

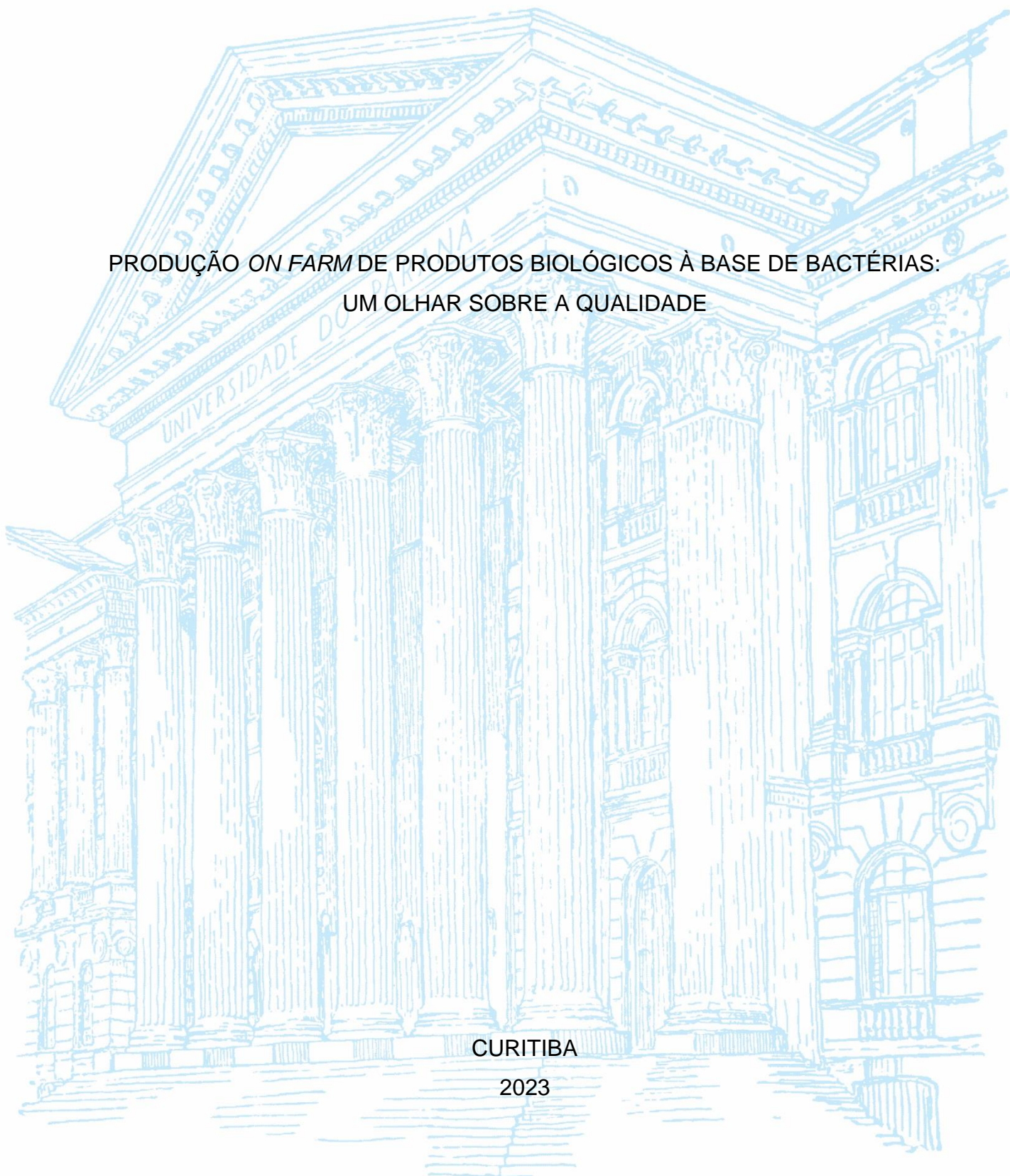
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRUNA LUIZA DE SOUZA ROSA

PRODUÇÃO *ON FARM* DE PRODUTOS BIOLÓGICOS À BASE DE BACTÉRIAS:
UM OLHAR SOBRE A QUALIDADE

CURITIBA

2023



BRUNA LUIZA DE SOUZA ROSA

PRODUÇÃO *ON FARM* DE PRODUTOS BIOLÓGICOS À BASE DE BACTÉRIAS:
UM OLHAR SOBRE A QUALIDADE

Trabalho de conclusão apresentada ao curso de Pós-Graduação em Fitossanidade, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Especialista em Fitossanidade.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Sérgio Miguel Mazaro

CURITIBA

2023

RESUMO

O uso de bioinsumos, produtos de origem biológicas ou naturais, estão crescendo cerca de 40% ao ano desde 2018. Em 2021, 22 % do mercado de biológicos era representado pela produção *On farm*. Esta produção recebe severas críticas, principalmente pela qualidade de produção. Estudos sobre a qualidade do produto *On farm* são escassos, nos levando a falsos entendimentos a respeito da prática. *Bacillus subtilis* e *Bacillus thuringiensis* são dois microorganismos amplamente usados nas multiplicações *On farm*, além de ser fortemente indicado para controle de doenças de plantas e controle de lepidópteros, respectivamente. Visto este cenário, o objetivo do estudo é apontar qual a qualidade do produto final vindos de multiplicações *On farm* à base das bactérias: *Bacillus subtilis* e *Bacillus thuringiensis*. Os resultados mostraram uma melhora da qualidade dos produtos multiplicados *On farm* quando comparado o ano de 2020 e 2021 e também que apesar da melhora ainda há contaminação com microorganismos com potencial para patógeno humano, destacando *Enterococcus* sp. O estudo aponta que hoje há perfis diferentes de produtores *On farm*, do profissional ao amador, levando a resultados muito diferentes de qualidade de produção. Mais estudos devem ser realizados para dar base a prática *On farm* e para gerar informações para futuras legislações.

Palavras-chave: Bioinsumos. *On farm*. *Bacillus thuringiensis*. *Bacillus subtilis*. Qualidade.

ABSTRACT

The use of bioinputs, products of biological or natural origin, has been growing by around 40% a year since 2018. In 2021, 22% of the biological market was represented by On farm production. This production receives severe criticism, mainly for the quality of production. Studies on the quality of the On farm product are scarce, leading us to false understandings about the practice. *Bacillus subtilis* and *Bacillus thurigiensis* are two microorganisms widely used in On farm multiplications, in addition to being strongly recommended for plant disease control and lepidopteran control, respectively. Of On farm multiplications based on bacteria: *Bacillus subtilis* and *Bacillus thurigiensis*. The results showed an improvement in the quality of the products multiplied On farm when compared to 2020 and 2021 and also that despite the improvement there is still contamination with microorganisms with potential for human pathogens, highlighting *Enterococcus* sp. The study points out that today there are different profiles of On farm producers, from professional to amateur, leading to very different results in terms of production quality. More studies must be carried out to base the On farm practice and to generate information for future legislation.

Keywords: Bioinputs. On farm. *Bacillus thurigiensis*. *Bacillus subtilis*. Quality.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	05
1.1	CONTEXTO E PROBLEMAS	05
1.2	OBJETIVOS	06
1.2.1	Objetivo geral	06
1.2.2	Objetivos específicos.....	06
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	07
2.1	BIOINSUMOS.....	07
2.2	PRODUÇÃO <i>ON FARM</i>	09
2.3	<i>Bacillus subtilis</i>	11
2.4	<i>Bacillus thuringiensis</i>	12
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	14
4	RESULTADOS/ANÁLISE DE DADOS	16
5	CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES	24
	REFERÊNCIAS.....	26

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONTEXTO E PROBLEMAS

Bioinsumos ou insumos biológicos são produtos de base biológica, desenvolvidos a partir de microorganismos, materiais vegetais, orgânicos ou naturais. Podem ser utilizados para combater pragas e doenças, melhorar a fertilidade do solo e incentivar o crescimento de plantas e animais. Têm baixa toxicidade e são biodegradáveis, por isso são considerados amigáveis ao meio ambiente.

O uso de bioinsumos de acordo com um estudo realizado pela Spark Inteligência Estratégica, vem em forte ritmo de crescimento em biológicos, da ordem de 40% ao ano desde 2018, mas apesar do aumento, o segmento ainda representa apenas 3% do mercado total de produtos utilizados pelos produtores para a proteção de cultivos. Para que os bioinsumos continuem em expansão, Fidelis (2022) elenca três principais desafios à expansão do uso de bioinsumos no Brasil: avançar nas questões regulatórias de processos e produtos, “para dar mais segurança jurídica aos produtores e às indústrias”, desenvolver modelos para agricultores familiares e pequenos empreendedores rurais, “os modelos existentes são para médios e grandes produtores, sobretudo no caso de produção própria de bioinsumos” e comunicar os benefícios, “há tecnologias mais baratas que as utilizadas pelos produtores hoje, mas eles não têm essa informação”. “A gente sabe que essa chave vai virar, mas a velocidade com que isso vai acontecer depende da nossa capacidade de ajudar a catalisar o processo”, resume o coordenador-geral do Programa Nacional de Bioinsumos.

Devido aos altos custos dos produtos comerciais biológicos, o aumento da conscientização para a sustentabilidade dos solos e alternativas aos agrotóxicos químicos houve grande expansão da produção de produtos biológicos *On farm* ou caseira. Com este aumento, cresceu também a preocupação com a qualidade do produto e também com a geração de contaminação até mesmo de natureza patogênica a humanos devido as condições precárias que muitos produtores trabalham seus produtos.

Apesar de já se ter iniciado várias análises e lançamentos de várias propostas para qualificar a atividade *On farm*, não se tem nada regulamentado e os estudos feitos sobre a qualidade do produto ainda são escassos.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

O objetivo do estudo é apontar qual a qualidade do produto final vindos de multiplicações *On farm* à base das bactérias: *Bacillus subtilis* e *Bacillus thuringiensis*.

1.2.2. Objetivos Específicos

- Quantificação do inóculo multiplicado *versus* o inóculo base utilizado;
- Presença e quantificação de contaminação por fungos;
- Quantificação de contaminantes de vertebrados, patógenos humanos (*Escherichia Coli*, *Salmonella sp.*, *Enterococcus sp.* e coliformes totais).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. BIOINSUMOS

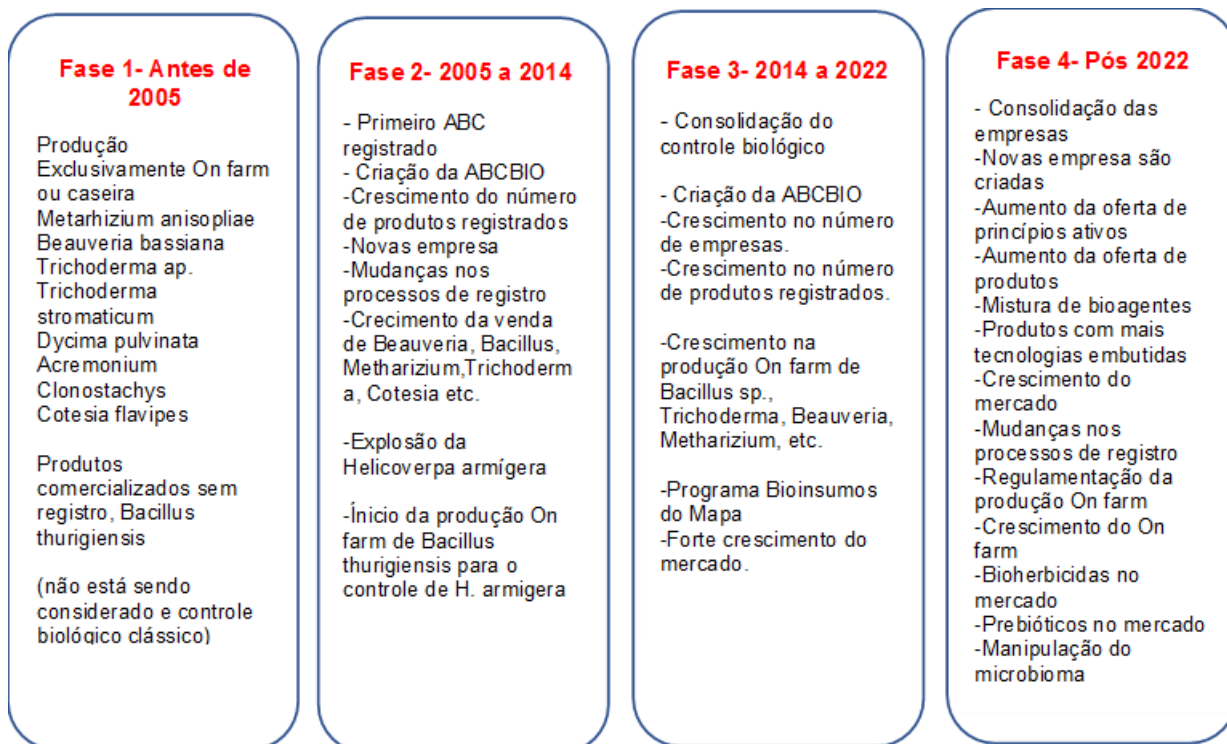
Segundo o [decreto N° 10.375](#) em que foi criado o PNB, são considerados bioinsumos, qualquer produto, processo ou tecnologia de origem vegetal, animal ou microbiana destinados ao uso na produção, no armazenamento e no beneficiamento de produtos agropecuários, abrangendo os sistemas de: produção agrícola, pecuária, aquícola e florestais. Esses produtos proporcionam melhor crescimento, desenvolvimento e mecanismos de respostas no metabolismo dos animais, plantas e microrganismos. Com isto, temos uma diversidade de produtos que podem ser conhecidos como bioinsumos, como por exemplo: inoculantes; promotores de crescimento de plantas; biofertilizantes; produtos para nutrição vegetal e animal; defensivos biológicos; produtos fitoterápicos, produtos veterinários, entre outros.

O mercado mundial de produtos bioinsumos (bioprotetores, inoculantes, bioestimulantes e biofertilizantes) foi estimado para 2022 em US\$ 12,9 bilhões de dólares, com projeção da taxa composta anual de crescimento (CAGR – compound annual growth rate) de 13,7% até 2027, devendo chegar a US\$ 24,6 bilhões de dólares em 2027, conforme a Research and Markets (2022). Em relação ao mercado brasileiro, dados da CropLife (2021) mostram que o mercado nacional em 2021 foi de R\$ 1,8 bilhão, representando um crescimento de 33% em relação ao ano de 2020. Esta estimativa brasileira vai muito além, pois, nestes números não são consideradas as produções caseiras ou denominadas *On farm* que hoje estão presente em muitas fazendas.

Bettiol (2022), propôs fases do controle biológico no Brasil (Figura 1). O autor considerou quatro fases, as descrevendo da seguinte forma: a primeira fase ocorreu antes de 2005, quando os agentes de controle biológico, exceto *Bacillus thuringiensis*, eram comercializados sem registro e uma produção, de modo geral, que pode ser considerada como *onfarm*. Na segunda fase entre 2005 e 2014, o Brasil viveu um momento efervescente no desenvolvimento do controle biológico, sendo a fase em que os primeiros produtos à base de fungos foram registrados para o controle de pragas e doenças; importantes alterações foram consolidadas nos processos de registro dos produtos biológicos culminando no aumento de produtos registrados e na criação de novas empresas; criação da Associação Brasileira das Empresas de

Controle Biológico (ABC BIO) que ocorreu na Embrapa Meio Ambiente, que hoje está dentro da CropLife; ampla discussão sobre produtos à base de *Metharizium*, *Beauveria*, *Trichoderma* e *Bacillus* se iniciou no país; além de outros fatos marcantes que também ocorreram nesta fase. Neste período ocorreu a explosão da ocorrência de *Helicoverpa armigera* no país e, devido aos problemas causados, deu início à chamada produção *On farm* ou caseira de *Bacillus thuringiensis* na tentativa de suprir a falta de produtos, tanto químicos quanto biológicos para controlar essa praga. Esse fato marca o final desta fase. Na terceira fase, entre 2014 e 2022, ocorre a consolidação do controle biológico no país com forte aumento no número de empresas e de produtos registrados, ambos graças às alterações que ocorreram na segunda fase, bem como ao acúmulo de informações das pesquisas realizadas ao longo dos anos nas instituições públicas. O forte crescimento do mercado impulsionou políticas como a criação do programa Bioinsumos pelo MAPA, para estimular o desenvolvimento e o uso desta tecnologia. Na quarta fase, que iniciamos em 2022, a expectativa é muito grande com o crescimento do mercado e, conseqüentemente, no número de produtos registrados e de empresas. Esse crescimento demandará a elaboração de novos critérios de registro, além da regulamentação da produção *On farm*. Há previsão de uma forte tendência do mercado para o registro de bioherbicidas, além de lançamentos de produtos com misturas de agentes de controle como também de produtos com múltiplas funções, como de agente de controle e promotor de crescimento. O conhecimento do microbioma no solo, que hoje já é realizado através de técnicas moleculares e com custo razoável, poderá levar ao uso de probióticos para favorecer determinada comunidade bacteriana de interesse além de permitir a manipulação das plantas com intuito de favorecer grupos de microorganismos para gerar o controle conservacionista.

FIGURA 1- FASES DO CONTROLE BIOLÓGICO NO BRASIL



FONTE: Modificado de Bettiol (2022)

2.2. PRODUÇÃO ON FARM

A produção *On farm* é a produção de defensivos biológicos na própria fazenda para uso próprio. Esta produção é embasada legalmente no Decreto 10.833 de 08 de outubro de 2021 em seu parágrafo 8: “Ficam isentos de registro os produtos fitossanitários com uso aprovado para a agricultura orgânica e convencional produzidos exclusivamente para uso próprio” (BRASIL,2021).

A cada ano cresce a adesão de produtores a prática de produção de biológicos *On farm*. Isso se deve ao crescente aumento de doenças, principalmente de solos, e em contrapartida ao decrescente lançamento de novas moléculas químicas, ao alto valor do produto comercial e ao interesse cada vez maior dos produtores ao manejo sustentável das lavouras. IHS Markit (2021) constatou que 22 % do mercado de bioinsumos foi referente à produção *On farm* naquele ano.

Devido a alta crescente da pratica *On farm* cresce também a preocupação com a forma que muito produtores estão realizando suas multiplicações. Para Monnerat *et al.* (2018) essa fabricação importa em alguns riscos, sendo o maior deles, o da contaminação do caldo fermentado com microrganismos patogênicos ao ser humano. Visto isto, para conter os graves problemas na multiplicação caseira, recentemente a Embrapa (2021) lançou uma declaração oficial onde ela apresenta três princípios básicos que devem ser observados na produção de insumos biológicos por produtores (produção on-farm), ao qual: permiti a multiplicação apenas de microrganismos que constam das listas oficiais do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa), ou com especificação de referência, e que sejam adquiridos em bancos de germoplasma reconhecidos como oficiais pelo Ministério, aponta a necessidade de cadastro de estabelecimento produtor de bioinsumos junto ao Mapa e a necessidade de um responsável técnico habilitado para a produção de bioinsumos nas fazendas. Monnerat *et al.* (2018) também listou as áreas e 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. 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). O laboratório de controle de qualidade e processo 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. O salão de fermentação deverão manter os reatores esterilizáveis, sala de estoque de insumos, nesta sala, deverão ser alocados todos os materiais que serão empregados no processo de fermentação. A sala de armazenamento de produto acabado é o local onde será estocado o produto acabado e de preferência deverá ser refrigerada. Todas as áreas deverão ser passíveis de limpeza e desinfecção, com acabamento impermeável.

Segundo Cunha *et al.* (2020) diferenças entre os produtos comerciais e de produção *onfarm* podem ser estabelecidas como: o produto comercial tem maior custo e exige menor dose de aplicação em relação ao produto *onfarm*; produto comercial tem uma maior qualidade e também possui um maior *shelflife* (tempo de prateleira) e em contrapartida 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. Vistos estes pontos, o produtor *On farm*, mesmo seguindo todos as indicações para uma produção de qualidade ,deve realizar uma programação de aplicação que encaixe de imediato com o término da produção , assim como realizar estas aplicações em horários de pouca iluminação e sem a interferência de produtos químicos para evitar que seu produto, não formulado,se perca no processo.

2.3. *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis (*B.subtillis*) é uma bactéria móvel que forma esporos centrais com formato cilíndrico ou elipsoidal. As colônias podem ter diferentes colorações, variando do esbranquiçado ao preto, a depender do meio de cultura empregado. *Bacillus 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 (MONNERAT et al.,2020).

B. subtilis pode ser isolado, em maior número do que a maioria das outras espécies formadoras de esporos, da rizosfera de uma variedade de plantas. Há evidências de que por meio desses associações *B. subtilis* podem promover o crescimento da planta. Possíveis explicações para essa promoção de crescimento : *B. subtilis* ganha a competição com outros microorganismos que, de outra forma, prejudicariam a planta, *B. subtilis* ativa o sistema de defesa do hospedeiro para que a planta esteja preparada para resistir a patógenos potenciais e *B. subtilis* torna certos nutrientes mais prontamente disponíveis para a planta (por exemplo, fósforo e nitrogênio).*B. subtilis* produz vários lipopeptídeos, enzimas líticas celulares, antioxidantes e hormônios que afetam uma ampla gama de fungos e bactérias. A surfactina, a iturina e a fengicina são os principais lipopeptídeos produzidos, que têm um papel importante no controle de fitopatógenos.

O uso de *B. subtilis* como biofertilizante reduziu a porcentagem de emissão de amônia em 44% (Sun et al., 2020a). Esta bactéria atuou em vários genes funcionais envolvidos na oxidação da amônia. Durante a compostagem de esterco, a inoculação

de *B. subtilis* com dois outros microrganismos reduziu significativamente o nitrogênio amoniacal enquanto aumentava o processo de nitrificação. Isso promove a tecnologia de compostagem reduzindo as emissões de odores. *Bacillus subtilis* também tem sido mostrado como um microrganismo potente na remediação de solo contaminado artificialmente com cromo (Li et al., 2019). Isso pode ser usado como um potente estabilizador microbiológico para imobilização de Pb, Sb, Ni, Cu e Zn em solos alcalinos .

2.4. *Bacillus thuringiensis*.

Bacillus thuringiensis (*Bt*) é uma bactéria Gram-positiva aeróbia da família Bacillaceae que produz inclusões cristalinas proteicas denominadas proteínas Cry durante a fase estacionária codificadas por diferentes genes *cry* (Bechtel e Bulla 1976). A espécie é produtora de δ -endotoxinas, proteínas com morfologia de cristais conhecidas como proteína Cry, composto que possui atividade entomopatogênica contra diversos insetos, sendo esse grupo um dos principais presentes o mercado de bioinseticidas. As proteínas Cry são sintetizadas na forma de protoxinas. Desta forma, sua ação depende de processos de ativação, que ocorrem no interior do aparelho digestório do inseto. Atualmente, há dois modelos, baseados em dados experimentais, que explicam o modo de ação das toxinas Cry. As primeiras etapas desses dois modelos são idênticas: após a ingestão dos cristais, esses são solubilizados no intestino do inseto, local com pH alcalino, liberando as protoxinas que são clivadas por proteases do próprio inseto, resultando em toxinas ativas, com cerca de 60 a 70% do tamanho da protoxina. A toxina ativa é capaz de ligar-se a receptores específicos presentes nas microvilosidades das células intestinais do inseto. A ação das toxinas resulta na paralisia do aparelho digestório, ocasionando morte por inanição, paralisia geral dos músculos e septicemia (BRAVO et al., 2007).

Valicente (2023) aponta que o produto biológico à base da bactéria *Bt* é uma importante ferramenta para o Manejo Integrado de Pragas e para suporte ao manejo de resistência das lagartas aos inseticidas químicos. “A aplicação do *Bt* pode ser feita com o pulverizador costal ou com o trator, sempre com um espalhante. A recomendação é aplicar o produto no estágio inicial da lagarta, logo quando aparecem e estão pequenos”. Valicente ressaltou que os produtos à base de *Bt* têm uma melhor

ação quando as lagartas são pequenas, de recém-nascidas até no máximo quatro dias de idade (medindo até cerca de 5 mm de comprimento), dependendo da espécie. Nesta idade o pH intestinal do inseto é básico, situação que favorece a ação das proteínas Bt. O posicionamento deste produto biológico no campo é essencial para causar a mortalidade desejada e é dependente da região e do início de ataque da lagarta-do-cartucho. “O produto deve ser aplicado, quando possível, após as 16 horas, por causa da incidência dos raios ultravioletas, que são os principais agentes que desativam as partículas desse biopesticida no campo. Essa aplicação deve ser adequada para a necessidade da cultura, com o tamanho e toda a logística da propriedade. O outro motivo é que a lagarta-do-cartucho possui hábito noturno e inicia sua alimentação no começo da noite. Se a pulverização for feita à tarde, haverá uma menor exposição do bioproduto porque não há radiação ultravioleta, e haverá o consumo do Bt que foi pulverizado sobre as folhas”, orienta o cientista da Embrapa.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O levantamento dos dados foi realizado no sistema de rede do Laboratório de Fitossanidade da Coopacer que fica situado em São Gotardo, Minas Gerais. O laboratório está no mercado realizando análises fitossanitárias a mais de 10 anos e há 7 anos vem realizando análises de controle de qualidade de produtos biológicos *On farm* para os produtores rurais de Minas Gerais e Goiás.

O protocolo utilizado para realizar o controle de qualidade das amostras foi baseado em Monnerat et al.(2018) para avaliação de *Bacillus thurigiensis* e Bettioli et al.(2022) para *Bacillus* sp. Anteriormente à publicação de Bettioli et al. (2022) seguiu-se o recomendado pela Monnerat et al. (2020). A única modificação foi que no laboratório há o plaqueamento também do inóculo primário nas mesmas condições que o produto multiplicado, pois a leitura em Unidades formadora de colônia (UFC) por ml de produto é feita comparando morfológicamente as colônias do inóculo primário com as colônias do produto multiplicado, além do conhecimento que se tem destas pela literatura. Para detectar presença de contaminantes de origem fúngica é feito o plaqueamento das amostras em meio de cultivo BDA na diluição 10^2 . Para quantificação de Coliformes Totais, *Eschechia Coli*, *Salmonella* sp. e *Enterococcus* sp. foi utilizada a metodologia de Monnerat et al. (2018) e Ministério da saúde (2011).

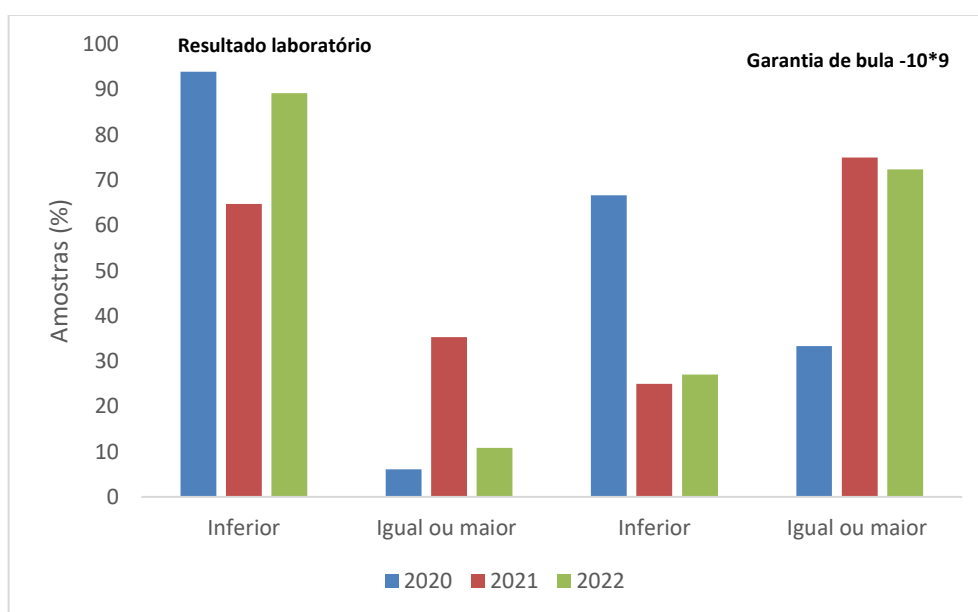
A garantia do produto *On farm* foi avaliada sempre em comparação morfológica com o inóculo primário que na quase totalidade dos casos se tratava de um produto comercial já registrado. Por utilizar esta metodologia comparativa, o laboratório avisa aos clientes e mantém no laudo que estes devem validar a origem do produto comercial. Este produto representa o mesmo lote utilizado para a multiplicação. A interpretação da garantia do produto multiplicado pelos produtores e neste trabalho foi realizada comparando com as médias do resultado encontrado do produto comercial no laboratório, mesma metodologia usada para avaliação do multiplicado e a média da garantia de bula dos principais produtos comercializados à base de *Bacillus subtilis* e *Bacillus thurigiensis*.

Devido as diferenças nos resultados das amostras, quando foi rodada a estatística no programa RStudio não se encontrou diferença entre elas, por isso, optou-se por não realizar as comparações estatisticamente

4. RESULTADOS / ANÁLISE DOS DADOS

A garantia entregue pelo produto *On farm* à base de *Bacillus subtilis* nos estados de Minas Gerais e Goiás mostraram que quando se comparou a garantia do multiplicado com o resultado do produto comercial analisado em laboratório apenas no ano de 2021 foi obtido acima de 35% multiplicações onde os resultados foram iguais ou superiores ao do produto comercial. Quando fizemos a comparação com a garantia de bula, observamos que apenas o ano de 2020 obteve baixas porcentagens e que nos anos de 2021 e 2022 tivemos resultados superiores ou iguais aos da bula em 75% e 72% dos casos, respectivamente (Gráfico 1).

Gráfico 1. Porcentagem de amostras de produtos *On farm* de *Bacillus subtilis* que mostraram resultados inferiores ou iguais e maiores quando comparados ao inóculo primário (produto comercial).

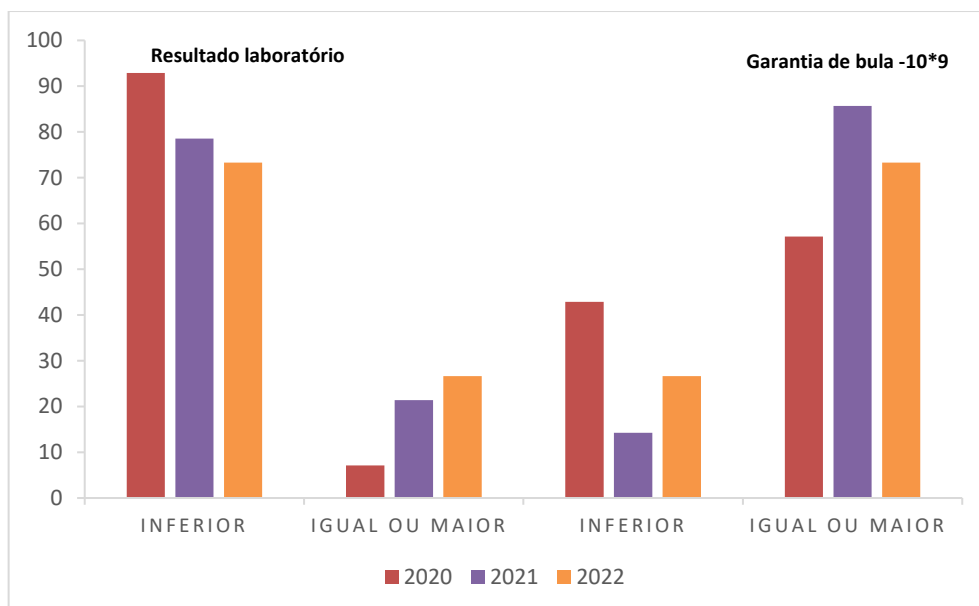


FONTE: O autor (2023)

Foi observado o mesmo padrão de resultados para o *Bacillus thuringiensis* que quando comparado o resultado da multiplicação com a garantia de bula média notou-se que os anos de 2021 e 2022 tiveram resultados iguais a superiores a estes em 86% e 76% dos casos. Já quando foi comparado com resultados de laboratório foi visto que no ano de 2021 e 2022 as porcentagens foram, 21 e 27%, respectivamente (Gráfico 2). Boaventura et al., 2015 mostraram não haver eficiência do BT produzido

On farm no controle de lagartas *Helicoverpa armígera*. Já Bocatti et.,al (2022) avaliando amostras de *Azospirillum* e *Bradyrizobium* diferenciaram 85 isolados e através de sequenciamento , mostraram que apenas um isolado era *azospirillum*. Santos et al. (2020) assim como os outros mostraram que de todas as amostras analisadas, nenhuma correspondia a *Chromobacterium subtsugae* e *Saccharopolyspora spinosa*, os alvos de multiplicação.

Gráfico 2. Porcentagem de amostras de produtos *On farm* de *Bacillus thurigiensis* que mostraram resultados inferiores ou iguais e maiores quando comparados ao inóculo primário (produto comercial).

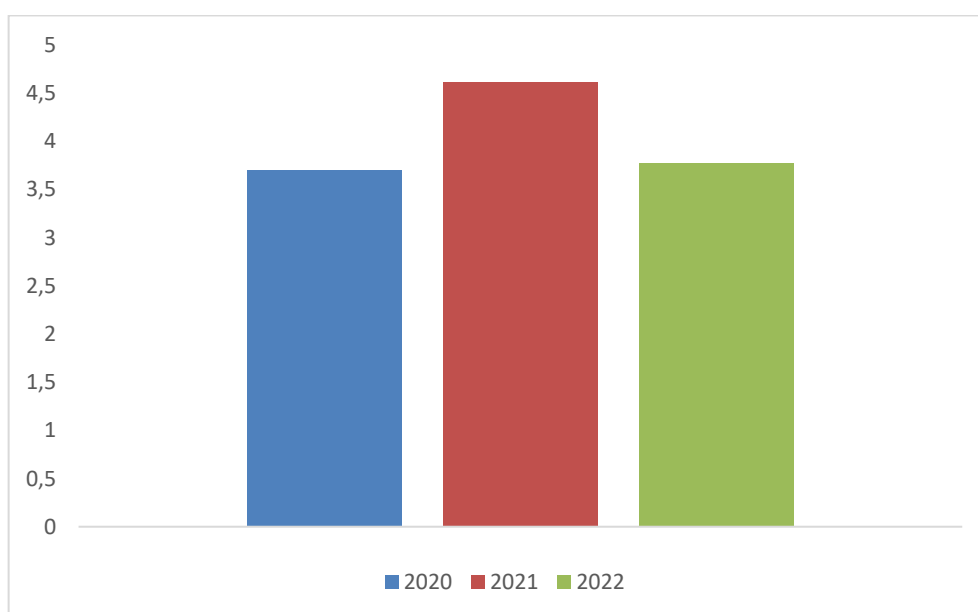


FONTE: O autor (2023)

Se tratando de contaminações na multiplicação quando olhamos para os produtos a base de *Bacillus subtilis* observamos a presença de fungo (Gráfico 3) foi baixa nos três anos avaliados, já a contaminação por bactéria representada pela análise de patógenos de vertebrados mostrou que em nenhum dos anos tivemos presença de *Samonella sp.*, e que os anos de 2021 e 2022 teve a tendência de aumentar a proporção de amostras que continham *Enchechia Coli* e *Enterococcus sp.* e que no de 2021 tivemos menos Coliformes totais (Gráfico 4). A porcentagem de presença de *Enterococcus sp.* se mostrou acima de 66% nos anos de 2021 e 2022, mostrando este como uma importante fonte de contaminação nestes anos (Gráfico 4). O gráfico mostra que a média das contagens (UFC) destes contaminantes quando

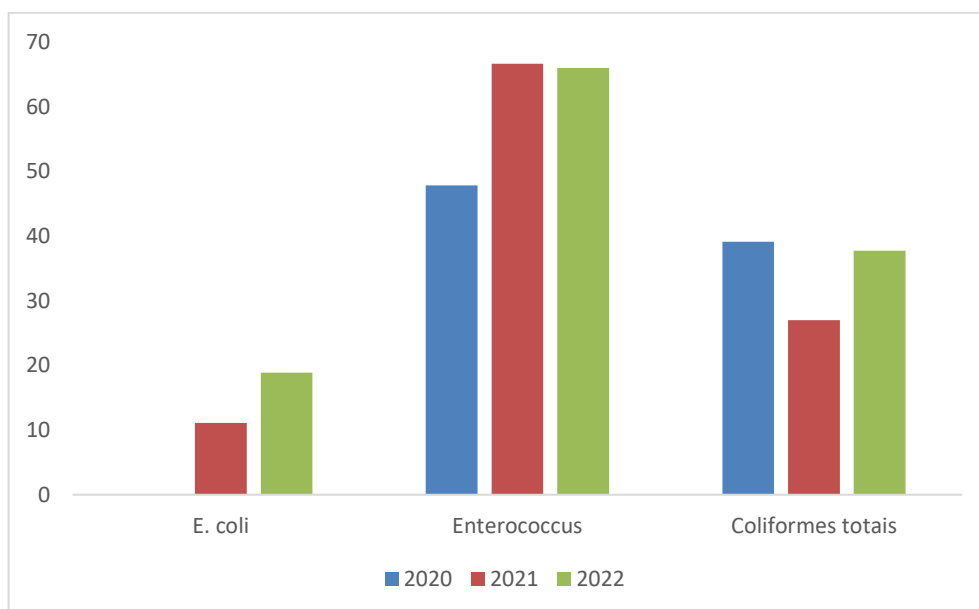
presentes mantiveram altas, chegando até mesmo na potência 10^7 (Gráfico 5). Produtos *On Farm* a base de *Bacillus thuringiensis* apresentaram presença de fungos acima de 10% nos anos de 2020 e 2022, já no ano de 2021 não apresentaram essa contaminação (Gráfico 6). A porcentagem de amostras contendo *Enterococcus sp.* se manteve elevada e em alta quantidade (Gráfico 07 e 08). Lana et al., 2019 avaliando 10 produtos vindos da multiplicação *On farm* no estado de Goiás, concluíram que apenas 1 continham o *Bacillus thuringiensis* com presença de cristais e que também assim como este trabalho havia alta presença do gênero *Enterococcus sp.*, como contaminante, o mesmo foi visto por Valicente, et al.(2018). Valicente et al. (2018) destacaram a presença de *Bacillus cereus* em algumas amostras, bactéria que causa graves doenças em humanos imunocomprometidos como pneumonia, endocardite e meningite. Bocatti et.,al(2022) mostrou também em amostras *On farm* de *Azospirillum* e *Bradyrizobium*, alta fonte de contaminação sendo 34 isolados considerados potenciais para patogenicidade humana. O mesmo confirmado por Santos et al. (2020) que avaliando produto *On farm* de *Chromobacterium subtsugae* e *Saccharopolyspora spinosa* observaram presença de coliformes totais. Na França também observaram esta mesma tendência de contaminação de produtos *On farm* segundo Felten et al. (2021).

Gráfico 3. Porcentagem de amostras de produtos *On farm* a base *Bacillus subtilis* que confirmaram presença de fungos nos anos de 2020, 2021 e 2022



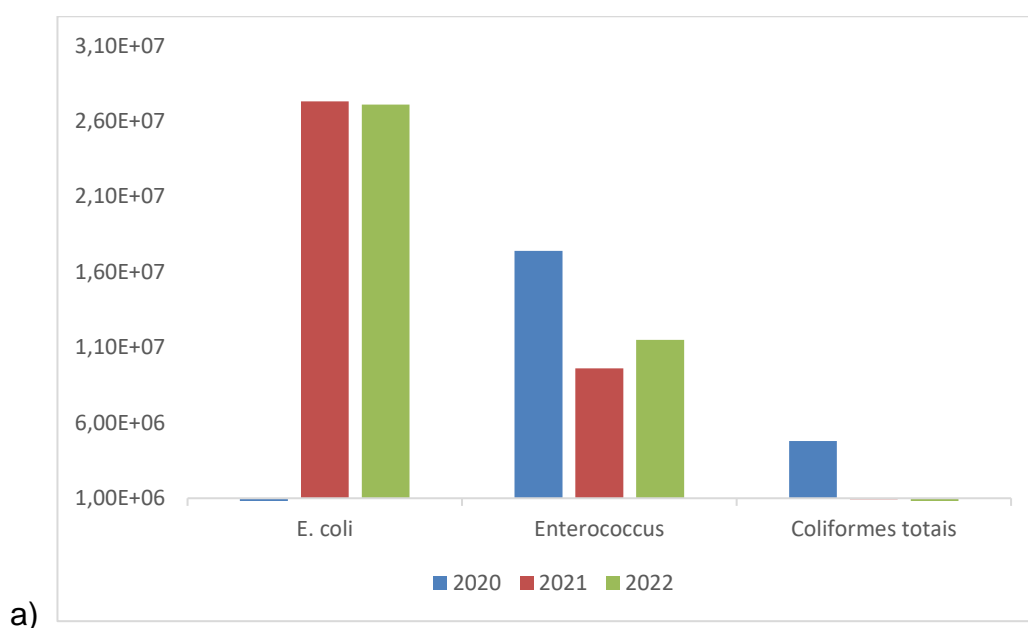
FONTE: O autor (2023)

Gráfico 4. Porcentagem de amostras de produtos *On farm* a base de *Bacillus subtilis* que confirmaram presença dos patógenos de vertebrados nos anos de 2020, 2021 e 2022



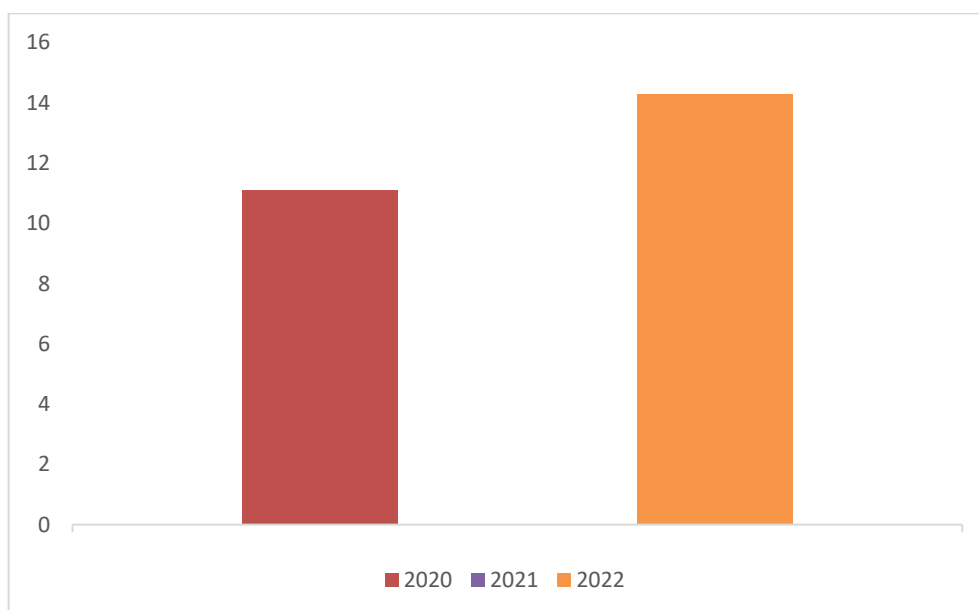
FONTE: O autor (2023)

Gráfico 5. Quantificação de patógenos de vertebrados em produtos *On farm* à base de *Bacillus subtilis*



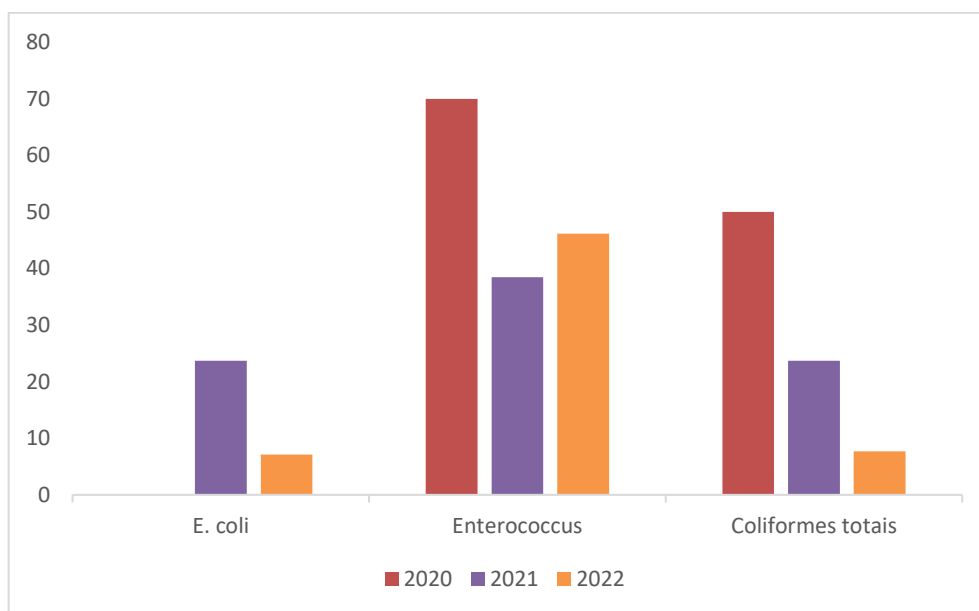
FONTE: O autor (2023)

Gráfico 06. Porcentagem de amostras de produtos *On farm* a base *Bacillus thurigiensis* que confirmaram presença de fungos nos anos de 2020, 2021 e 2022



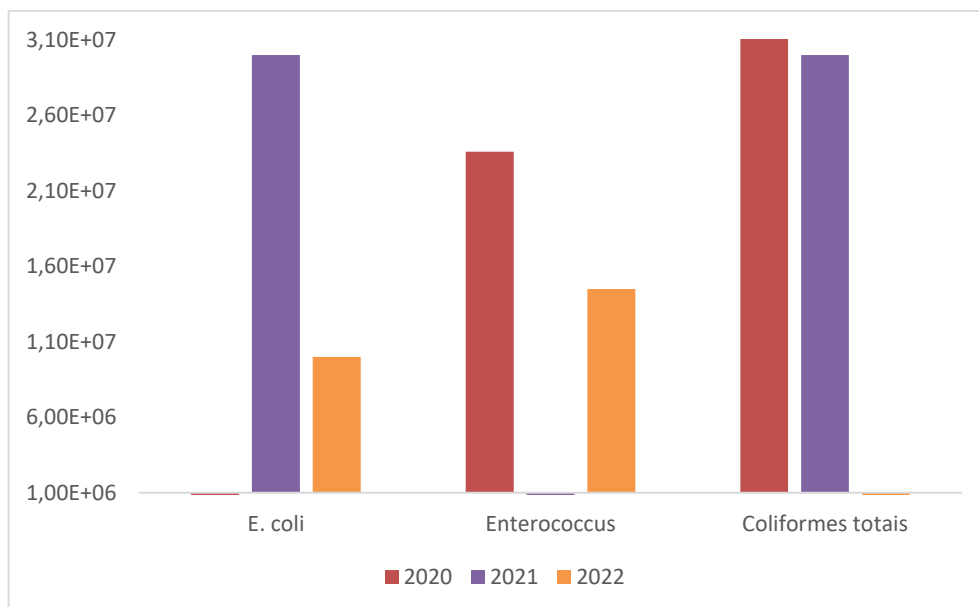
FONTE: O autor (2023)

Gráfico 07. Porcentagem de amostras de produtos *On farm* a base de *Bacillus thurigiensis* que confirmaram presença dos patógenos de vertebrados nos anos de 2020, 2021 e 2022



FONTE: O autor (2023)

Gráfico 08. Quantificação de patógenos de vertebrados em produtos *On farm* à base de *Bacillus thurigiensis*.



FONTE: O autor (2023)

Segundo o manual de produção e controle de qualidade de produtos biológicos à base de bactérias do gênero *Bacillus* para uso na agricultura desenvolvido pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (MONNERAT et al., 2020)), para contaminante como *Escherichia coli* a quantidade aceitável de colônias que pode estar presente nos meios seletivos deve ser menor ou igual a 400 colônias, para *Enterococcus* é uma quantidade abaixo de 50 colônias, já para fungos e *Salmonella sp.* não pode haver presença.

Visto isso, as amostras de produtos *On farm* a base de *Bacillus thurigiensis* e *Bacillus subtilis* se encontram inadequadas em sua grande maioria pela alta quantidade de UFC's, em especial, do patógeno *Enterococcus sp.* na maior parte das amostras avaliadas. Outro fator a considerar, agora positivamente para as análises *On farm* é que estas apresentaram baixa percentual de presença de fungos e não houve a presença de *Salmonella sp.* nos três anos estudados.

Os resultados mostraram em sua grande maioria que o ano de 2021 se destacou em qualidade de produto tanto para *Bacillus subtilis* quanto para *Bacillus thurigiensis* se diferenciando muito do ano de 2020, logo se esperava uma melhora

ainda melhor para 2022, o que não ocorreu, tendo na realidade uma pequena queda de qualidade em relação a 2021. Isto provavelmente ocorreu, devido ao ano de 2021 ser ainda na pandemia e no período desta 2020 e 2021 o laboratório para esta análise se fechou para os clientes que já as realizava, não aceitando novos clientes, quando chegou o ano de 2022 ele abriu novamente para todos. Isto fez com que tivéssemos mais amostras de produtores *On farm* com mais experiência no ano de 2021.

Outro fator a se considerar é que no momento da coleta da amostra existiam produtores que estavam iniciando suas multiplicações, com estrutura e conhecimentos precários, aqueles que não tinham estruturas de ponta, mas já tinham uma certa experiência de produção e produtores com uma biofábrica na fazenda e pessoas especializadas cuidando de todo o processo. Os dados apontaram que para produtos à base de *Bacillus subtilis* temos nos anos de 2021 e 2022 70% das amostras com qualidade igual ou superior a garantia de bula, 95% em média das amostras sem presença de fungos, nenhuma amostra com presença de *Salmonella sp*, 86% das amostras sem presença de *E. coli* e 65% sem a presença de Coliformes Totais, porém apenas 33% das amostras não continham a presença de *Enterococcus sp*. Já para produtos à base de *Bacillus thuringiensis* temos nos anos de 2021 e 2022 79% das amostras com qualidade igual ou superior a garantia de bula, 93% em média das amostras sem presença de fungos, nenhuma amostra com presença de *Salmonella sp*, 85% das amostras sem presença de *E. coli* e 85% sem a presença de Coliformes Totais, porém apenas 57% das amostras não continham a presença de *Enterococcus sp*.

Dentre as principais fontes de contaminação na produção de produtos biológicos, 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 (PINTO et al., 2000). Hoje, possivelmente tem fazendas que possuem fontes de contaminação de todos os tipos, mas existe um que mesmo em fazenda com alto controle e estrutura adequada ainda persiste: o uso de produtos comerciais para a multiplicação. Estes muitas das vezes já possuem contaminação que pode se elevar quando multiplicada.

Todos os resultados mostram que temos mais produtores trabalhando e buscando qualidade do que produtores que ainda estão trabalhando com pouco conhecimento e estruturas sem adequação. Porém os dados também apontam que o

alto índice de contaminação, principalmente, de *Enterococcus sp.*, nas análises leva a conclusão que muito se tem a fazer para diminuirmos os riscos da produção caseira.

5. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

- A maioria das multiplicações a base de *Bacillus subtilis* e *Bacillus thuringiensis* *On farm* mostraram uma garantia de produto adequada no ano de 2021 quando comparado a bula dos produtos comerciais e ao ano de 2020, mostrando uma evolução na qualidade.
- Apesar dos resultados não mostrarem, problemas com contaminação de fungos e *Samonella sp.*, temos um elevado índice de amostras com contaminação, em especial para o gênero *Enterococcus*.
- Os resultados apontam e mostram que hoje temos perfis diferentes de produtores *On farm*, do profissional ao amador, levando a resultados muito diferentes de qualidade de produção.
- Apesar dos resultados apresentarem uma evolução na qualidade do produto *On farm* no ano de 2020 para 2021, ainda é preciso muita melhoria no processo para se obter produtos com garantia de inóculo e contaminação de acordo com o exigido.
- Recomenda-se mais estudos sobre a prática *On farm* para se poder medir como está a qualidade e também uma legislação vigorosa para que esta consiga se manter viva.

REFERÊNCIAS

- BETTIOL, W. **Situação do Controle Biológico no Brasil**. Simpósio sobre Controle Biológico na Agricultura. Anais do Simpósio sobre Controle Biológico na Agricultura. Florianópolis: UFSC, 2022. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1149773/1/AA-BettiolW-COBIAGRI-2022.pdf>
- BETTIOL,W.et al. **Controle de qualidade e conformidade de produtos e fermentados à base de Bacillus spp.:** proposta metodológica.1º Edição. Jaguariúna,2022. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/239978/1/Bettiol-Controle-qualidade-2022-2.pdf>
- BOAVENTURA, H. A., et al. **Avaliação da eficiência do “Bt caseiro” no controle de lagartas de *Helicoverpa armigera***. In: SEMINÁRIO JOVENS TALENTOS,9, 2015, Santo Antônio de Goiás. **Coletânea dos resumos apresentados**.Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2015. p. 17.
- BOCATTI,C.R. et al. **Microbiological quality analysis of inoculants based on *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense* produced “on farm” reveals high contamination with non-target microorganisms**. Brazilian Journal of Microbiology ,2022,53:267–280
- BRASIL. Decreto nº 10.833, de 08 de outubro de 2021, paragrafo 8. **Isenção de registro**.2021.
- BRAVO, A., et al. **Mode of action of Bacillus thuringiensis Cry and Cyt toxins and their potential for insect control**. Toxicon, Amsterdam, v. 49, n. 4, p. 423-435, 2007.
- BECHTEL, D.B, BULLA L.A. **Estudo de microscópio eletrônico de esporulação e formação de cristais parasporais em *Bacillus thuringiensis*** . J Bacteriol 127(3):1472–1481,1976.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual técnico de diagnóstico laboratorial de Salmonella spp.: diagnóstico laboratorial do gênero Salmonella / Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz**. Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas, Instituto Adolfo Lutz. – Brasília : Ministério da Saúde, 2011.
- CROPLIFE. **Cresce a adoção de produtos biológicos pelos produtores brasileiros**. .2021. Disponível em: <https://croplifebrasil.org/noticias/cresce-a-adocao-de-produtos-biologicos-pelos-agricultores-brasileiros/>. Acesso em 12 de maio de 2023.
- EAEL. et al. **Ecology and genomics of Bacillus subtilis**. Trends Microbiol. 2008 June ; 16(6): 269. doi:10.1016/j.tim.2008.03.004.
- EMBRAPA.**Produção de microorganismos para uso próprio na agricultura (on farm)**. Declarações oficiais, 2021.
- FELTEN,B.M.et. al. **Comparative phenotypic, genotypic and genomic analyses of Bacillus thuringiensis associated with foodborne outbreaks in France**. PLoS

ONE 16(2): e0246885,2021.Disponível em:

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246885>

FIDELIS.C. **O futuro é biológico.** Comunicação sistema Faeg/Senar, 2022.

Disponível em: <https://cnabrazil.org.br/noticias/o-futuro-e-biologico>

GALZER, E. C. W.,; FILHO, W. S. A. **Utilização do *Bacillus thuringiensis* no controle biológico de pragas.** Revista Interdisciplinar de Ciência Aplicada, v. 1, n. 1, p. 13-16, 2016

GUTIERREZ,M.E.M. et al. ***Bacillus thuringiensis*.** In: Souza,B., Vázquez, L., Marucci, R (eds) Natural Enemies of insect pests in Neotropical Agroecosystems. Springer, Cham,2019. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-030-24733-1_21

HAMMAMI, I.et al. **Optimization and biochemical characterization of a bacteriocin from a newly isolated *Bacillus subtilis* strain 14B for biocontrol of *Agrobacterium* spp. strains.** Letters in Applied Microbiology, v.48, p.253–260, 2009.

LANA,U.G.P. et al. **Avaliação da qualidade de biopesticidas à base de *Bacillus thuringiensis* produzidos em sistema “on farm”.** SeteLagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2019.Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 191. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/206791/1/bol-191.pdf>

LANNA,R.F. et al. **Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*.** Revista Tropica – Ciencias Agrarias e Biologicas, V. 4, N. 2, p. 12, 2010.

LEELASUPHAKUL, W. et al. **Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit.Postharvest.** Biology and Technology, v.48, p.113-121, 2008.

LI, Y. et al. **Surfactin and fengycin contribute to the protection of a *Bacillus subtilis* strain against grape downy mildew by both direct effect and defence stimulation.** Molecular Plant Pathology, 20, 1037–1050,2019.

MONNERAT, R.G *et al.* **Manual de produção e controle de qualidade de produtos biológicos à base de bactérias do gênero *Bacillus* para uso na agricultura.** 1. ed. Brasília: Embrapa, 2020. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/213246/1/documentos-36916.pdf>

MONNERAT, R.G *et al.* **Produção e controle de qualidade de produtos biológicos à base de *Bacillus thuringiensis* para uso na agricultura.** 1. ed. Brasília: Embrapa, 2018. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/185073/1/documentos-360Final.pdf>

PINTO,T.J.A.et al. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos.** 2º edição. São Paulo: Atheneu, 2003.

PROGRAMA NACIONAL DE BIOINSUMOS. Disponível em :

<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inovacao/bioinsumos/> . Acesso em 20/05/2023

RESEARCH AND MARKETS,2022-2027. **Biopesticides market: growth, trends, Covid-19 impact, and forecasts.** Disponível em: <<https://www.researchandmarkets.com/reports/5165415/>> . Acesso em 12 de maio de 2023.

SUN, B. et al. (2020a) **Bacillus subtilis** biofertilizer mitigating agricultural ammonia emission and shifting soil nitrogen cycling microbiomes. *Environment International*, 144, 105989.

VALICENTE, F.H. et al. **Riscos à produção de biopesticida à base de *Bacillus thurigiensis***. Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2018. Circular técnica 239. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1093165/1/circ239.pdf>

VALICENTE, F.H. **Agente biológicos para proteção de cultivos**. EMBRAPA, 2023. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/80764430/showtec-2023-debate-agentes-biologicos-para-protecao-de-cultivos>