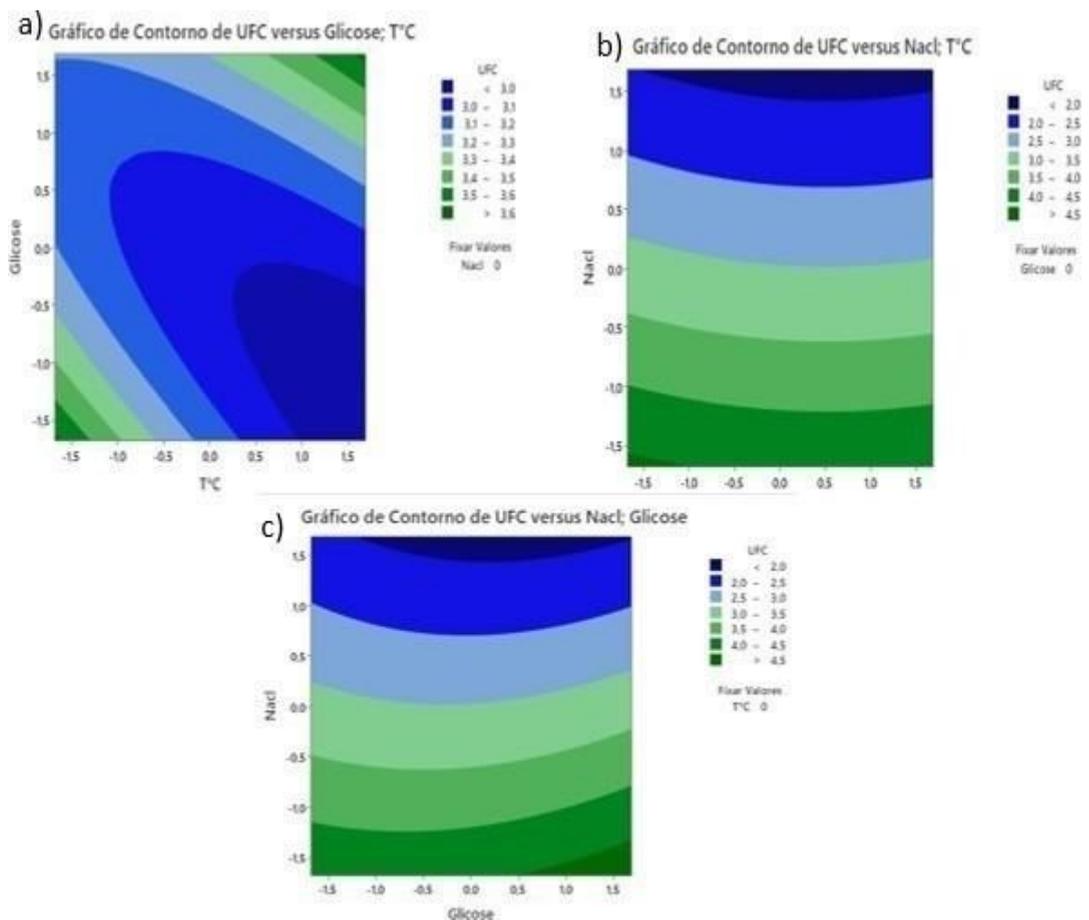
A significância do modelo é verificada pelo procedimento de ANOVA (Análise de Variância). Onde é analisada a variação média das respostas e é importante para avaliar se o modelo é estatisticamente significativo (MONTGOMERY, 2009). Também é possível verificar quais entre os termos do modelo são significativos e os não significativos podem ser removidos da equação. A verificação da igualdade entre as médias compara a variação nas repetições do ponto central e a variação entre os tratamentos.

O “p-valor” indica o nível de significância da variável independente sobre a variável resposta, representando a probabilidade de ocorrência de um dado evento. Quando se escolhe trabalhar com um intervalo de confiança de 95%, ou seja, um “p-valor” inferior a 0,05, pode-se afirmar que a variável estudada é estatisticamente significativa. Ou seja, caso o P-valor de um fator seja inferior ao nível de significância α estabelecido, ele será considerado como um fator significativo.

Ratificando a falta de ajuste do modelo, o valor de $F_{\text{calculado}}$ para a falta de ajuste foi bem superior (92,08) que o F_{tabelado} (2,725) para o mesmo, fornecendo uma alta relação, o que igualmente não é ideal para a validação do modelo. Para que um modelo seja considerado bem ajustado o mesmo deve apresentar uma relação menor que 0,10.

Apesar dos resultados obtidos não proporcionarem a geração de um modelo matemático, gráficos de contorno foram gerados e indicam a tendência do processo.

Gráfico 1-a) Contorno de UFC versus Glicose;T°C, b)Contorno de UFC versus NaCl;T°C,c)Contorno de UFC versus NaCl;Glicose



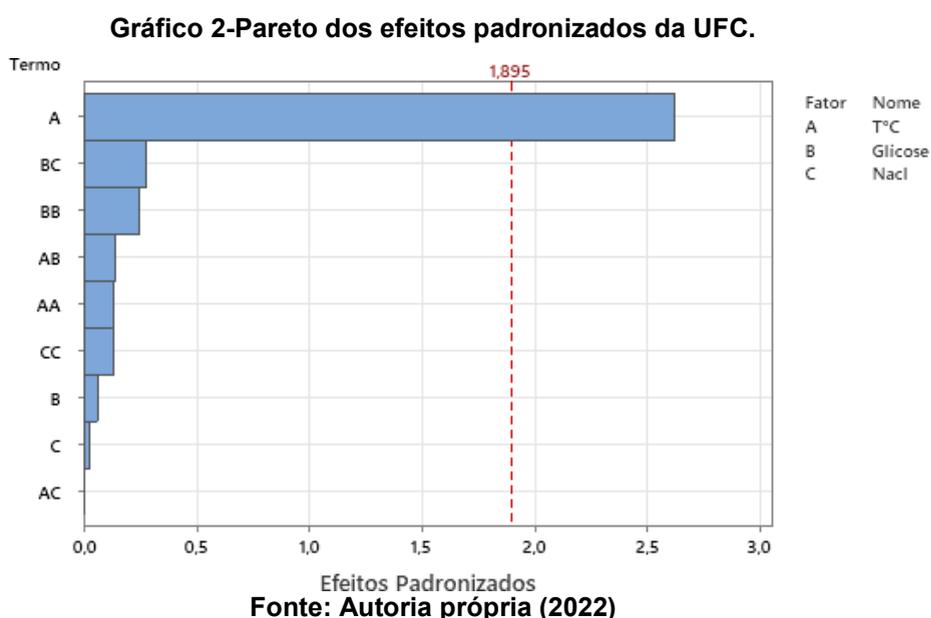
**Nota: Valores de UFC <math>< 10^8</math>/mL
Fonte: Autoria própria (2022)**

Analisando o gráfico 1 a) b) e c) mostra que a tendência do processo é quando ocorre um aumento da temperatura (T°C) ocorre um aumento também no número de UFC/mL (Unidade formadoras de Colônia), indicando que a temperatura tem influência nos resultados.

7.1.1 Análise do modelo e gráfico de Pareto

O modelo obtido através dos dados experimentais com relação a resposta da concentração de células em UFC, resultou em um modelo de R^2 igual a 50,15%; sendo R^2 ajustado:0,00% e R^2 ajustado também é 0,00%

Esse modelo apresentou R^2 inferior, mas ainda assim, por ser um experimento biológico, pode ser considerado para estudos futuros. O gráfico de Pareto, disposto no gráfico 2, apresenta as variáveis significativas na produção de *C.subtsugae* em 96 horas utilizando um nível de confiança de 90%:



Observa-se no gráfico de pareto que apenas uma das variáveis foi considerada significativa neste intervalo de confiança. Isso indica que a temperatura exerce maior influência no aumento da concentração de células medida em UFC da fermentação da *C.substugae* em 96 horas nessa faixa de estudo comparado com as outras variáveis.

A empresa *onfarm* da qual foi realizado parte da pesquisa não possui controle de temperatura na sua produção. O ambiente onde fica localizado os tanques de fermentação possui um aquecedor, o que pode variar muito a temperatura, ter interferência externa da temperatura ambiente, podendo subir ou diminuir temperatura dependendo do clima do dia.

Como na empresa *onfarm* muitas espécies de microrganismos são multiplicados, tem a questão de que cada microrganismo tem uma variação de temperatura diferente, alguns se adaptam mais a temperaturas mais altas e outras mais baixas.

A *C.substugae* por exemplo segundo Martin *et al.* (2007) possui temperatura ideal entre 25°C e 28°C.

Instalar controle de temperatura seria uma alternativa para melhorar a qualidade da produção em empresa *onfarm*. Instalar termômetros em cada tanque de fermentação, ou analisar a cada hora com termômetros os tanques seria uma ótima alternativa.

7.2 Produção da fermentação de *C.substugae* em 96 horas em D.O

O experimento da otimização da fermentação da *C.substugae* de 96 horas em D.O teve os resultados mais expressivos do que em UFC, o resultado da concentração de células medida por D.O em 96 horas de fermentação apresentou um R² próximo de 0,7.

Embora o modelo não seja considerado preditivo, foi dado segmento a análise para inferir os valores ótimos de cada variável a ponto de otimizar a resposta.

Equação:

$$\begin{aligned} \text{D.O} = & 0,1172 - 0,0028 \text{ T}^\circ\text{C} - 0,0217 \text{ Glicose} + 0,0180 \text{ NaCl} - 0,0238 \text{ T}^\circ\text{C} * \text{T}^\circ\text{C} \\ & - 0,0282 \text{ Glicose} * \text{Glicose} + 0,0692 \text{ NaCl} * \text{NaCl} - 0,0181 \text{ T}^\circ\text{C} * \text{Glicose} \\ & - 0,0074 \text{ T}^\circ\text{C} * \text{NaCl} - 0,0239 \text{ Glicose} * \text{NaCl} \end{aligned}$$

7.2.1 Resultados estatísticos para as variáveis da fermentação da *C.substugae* em 96 horas em D.O

Os resultados da avaliação estatística para as variáveis da *C.substugae* em D.O estão apresentados na Tabela 17:

Tabela 17 - Efeitos e interações calculadas para as variáveis de C.subtsugae em D.O

Termo	Coef	EP de Coef	Valor-T	Valor-P
Constante	0,1172	0,0389	3,01	0,020
T°C	- 0,0028	0,0183	-0,15	
Glicose	- 0,0014	0,0183	-1,19	0,274
Nacl	0,0180	0,0183	0,98	0,358
T°C*T°C	- 0,0238	0,0201	-1,18	0,275
Glicose*Glicos e	- 0,0282	0,0201	-1,40	0,203
Nacl*Nacl	0,0692	0,0201	3,45	0,011
T°C*Glicose	- 0,0181	0,0238	-0,76	0,472
T°C*Nacl	- 0,0074	0,0238	-0,31	0,766
Glicose*Nacl	- 0,0239	0,0238	-1,00	0,350

Fonte: Autoria própria (2022)

Os valores destacados são significativos a um intervalo de confiança de 90%. A partir das variáveis significativas, efetuou-se uma análise de variância (ANOVA) que é apresentada na Tabela 18.

Tabela 18 - Análise da variância para as variáveis da C.subtsugae em D.O.

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F
Modelo	9	0,116062	0,012896	2,83
Linear	3	0,010918	0,003639	0,80
T°C	1	0,000104	0,000104	0,02
Glicose	1	0,006406	0,006406	1,41
Nacl	1	0,004408	0,004408	0,97
Quadrado	3	0,097521	0,032507	7,14
T°C*T°C	1	0,006367	0,006367	1,40
Glicose*Glicose	1	0,008956	0,008956	1,97
NaCl*NaCl	1	0,054014	0,054014	11,87
Interação com 2 Fatores	3	0,007623	0,002541	0,56
T°C*Glicose	1	0,002628	0,002628	0,58
T°C*NaCl	1	0,000435	0,000435	0,10
Glicose*NaCl	1	0,004560	0,004560	1,00
Erro	7	0,031853	0,004550	
Falta de ajuste	5	0,027848	0,005570	2,78
Erro puro	2	0,004005	0,002002	*
Total	16	0,147915		

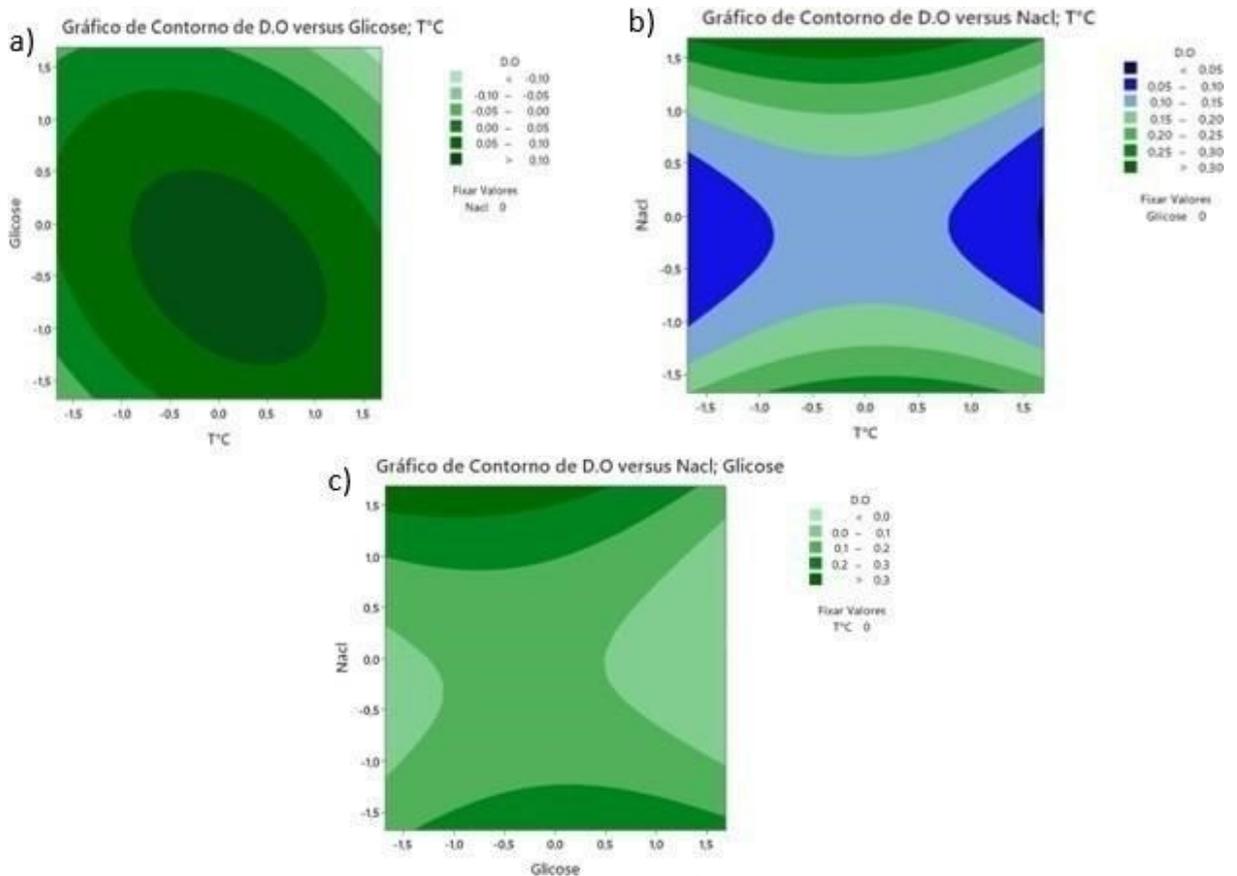
Nota: Ftab (9,7); P<0,1 =2,725

Fonte: Autoria própria (2022)

Para o modelo ser considerado preditivo a relação de $F_{\text{calculado}}/F_{\text{tabelado}}$ deve ser superior a três. Neste caso o valor da relação dos dois foi de 0,105, o que indica que o modelo Não é preditivo.

Para o modelo ser considerado preditivo a relação de $F_{\text{calculado}}/F_{\text{tabelado}}$ deve ser superior a três. Neste caso o valor da relação dos dois foi de 0,105, o que indica que o modelo não é preditivo.

Gráfico 3- a) Contorno de D.O versus Glicose; T°C ,b) Contorno de D.O versus NaCl; T°C, c) Contorno de D.O versus NaCl; Glicose.

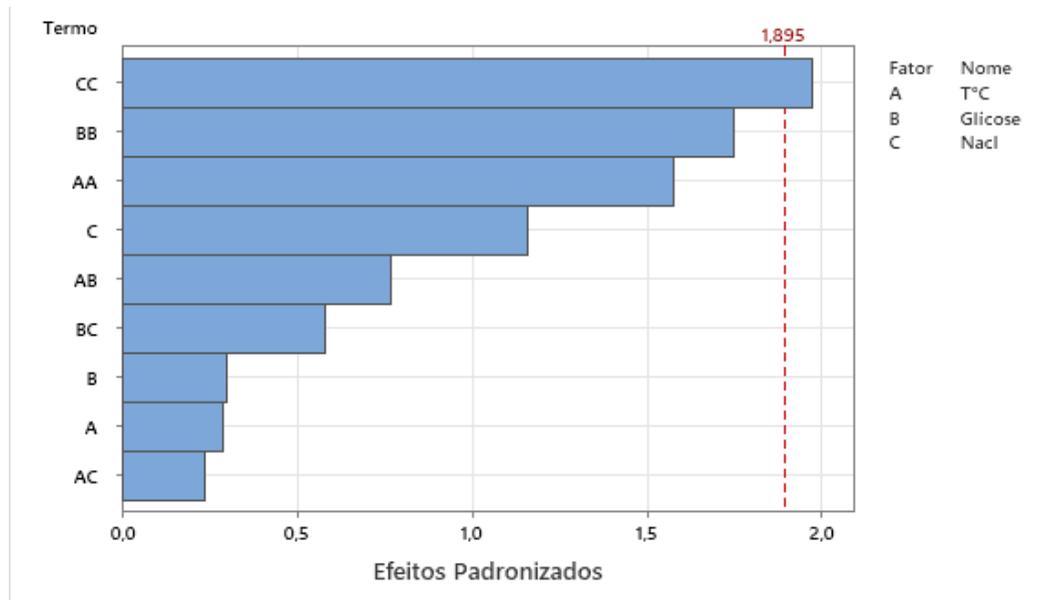


**Nota: Valores de UFC > 10^8 /mL
Fonte: Autoria própria (2022)**

7.2.1 Análise do modelo e Gráfico de Pareto

O modelo obtido através dos dados experimentais com relação a resposta em D.O., resultou em um modelo de R^2 igual a 68,78%; sendo o valor de R^2 ajustado: 28,63% e o valor do R^2 preditivo é de 0,00%.

Esse modelo da *C. subtsugae* em D.O. apresentou R^2 um valor maior do que o valor em UFC mesmo o valor de R^2 sendo maior do que o da UFC, ainda não é considerado preditivo.

Gráfico 4-Pareto dos Efeitos Padronizados em D.O

Observa-se no gráfico de pareto que apenas uma das variáveis foi considerada significativa neste intervalo de confiança o NaCl, Isso indica que as outras variáveis não influenciam tanto nessa faixa de estudo,mas que para trabalhos futuros pode-se aumentar a concentração de glicose para analisar a influência dela no estudo.

8 CONCLUSÃO

A partir da avaliação da qualidade dos bioinsumos de uma empresa *Onfarm* com enfoque na produção da *C. substugae*, foi possível verificar que a maioria dos bioinsumos tinham o mínimo de concentração de células exigida para a aplicação no campo. Mesmo fazendo uma comparação com a concentração mínima exigida dos produtos '*onfarm*' versus produtos comerciais, muitos deles atingiram o número de concentração de células esperado.

O fato mais importante para ser considerado é que um produto '*onfarm*' nunca terá o nível de qualidade e tecnologia que um produto comercial produzido industrialmente.

É preciso considerar também se vale a pena para o produtor incorporar a produção de microrganismos, da forma adequada, às atividades produtivas da propriedade. Se sim, obrigatoriamente ele deverá ter assistência técnica qualificada para desenvolvimento de todo o processo, como escolha apropriada do sistema, do meio de cultura, dos protocolos de multiplicação, considerando as especificidades de cada espécie microbiana alvo, além, obviamente, de contar com um rígido controle de qualidade.

Se forem seguidas as boas práticas de produção, atrelado a um bom acompanhamento técnico, é possível desenvolver a produção *onfarm* de forma segura e eficiente.

Ao avaliar a contaminação cruzada de um determinado lote de bioinsumos, concluiu-se que a contaminação ocorre entre os próprios microrganismos produzidos na empresa e não tem contaminação externa de outros microrganismos.

Após a produção do processo fermentativo da *C. substugae*, concluiu-se que os resultados tanto em D.O quanto em UFC não foram preditivos e os resultados da otimização não foram considerados.

Os resultados em D.O com as variáveis testadas são mais significativos do que os resultados em UFC, levando em conta que a contagem de células em D.O não diferencia células viáveis das células inviáveis, já a contagem em UFC diz respeito a contagem de células viáveis.

A temperatura e a concentração de NaCl foram as variáveis que tiveram mais influência na otimização do processo fermentativo da *C. substugae*, sendo interessante em trabalhos futuros fazer análises com essas variáveis.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.; JIANG, D.; FU, Y. Trichoderma spp. as antagonist of *Rhizoctonia solani*.

Journal of plant pathological microbiology, v. 8, n. 3, p. 402-441, 2017.

ALBIERO, A, **Desenvolvimento e avaliação de diferentes rotas de produção de Etanol biocombustível a partir de resíduos de indústrias lácteas**. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso Superior de Tecnologia em Biocombustíveis –UFPR/Setor Palotina, como requisito parcial para obtenção do grau de Tecnólogo em biocombustíveis, Universidade Federal do Paraná, Palotina, 2013.

ABRUNHOSA, S.L. **Avaliação da contaminação de meios de cultura utilizados para produção “onfarm” de bioinseticida**. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado no Curso de graduação em farmácia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Farmácia, Universidade de Brasília, Brasília, 2019.

ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba, SP: Fealq, 1998.

ARTHURS, S.; SUREBDRA .K.DARAB. Microbial biopesticides for invertebrate pests and their markets in the United States. **Journal of invertebrate pathology**. v.165, p.13-21, 2019.

ASTORI, E.S. **Efeito do herbicida glifosfato sobre a ação de rizobactérias na cultura da soja**. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Agronomia)-Curso de Agronomia, Universidade Federal da Fronteira Sul, Laranjeiras do Sul, Paraná, 2018.

BAJAJ, A. *et al.* Isolation and characterization of a novel Gram-negative bacterium *Chromobacterium alkanivorans* sp. Nov., strain IITR-71T degrading halogenated alkanes. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5228– 5235, 2016.

BLACKBURN, M. B. *et al.* *Chromobacterium sphagni* sp, an insecticidal bacterium isolated from Sphagnum bogs. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**. 67, p. 3417 – 3422, nov. 2017.

BIOKAR. **Triptona peptona: Cultura de uma grande variedade de microrganismos**. Disponível em: <https://www.laborclin.com.br/wp-content/uploads/2020/12/172417-TRIPTONA-BIOKAR.pdf>. Acesso em: março 2021.

BOCATTI, C.R, FERREIRA, E., RIBEIRO, R.A *et al.* Análise da qualidade microbiológica de inoculantes à base de Bradyrhizobium spp. e Azospirillum brasilense produzido “na fazenda” revela alta contaminação com microrganismos não-alvo. **Braz J Microbiol**, v.53, p.267-280. 2022.

BOOMSMA, J.J. *et al.* Redes de interação evolutiva de fungos patogênicos de insetos. **Revisão anual de entomologia**, Califórnia, v.59, p.467-485, jan. 2014.

BORGES, I.V.V. “**Aplicação de multilocus sequence analysis (mlsa) para identificação de linhagens de *Chromobacterium*.**” 2018. Dissertação (Mestrado em Genética e biologia molecular)-Universidade estadual de Campinas, Campinas, 2018.

BORZANI, W.; LIMA, V. A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia: Engenharia bioquímica**. São Paulo. Ed. Edgard Blucher. 2001.

BOX, G.E.P.; HUNTER, W.G.; HUNTER, J.S. **Statistics for experimenters**. An introduction to design, data analysis and model building. Nova York: Editora Wiley, 1978.

BUGNO, A.; BUZZO, A.; PEREIRA, T.C. Avaliação da qualidade microbiológica de produtos saneantes destinados à limpeza. **Revista brasileira de ciências farmacêuticas**, v. 39, n. 3, p.335-340, set. 2003.

CAPALBO, D. M. F.; MORAES, I. O. Use of agro-industrial residues for bioinsecticidal endotoxin production by *Bacillus thuringiensis* var. israelensis or kurstaki in solid State fermentation. In: ROUSSOS, S.; LONSANE, B. K.; RAIMBAULT, *et al.* Advances in solid state fermentation. Dordrecht, Netherlands: **Kluwer academic publ**, p. 475-82.1997.

CAPALBO, D. M. F. **Desenvolvimento de um processo de fermentação semi-sólida para obtenção de *Bacillus thuringiensis* Berliner**. Tese (Doutorado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp, SP, 1989.

COSTA, F. S. S.D. ; PRAÇA, L. B. *et al.* *Bacillus thuringiensis* effect on the Vegetative Development of Cotton Plants and the Biocontrol of *Spodoptera frugiperda*. **Agronomy-Basel**, v. 10, p. 1889, 2020.

COUCH, T. L. Industrial fermentation and formulation of entomopathogenic bacteria. Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field applications. New York. **Kluwer academic publishes**, p. 297-316, 2000.

CUNHA, T.; FERRAZ, L. POMPEO. *et al.* The Action Of Yeast Strains As Biocontrol Agents Against *Penicillium digitatum* In Lima Sweet Oranges. **Citrus Research & Technology**, v. 41, p. 1-9, 2020.

DAMASCO, C.T.M, COURI, S. **Fermentação**. Disponível em: https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/tecnologia_de_alimentos/arvore/C ON T000fid5sgif02wyiv80z4s4737dnfr3b.html. Acesso em: março 2021.

DEMOSS, R. D. Violacein. **Antibiotics**, p. 77-81, 1967.

DINIZ, C.G. **Roteiro de aulas práticas**. Mar. 2018. Disponível em: <https://www.ufjf.br/microbiologia/files/2013/05/ROTEIRO-PARA-AULAS-PR%C3%81TICAS-bacteriologia-2019.pdf>. Acesso em jan 2021.

DOURADO, M.P. **Resistência da *Spodoptera frugiperda*** (Lepidoptera : noctuidae) a Spinosad no Brasil. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências). Escola superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba. 2009.

DURÁN, M.; FALJONI-ALARIO, A; DURÁN, N. *Chromobacterium violaceum* and its important metabolites--review. **Folia microbiologic**, v. 55, n. 6, p. 535–47, 2010.

DURÁN, N. *et al.* Advances in *Chromobacterium violaceum* and properties of violacein-Its main secondary metabolite: A review. **Biotechnology advances**, v. 34, n. 5, p. 1030–1045, 2016.

FIGUEIREDO, G.M. **Efeitos na saúde de trabalhadores expostos a longo prazo a agrotóxicos atendidos no ambulatório de toxicologia do hospital de clínicas da UNICAMP nos anos de 2006 e 2007.**2009. Dissertação Mestrado,Unicamp Campinas, 2009.

FONSECA,F.D.**Estudo das condições de cultivo e de eletrocompetência para a transformação de *Bacillus megaterium* ATCC 14945.**2008. Dissertação(Mestrado em Biotecnologia)-Programa de pós graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos,São Carlos,2008.

FONTES,E.M.G,VALADARIS;INGLIS,M.C.**Controle biológico de pragas na agricultura.**Distrito Federal:Embrapa,2020.

GLARE T, CARADUS J.*et al.* Have biopesticides come of age?**Trends biotechnol.**v.30,p.250-255,May.2012.

GUERRA,A.F.Microbiologia de alimentos: **Métodos de contagem microbiana Valença**, 1ª Edição, 2016.

HAN, X. Y.; HAN, S. F.; SEGAL, J. *Chromobacterium Haemolyticum* Sp. Nov., a strongly haemolytic species. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, 58, p. 1398 – 1403,2008.

HUNGRIA, M.*et al.* Seed pre-inoculation with Bradyrhizobium as time-optimizing option for large-scale soybean cropping systems. **Agronomy journal**, v. 112, p. 5222-5236, 2020.

HURTADO, G. B. La producción de ingredientes activos com *Bacillus thuringiensis*. In: BRAVO, A.; CERON, J. *Bacillus thuringiensis* en el control biológico. Bogotá: **Buena Semilla**. p. 233-273.2004

IHS MARKIT. **Annual new product introductions: Biological vs conventional.** Disponível em: <https://ihsmarkit.com/research-analysis/biologicalsinnovation.html>. Acesso em setembro de 2021.

KÄMPFER, P.; BUSSE, H. J.; SCHOLZ, H. C. *Chromobacterium piscinae* sp. nov. and *Chromobacterium pseudo violaceum* sp. nov., from environmental samples. **International Journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 59, n. 10, p. 2486–2490, 2009.

KANEKO, F. H. ; FERREIRA, J.P ; SABUNDJIAN, M.T.*et al* . Biological nitrogen fixation, sources and levels of N increase the maize grain yield in Cerrado. **Revista brasileira de milho e sorgo (online)**, v. 18, p. 196-206, 2019.

KAVAMURA, V.N. **Bactérias associadas às cactáceas da Caatinga : promoção de crescimento de plantas sob estresse hídrico.** Tese (Doutorado em

Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

LACEY, L. A.; GRZYWACZ, D.; SHAPIRO-ILAN, D. I. *et al.* Insect pathogens as biological control agents: back to the future. **Journal of invertebrate pathology**, v. 132, p. 1-41, Nov. 2015.

LEAHY, J., M., M., KOUUGUGH, J. *et al.* Biopesticide oversight and registration at the US Environmental Protection Agency, Gross, A.D., Coats, J.R., Duke, S.O., Seiber, J.N., **Biopesticides: State of the art and future opportunities**, p. 3–18, 2014.

LEE, Y. H., JANG, S. J., HAN, J. H. *et al.* Enhanced Tolerance of Chinese Cabbage Seedlings Mediated by *Bacillus aryabhatai* H26-2 and *B. siamensis* H30-3 against High Temperature Stress and Fungal Infections. **The plant pathology journal**, v.34, p.555, 2018.

LISBOA, M. P. **Caracterização de um peptídeo antimicrobiano produzido por uma linhagem de *Bacillus amyloliquefaciens* isoladas do solo.** 2006.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

LORENCETTI, C.C. **Produzir biológicos na propriedade pode ser econômico mas exige extremo cuidado.** Disponível em : <https://alfonsin.com.br/manejo-produzir-biologicos-na-propriedade-pode-ser-econmico-mas-exige-extremo-cuidado/> Acesso em : Março 2021.

LYSANSKY; S. G.; COOMBS. J. **Developments in the market for biopesticides**, In Brighton Crop Protection Conference. Pests and diseases, p. 1049 – 1054, 1994.

MADIGAN, M. T. *et al.*, **Microbiologia de Brock-14^a Edição.** Artmed Editora, 2016.

MAPA. **Projeto de lei nº658, de 2021.** Dispõe sobre a classificação, tratamento e produção de bioinsumos por meio do manejo biológico *onfarm*; ratifica o Programa Nacional de Bioinsumos e dá outras providências. Brasil. MAPA. 2021. Disponível em: <https://www.camara.leg.br/propostas-legislativas/2271161>. Acesso em: 21.Ago.2022.

MARTIN, P.A., SHROPSHIRE, A.D.S. *et al.* *Chromobacterium substugae* sp. **for control of insect pests.** US Pat, p.7, 2007.

MASCIA, R. ***Bacillus amyloliquefaciens* e *Trichoderma harzianum* no manejo de *Pratylenchus brachyurus* e *Helicotylenchus* sp. na cultura da soja.** Dissertação (Mestrado) – Instituto Federal Goiano Câmpus Urutaí, 2016.

MATZ, C. *et al.* Marine biofilm bacteria evade eukaryotic predation by targeted chemical defense. **Plos One**, v. 3, n. 7, p. 1–7, 2008.

MENEZES, C. B. A. *et al.* *Chromobacterium amazonense* sp. nov. isolated from water samples from the Rio Negro, Amazon, Brazil. Antonie van Leeuwenhoek, **International Journal of general and molecular microbiology**, v. 107, n. 4, p. 1057–1063, 2015.

MEYER, C.M. *et al.* **Bioinsumos na cultura da soja.** 1 ed. Brasília, DF: Embrapa, 2022.

MONNERAT, R.G.; QUEIROZ, P.; ORDUZ, S.*et al.* Genetic variability in *Spodoptera frugiperda* Smith populations in Latin America is associated to variations in susceptibility to *Bacillus thuringiensis* Cry toxins. **Applied and environmental microbiology**, v. 72, p. 7029-7035, 2006.

MONNERAT, R. *et al.*, **Produção e controle de qualidade de produtos biológicos à base de *Bacillus thuringiensis* para uso na agricultura**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 32p,2018.

MONTGOMERY, DC. **Introdução ao Controle Estatístico de Qualidade**. 6.ed. John Wiley & Sons, Nova York.2009.

MORIN,P.V. **Transtornos mentais comuns em trabalhadores rurais que utilizam agrotóxicos**.2016.Dissertação(Mestrado)- Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul,Ijuí,2016.

NOGUEIRA, F.D A. M.; SZWARCOWALD.*et al.* Exposição a agrotóxicos e agravos à saúde em trabalhadores agrícolas: o que revela a literatura?. **Revista brasileira de saúde ocupacional**, v. 45, p. 35-54, 2020.

OWUAMA.C.I.Entomopatogenic symbiotic bacteria,Xenorhabdus and Photorhabdus of nematodos.**World journal of microbiology & biotechnology**,v.17,n.5, p.505- 515.2001.

PEREIRA,R.**Fatores que determinam o crescimento bacteriano**.Disponível em: <http://atividaderural.com.br/artigos/4ec6483d31c6d.pdf/> Acesso em: Março 2021.

PROMIP.**Bioinseticidas a base de *Bacillus thuringiensis*: Um caminho para a sustentabilidade**.Jan.2016.Disponível em:<https://promip.agr.br/blog-2016-01-bioinseticidas-a-base-de-bacillus-thuringiensis/> Acesso em:Março 2021.

QUEIROZ, P.; MARTINS, É. S.; BRAVO, A.*et al.* Mitochondrial markers to distinguish *Spodoptera frugiperda* populations associated with corn and cotton crops. **Pesquisa agropecuária brasileira (online)**, v. 51, p. 692-696, 2016.

RUIU, L. Insect Pathogenic Bacteria in Integrated Pest Management. **Insects** ,v. 6, 352-367.2016.

ROYO,J.**Inseticidas usam bactérias para combater insetos nas plantações**.Abr.2010.Disponível em: <http://www.diadecampo.com.br/zpublisher/materias/Newsletter.asp?id=21546&secao>
=AgrotemasAcesso em: agosto 2020.

SANTOS, S. G., CHAVES, V. A.*et al.*Rooting and growth of pre-germinated sugarcane seedlings inoculated with diazotrophic bacteria. **Applied soil ecology**,p. 12-23,2019.

SANAHUJA.G , BANAKAR.R , TWYMAN R.M.*et al.****Bacillus thuringiensis* : um século de pesquisa, desenvolvimento e aplicações comerciais**.**Plant biotechnol**,v.9.p. 283 – 300,2011.

SCHOLZ, H. C. *et al.* Genotyping of *Chromobacterium violaceum* isolates by recA PCR-RFLP analysis. **Fems microbiology letters**, v. 244, n. 2, p. 347–352, 2005.

SCHOLZ, H. C.; WITTE A.; TOMASO, H. *et al.* Genotyping of *Chromobacterium Violaceum* Isolates by recA PCR-RFLP Analysis. **Fems microbiology letters**.347 – 352, 2005.

SHIVAJI, S.; CHATURVEDI, P.; BEGUM. *et al.* *Janibacter hoylei* sp nov., *Bacillus isronensis* sp nov and *Bacillus aryabhatai* sp nov., isolated from cryotubes used for collecting air from the upper atmosphere. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 59, p. 2977-2986, 2009.

SCHULTZ, N., MORAIS, R. F. D., SILVA, J. A. D. *et al.* Avaliação agronômica de variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas e adubadas com nitrogênio. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.47, p.261-268, 2012.

SILVA, C. D. D. **Ciências biológicas: Realidade e virtualidades**. 1.ed. Paraná: Atena, 2020.

SOBY, S. D. *et al.* *Chromobacterium vaccinii* sp. nov., isolated from native and cultivated cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) bogs and irrigation ponds. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 63, n.5, p. 1840–1846, 2013.

SOUZA, M. S. ; MACHADO, J. M. H. ; FENNER, A. L. D. *et al.* Educação, promoção e vigilância em saúde: integração entre saberes e práticas com movimentos sociais camponeses. **Comunicação em ciências da saúde**, v. 28, p. SI-SI, 2018.

STEFFEN, G. P. K.; MALDANER, J. **Metodologia para multiplicação de Trichoderma sp. em substratos orgânicos**. Porto Alegre: SEAPDR/DDPA, 2019. Material disponível em: <https://www.agricultura.rs.gov.br/upload/arquivos/202106/11093730-n-3-2021-incremento-da-produtividade-de-milho-pelo-uso-de-trichoderma-harzia-num-tf13.pdf>. Acesso em: Agosto 2022.

TAMEZ-GUERRA, P.; GALÁN-WONG, L. J. *et al.* Bioinsecticidas: su empleo, producción y comercialización em México, **Ciência Uanl**, v.4, p. 143-52, 2001.

TOBIE, W. C. The pigment of *Bacillus violaceus*. III The apparent relation of violacein to indigo. **Soc. Am. Bacteriolol.** 39 th General meeting, p. 11-12, 1934.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. **Microbiologia. In: Microbiologia**. 2012.

VALERO, C.A, DEBETS, AJ, VAN KAN, J.A *et al.* Variação natural na virulência do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* contra mosquitos da malária. **Malar J** 13 , p.479, 2014.

VIEIRA, D.A.P. *et al.* **Microbiologia aplicada**. Inhumas: IFG; Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2012.

YOUNG, C.C. *et al.* *Chromobacterium aquaticum* sp. nov., isolated from spring water samples. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 58, n. 4, p. 877–880, 2008.

ZHOU, S.; GUO, X.; WANG, H.*et al.* *Chromobacterium rhizoryzae* sp. nov., isolated from rice roots. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**,v. 66, p. 3890 – 3896.2016.

WYCKHUYS, K.A.G.; LU,Y; MORALES, H.*et al.* Current status and potential of conservation biological control for agriculture in the developing world. **Biological control**, v. 65, p.152-167, 2013.