

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE SÃO PAULO

CAMPUS AVARÉ

CURSO DE BACHARELADO EM ENGENHARIA DE BIODISSISTEMAS

Iris de Lima

**ESTUDO DE RECIPIENTES PARA PRODUÇÃO DE BIOINSUMOS *ON FARM* PARA PEQUENOS E
MÉDIOS PRODUTORES.**

AVARÉ

2024

Iris de Lima

ESTUDO DE RECIPIENTES PARA PRODUÇÃO DE BIOINSUMOS *ON FARM* PARA PEQUENOS E MÉDIOS PRODUTORES.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Engenharia de Biosistemas do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo - *Campus Avaré*, como requisito parcial à obtenção do título de Engenheiro de Biosistemas.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Marcela Pavan Bagagli

AVARÉ

2024

Catálogo na fonte
Instituto Federal de São Paulo – Campus Avaré

Lima, Iris de.

Estudo de recipientes para produção de bioinsumos *on farm* para pequenos e médios produtores. / Iris de Lima - Avaré, 2024.

73 p.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Marcela Pavan Bagagli

Monografia (Graduação - Bacharelado em Engenharia de Biosistemas) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo - Campus Avaré, Avaré, 2024.

1. Bioinsumos 2. *Beauveria bassiana*; 3. *Bacillus thuringiensis* I. Bagagli, Marcela Pavan. II. Título.

Ata de Defesa de Trabalho de Conclusão de Curso - Graduação

No dia 18 de novembro de 2024 realizou-se a sessão pública de defesa do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado **ESTUDO DE RECIPIENTES PARA PRODUÇÃO DE BIOINSUMOS ON FARM PARA PEQUENOS E MÉDIOS PRODUTORES**, apresentado pela aluna **Iris de Lima (AV3011976)** do Curso **SUPERIOR EM ENGENHARIA DE BIOSSISTEMAS**, (Câmpus Campus Avaré). Os trabalhos foram iniciados às 19:00 pela Professora presidente da banca examinadora, constituída pelos seguintes membros:

Membros	IES	Presença (Sim/Não)	Aprovação/Conceito
Marcela Pavan Bagagli (Presidente/Orientadora)	IFSP- Campus Avaré	Sim	Aprovado
Luciano Delmondes de Alencar (Examinador 1)	IFSP - Campus Avaré	Sim	Aprovado
Vinicius Augusto Ribeiro Moreira (Examinador 2)	Esalq - USP	Sim	Aprovado

Observações:

A banca examinadora, tendo terminado a apresentação do conteúdo da monografia, passou à arguição da candidata. Em seguida, os examinadores reuniram-se para avaliação e deram o parecer final sobre o trabalho apresentado pela aluna, tendo sido atribuído o seguinte resultado:

☒ Aprovado(a)

☐ Reprovado(a)

Nota Final: 9,70

O segundo examinador é avaliador externo:

☒ Sim ☐ Não

Proclamados os resultados pelo presidente da banca examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, eu lavrei a presente ata que assino juntamente com os demais membros da banca examinadora.

Campus Avaré,

18 de novembro de 2024

Documento assinado eletronicamente por:

- Marcela Pavan Bagagli, PROFESSOR ENS BÁSICO TECN TECNOLÓGICO, em 18/11/2024 21:57:53.
- Luciano Delmondes de Alencar, TÉCNICO EM AGROPECUÁRIA, em 18/11/2024 22:17:50.

Este documento foi emitido pelo SIAP em 15/11/2024. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QRCode ao lado ou acesse <https://siap.ifsp.edu.br/autenticar-documento/> e forneça os dados abaixo:

Código Verificador: 844156
Código de Autenticação: 521d946ca0



Dedico este trabalho aos meus amados vovô Zé e vovó Vera, que, mesmo já estando com o Senhor, foram meus maiores incentivadores. Seu amor, apoio e fé em mim, especialmente nos momentos em que eu mesma duvidei, me fizeram acreditar que eu poderia chegar até aqui. Tenho vocês na memória em cada conquista e levo o legado de seus ensinamentos sempre comigo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela minha vida e pelas imensas bênçãos que ele me proporcionou durante a minha graduação. Sou também imensamente grata à minha mamãe Adriana de Lima Souza e ao meu papai Alexandre Pereira de Lima, por todo o esforço, dedicação e amor que sempre me dedicaram ao longo desses anos. Vocês são minha base, e é com todo o meu coração que digo: eu amo muito vocês.

Aos meus irmãos, Samuel de Lima e Ingrid de Lima, e ao meu irmão de coração, Lucas Tadeu dos Santos, que estiveram sempre ao meu lado, trazendo leveza e alegria a cada etapa dessa jornada. Vocês tornaram tudo mais suportável e divertido, e eu os amo muito.

Aos meus amigos e companheiros Richard, Vinicius, Luiza, João, Marcos e todos que me acompanharam nessa caminhada, obrigada por cada momento compartilhado. E, em especial, às minhas melhores amigas Helena Gomes e Huany Ribeiro, que riram, choraram e me acompanharam em cada momento durante essa trajetória. Não esquecerei nenhum dos nossos lindos momentos, seja comendo, brincando, falando atrocidades saibam que o laço que criamos é inquebrável, e eu as amo profundamente.

À minha querida professora Marcela Bagagli, a quem admiro e amo muito, que sempre foi uma verdadeira mãe e amiga durante toda essa jornada. Sua orientação e carinho foram fundamentais para que eu chegasse até aqui.

Agradeço profundamente aos incríveis técnicos do IF e a todos os professores com quem tive a honra de aprender tanto ao longo dessa jornada acadêmica. Suas orientações e ensinamentos foram essenciais para o meu crescimento. E ao IFSP, por me proporcionar todas essas experiências e pela infraestrutura que tornou possível a realização deste trabalho.

À empresa Raiar Orgânicos, sou imensamente grata pela bolsa concedida e pelos insumos disponibilizados, que foram fundamentais para a concretização deste projeto.

E por fim, mas não menos importante, ao meu noivo Henrique Araujo, que me apoiou e acolheu nos momentos mais difíceis. Obrigada por aguentar meus surtos e me amar de forma inesperada e incondicional. Eu te amo muito.

“O segredo, querida Alice, é rodear-se de pessoas que te façam sorrir o coração. É então, e só então, que você estará no País das Maravilhas.”

(Lewis Carroll)

RESUMO

A busca por soluções sustentáveis, o aumento global da produção de alimentos orgânicos e a implementação de práticas como o manejo integrado de pragas (MIP) têm impulsionado o uso de bioinsumos, especialmente aqueles de origem microbiológica, que atuam como bioinseticidas. Para pequenos produtores rurais, os bioinsumos representam uma alternativa eficaz, já que oferecem uma abordagem mais sustentável e em alguns casos mais eficaz e benéfico no controle de pragas e doenças. Esse contexto amplia a necessidade de métodos acessíveis e eficientes para que os pequenos produtores possam produzir seus próprios bioinsumos diretamente na propriedade, através da chamada produção *on farm*, reduzindo os custos, uma vez que elimina a necessidade de transporte e armazenamento de produtos biológicos, mas enfrenta desafios relacionados à falta de controle rigoroso e de infraestrutura adequada. O presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar diferentes recipientes para a produção de bioinsumos microbiológicos de forma segura, acessível e eficaz aos pequenos produtores *on farm*. Desta forma, avaliou-se quatro tipos de recipientes (garrafas PET, sacos de polietileno, sacos de polipropileno e barricas de polietileno de alta densidade) para serem utilizados como reatores na multiplicação de microrganismos por fermentação em estado sólido (FES) *on farm*, visando atender pequenos produtores rurais. Os microrganismos modelos utilizados foram *Beauveria bassiana* e *Bacillus thuringiensis*, amplamente empregados na agricultura como bioinseticidas. O arroz parboilizado foi utilizado como substrato, e os recipientes foram submetidos a protocolos específicos de preparo para garantir a ausência de contaminantes. Após a inoculação e incubação, as análises mostraram que ambos os microrganismos se desenvolveram de forma satisfatória em todos os reatores, com contagens variando entre 10^8 e 10^9 UFC/mL, sem diferenças significativas entre os recipientes. Não foram detectados contaminantes patogênicos, como coliformes termotolerantes e *Salmonella spp.*, o que demonstra que os métodos propostos são seguros para pequenos produtores. O estudo concluiu que os recipientes avaliados são opções viáveis e de baixo custo para a produção *on farm* de bioinsumos, embora ajustes sejam recomendados para reduzir a variabilidade dos processos.

Palavras-chave: Bioinsumos; *Beauveria bassiana*; *Bacillus thuringiensis*; Fermentação em estado sólido; reatores; *on farm*;

ABSTRACT

The search for sustainable solutions, the global increase in organic food production, and the implementation of practices such as Integrated Pest Management (IPM) have driven the use of bio-inputs, particularly those of microbiological origin, which act as bioinsecticides. For small rural producers, since they offer a more sustainable approach and, in some cases, a more effective and beneficial solution for pest and disease control. This context highlights the growing need for accessible and efficient methods that enable small-scale producers to produce their own bio-inputs directly on their farms, through so-called "on-farm" production, thereby reducing costs by eliminating the need for transportation and storage of biological products. However, this approach faces challenges related to the lack of strict quality control and appropriate infrastructure. The present study aimed to evaluate different containers for the safe and accessible production of microbiological bio-inputs by small producers through on-farm production, ensuring product quality and efficacy. To this end, four types of containers (PET bottles, polyethylene bags, polypropylene bags, and high-density polyethylene barrels) were evaluated as reactors for the multiplication of microorganisms via solid-state fermentation (SSF) on-farm, with a focus on serving small rural producers. The model microorganisms used were *Beauveria bassiana* and *Bacillus thuringiensis*, both widely employed in agriculture as bioinsecticides. Parboiled rice was used as a substrate, and the containers were subjected to specific preparation protocols to ensure the absence of contaminants. After inoculation and incubation, analyses showed that both microorganisms developed satisfactorily in all reactors, with counts ranging between 10^8 and 10^9 CFU/mL, with no significant differences between containers. No pathogenic contaminants, such as thermotolerant coliforms and *Salmonella* spp., were detected, demonstrating that the proposed methods are safe for small producers. The study concluded that the evaluated containers are viable and low-cost options for on-farm bio-input production, although adjustments are recommended to reduce process variability.

Keywords: Bio-inputs; *Beauveria bassiana*; *Bacillus thuringiensis*; Solid-state fermentation; Reactors; On-farm.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Importância de mercado dos segmentos biológicos nas culturas totais entre 21/22	17
Figura 2 – Definições de produtos biológicos.....	19
Figura 3 - Biofábricas on farm constituída por equipamentos em material sanitário e instalações com elevado padrão de controle para contaminantes. (a) Produto SoluBio® ; (b) Produto Allbiom®	29
Figura 4 - Biofábrica on farm constituídas por equipamentos de baixo custo.....	29
Figura 5 - Os quatro tipos de reatores testados durante o experimento. (a) Barrica; (b) Garrafa PET; (c) Saco PE; (d) Saco PP.....	31
Figura 6 - Configuração final de cada reator após montagem e preparação, seguindo a mesma ordem dos tipos anteriores: (a) Barrica; (b) Garrafa PET; (c) Saco PE; (d) Saco PP...	34
Figura 7 - Condições dos reatores após o crescimento dos microrganismos de interesse, evidenciando ausência de contaminações visíveis em todos os recipientes.....	35
Figura 8 - Aplicação dos manuais de treinamento elaborados para pequenos produtores, demonstrando o uso prático das instruções no campo.....	39
Figura 9 – pH e sólidos solúveis dos extratos obtidos do cultivo de (a) <i>B. Bassiana</i> e (b) <i>B. thuringiensis</i> nos diferentes reatores avaliados	40
Figura 10 – Concentração média de propágulos de <i>B. bassiana</i> (a) nos extratos obtidos do cultivo nos diferentes reatores avaliados (UFC/mL) e (b) por massa de substrato seco (UFC/g) utilizado nos cultivos e respectivos erros-padrão.	41
Figura 11 – Concentração média de esporos de <i>B. thuringiensis</i> (a) nos extratos obtidos do cultivo nos diferentes reatores avaliados (UFC/mL) e (b) por massa de substrato seco (UFC/g) utilizado nos cultivos e respectivos erros-padrão.	44

Figura 12 – Concentração média de colônias atípicas (UFC/mL) presentes na contagem de (a) propágulos de *B. bassiana* e (b) esporos de *B. thuringiensis*.46

LISTA DE ABREVIATURAS

MIP- Manejo Integrado de Pragas

Bt- Bacillus thuringiensis

B. thuringiensis - Bacillus thuringiensis

B. bassiana – Beauveria bassiana

FES- Fermentação em Estado Sólido

UV- Ultravioleta

MAPA- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

PDA- Potato Dextrose Agar

UFC- Unidades Formadoras de Colônia

ppm- Parte por Milhão

μL- Microlitros

Rpm- Rotações por Minuto

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.2. PROBLEMATIZAÇÃO	17
2. OBJETIVOS.....	18
2.1. Objetivo Geral	18
2.2. Objetivos específicos.....	18
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
3.1. Produtos biológicos na agricultura	19
3.2. Cultivo de microrganismos	22
3.3.1. Fermentação em Estado Solido (FES)	23
3.3.2. Controle da contaminação em processos fermentativos	24
3.3. Controle biológico de pragas com microrganismos entomopatogênicos	24
3.3.1. <i>Beauveria bassiana</i>	25
3.3.2. <i>Bacillus thuringiensis</i>	27
3.4. Produção de bioinsumos on farm por pequenos produtores	25
4. METODOLOGIA	31
4.1. Reatores, substrato e microrganismos para a Fermentação em Estado Sólido (FES)	31
4.2. Procedimentos de preparo dos reatores	33
4.3. Inoculação dos microrganismos.....	35
4.4. Incubação	36
4.5. Extração e Análise dos extratos	Erro! Indicador não definido.
4.5.1. Quantificação de propágulos de <i>B. bassiana</i>	37
4.5.2. Quantificação de esporos de <i>B. thuringiensis</i>	37
4.5.3. Quantificação de coliformes termotolerantes.....	38
4.5.4. Identificação da presença de <i>Salmonella</i> sp.	38
4.6. Elaboração de material de treinamento	38
4.7. Análises Estatísticas	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	39
5.1. pH e Sólidos Solúveis dos extratos.....	39
5.1. Quantificação dos microrganismos de interesse nos extratos das fermentações	40
5.3. Presença de contaminantes microbiológicos nos extratos	44
5.5. Elaboração de materiais de treinamento	46
6.CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS.....	49
ANEXO 1	53

ANEXO 2	66
---------------	----

1. INTRODUÇÃO

A crescente demanda por práticas agrícolas sustentáveis e o aumento da produção orgânica têm impulsionado o uso de bioinsumos, especialmente aqueles de origem microbiológica, como parte de estratégias de manejo integrado de pragas (MIP). Bioinseticidas à base de microrganismos, como *Beauveria bassiana* e *Bacillus thuringiensis*, ganham destaque pela eficácia no controle de pragas, com menor impacto ambiental e sem os riscos à saúde humana que os pesticidas convencionais oferecem (Monnerat *et al.*, 2020). O mercado global de bioinsumos está em expansão, impulsionado por uma crescente conscientização sobre a sustentabilidade e pelas políticas que promovem a agricultura orgânica. O Brasil, por exemplo, tem registrado um aumento considerável na adoção de bioinsumos, com o mercado projetado para crescer 14% ao ano até 2027 (Brasil, 2019).

No entanto, apesar desse crescimento, pequenos produtores ainda enfrentam desafios relacionados ao custo e à acessibilidade dos bioinsumos, o que torna a produção local, conhecida como produção *on farm*, uma solução atraente (Valicente *et al.*, 2018). A produção *on farm* reduz significativamente os custos ao eliminar a necessidade de transporte e armazenamento, mas enfrenta desafios relacionados à falta de controle de qualidade, o que pode comprometer a eficácia e a segurança dos produtos.

O presente estudo avaliou a viabilidade de diferentes tipos de recipientes como reatores para a produção de bioinsumos *on farm*, utilizando *Beauveria bassiana* e *Bacillus thuringiensis* como microrganismos modelo, propondo alternativas de baixo custo e seguras para pequenos produtores, contribuindo para o fortalecimento da agricultura sustentável, de baixo impacto ambiental.

1.2. PROBLEMATIZAÇÃO

O principal desafio para pequenos produtores no uso de bioinsumos microbiológicos, como *Beauveria bassiana* e *Bacillus thuringiensis*, é o alto custo e a falta de acessibilidade. Essa barreira de custo torna essencial o desenvolvimento de soluções simples e baratas, como a produção *on farm*, para tornar a adoção dos bioinsumos uma realidade no contexto de pequenas propriedades rurais.

Entretanto, a produção *on farm* enfrenta outro problema crítico: a falta de controle de qualidade. O uso de instalações improvisadas e a ausência de procedimentos padronizados de esterilização podem resultar na contaminação do produto por microrganismos patogênicos, comprometendo tanto a segurança quanto a eficácia dos bioinsumos. Isso é especialmente preocupante, pois a presença de patógenos pode afetar a saúde dos produtores e comprometer a produtividade agrícola.

Dessa forma, a falta de controle rigoroso nos processos de produção *on farm* gera um dilema: embora seja uma solução econômica, ela frequentemente resulta em produtos de qualidade inferior, com potencial de contaminação que pode prejudicar os agricultores em vez de beneficiá-los. Esse trabalho busca viabilizar uma solução para esse problema, avaliando alternativas viáveis e seguras de reatores para produção *on farm*, garantindo tanto a acessibilidade quanto a qualidade dos bioinsumos microbiológicos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi avaliar a viabilidade de diferentes recipientes como reatores para a produção *on farm* de bioinsumos microbiológicos, com foco em pequenos produtores rurais. Essa pesquisa se alinha aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da ONU, em especial ao ODS 2, que visa acabar com a fome, alcançar a segurança alimentar e promover a agricultura sustentável, e ao ODS 17, que busca fortalecer parcerias e apoiar a capacitação em países em desenvolvimento.

2.2. Objetivos específicos

Os objetivos específicos do trabalho foram:

- a) Analisar a eficiência de diferentes recipientes, como garrafas PET, sacos de polietileno e barricas de polipropileno de alta densidade, na multiplicação de microrganismos por fermentação em estado sólido.
- b) Avaliar o desenvolvimento de *Beauveria bassiana* e *Bacillus thuringiensis* nos diferentes tipos de reatores, considerando as condições de fermentação *on farm*.

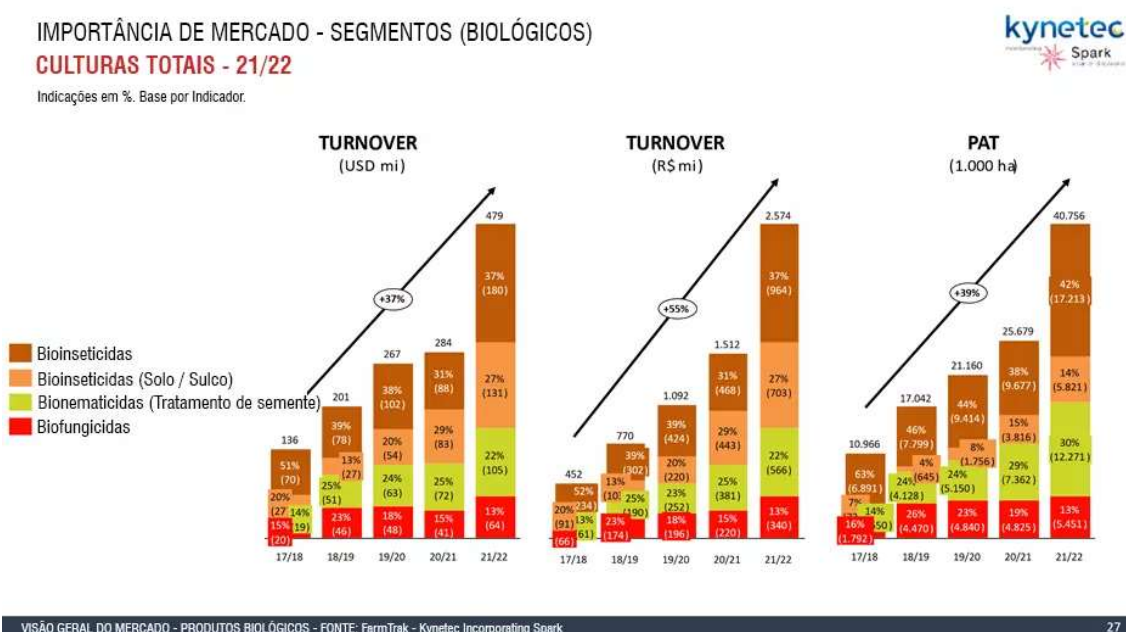
- c) Propor protocolos simples e eficientes de esterilização e controle de qualidade para cada tipo de recipiente, com o objetivo de minimizar a contaminação por microrganismos patogênicos como *Salmonella spp.* e coliformes termotolerantes.
- d) Elaborar materiais para difundir boas práticas de produção *on farm* para pequenos produtores;

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Produtos biológicos na agricultura

O Brasil tem se consolidado como um dos principais mercados para produtos biológicos aplicados à agricultura. Com a criação do Plano Nacional de Bioinsumos, o país experimenta um crescimento acelerado, registrando uma expansão anual de 28% no uso desses produtos (Brasil, 2021). Informações recentes reforçam essa tendência, revelando um aumento significativo na oferta de produtos comerciais. De 2021 para 2022, foram registrados 157 novos produtos biológicos, o que representa um crescimento impressionante de 70% em relação ao ano anterior (Brasil, 2022). Conforme ilustrado na Figura 1, 65% desses novos produtos são formulados com base em microrganismos, destacando o avanço dessa tecnologia no setor agrícola.

Figura 1 – Importância de mercado dos segmentos biológicos nas culturas totais entre 21/22

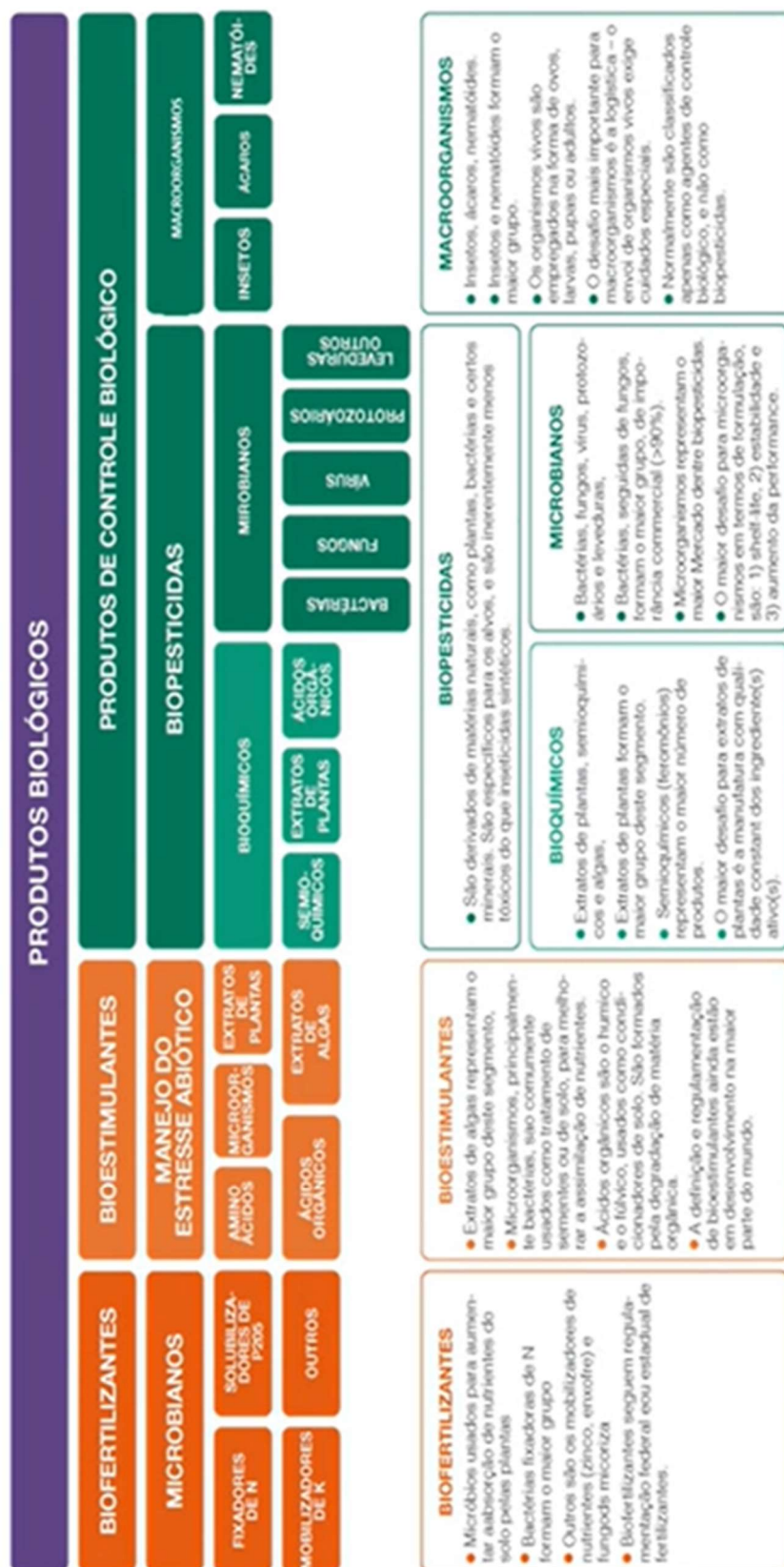


Fonte: Kynetec Incorporating Spark, 2023.

O Decreto nº 10.375, de 26 de maio de 2020, que institui a Política Nacional de Inovação, também reforça o papel de bioinsumos no contexto da agricultura sustentável no Brasil. Bioinsumos são definidos como produtos, processos ou tecnologias de origem biológica que proporcionam ganhos de produtividade e sustentabilidade ao setor agrícola. Essa definição inclui uma variedade de agentes biológicos, como microrganismos, que são utilizados para melhorar o manejo do solo, o controle de pragas e o desenvolvimento das plantas. A aplicação desses insumos biológicos está diretamente alinhada aos princípios da Política Nacional de Inovação, que busca promover o desenvolvimento tecnológico e a competitividade do país por meio de práticas sustentáveis e inovadoras (Brasil, 2021).

Os bioinsumos representam uma solução essencial para a agricultura sustentável, reduzindo a dependência de agrotóxicos químicos e promovendo o uso de recursos biológicos para melhorar a produtividade agrícola (Brasil, 2019). Esses insumos, que incluem biofertilizantes, bioestimulantes e bioinseticidas, vêm ganhando destaque em práticas como o manejo integrado de pragas (MIP), que busca alternativas mais ecológicas para o controle de pragas e o aumento da fertilidade do solo (Monnerat *et al.*, 2020). A Figura 2 apresenta um os principais bioinsumos e algumas definições.

Figura 2 – Definições de produtos biológicos. Fonte: Dunham Trimmer – International Bio Intelligence (ABIM, 2018) Apud. Panutti, 2023.



Fonte: AGROADVANCED

A produção *on farm* de bioinsumos, que se refere à fabricação de bioinsumos diretamente nas propriedades agrícolas para uso próprio, tem ganhado espaço devido à redução de custos e facilidade de acesso aos produtos. No entanto, a ausência de regulamentação específica e a falta de controle rigoroso da qualidade representam desafios significativos para o processo, em especial para os pequenos produtores (Lana *et al.*, 2022). Em relação a esta produção, a Embrapa (2021) sugere que haja na legislação brasileira a exigência do cadastro das biofábricas junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e a supervisão por técnicos habilitados, a multiplicação apenas de microrganismos que constam em listas oficiais do MAPA adquiridos de bancos de germoplasma reconhecidos, além do controle de qualidade da produção.

A falta de controle na produção *on farm* resulta frequentemente em produtos com alta contaminação, comprometendo sua eficácia e segurança. Santos *et al.* (2020) identificaram contaminação em 100% das amostras analisadas no Vale do São Francisco, com a presença de coliformes termotolerantes e *Salmonella* spp. em mais de 70% dos produtos. Esses resultados ressaltam a necessidade de maior controle e infraestrutura para a produção *on farm*, especialmente quando comparados com bioinsumos comerciais que demonstram maior segurança microbiológica (Lana *et al.*, 2022).

3.2. Cultivo de microrganismos

O cultivo de microrganismos, conceito comumente denominado de fermentação, tem sido uma prática milenar, com registros de técnicas fermentativas desde 4000 a.C. Ao longo do tempo, esses processos foram sendo aperfeiçoados, permitindo maior controle e eficiência na fermentação. Atualmente, a fermentação é um processo amplamente utilizado, com aplicação em várias indústrias, incluindo a farmacêutica, alimentícia e agrícola (Monnerat *et al.*, 2020).

Podemos dividir os processos fermentativos em 5 principais objetivos: produção de biomassa microbiana, produção de enzimas microbianas, produção de metabólitos microbianos, produção de produtos recombinantes, e modificação de compostos introduzidos no processo de fermentação. Em qualquer um desses processos, o meio de cultivo, técnicas de esterilização, controle de contaminação e condições ótimas de cultivo

desempenham papéis fundamentais na produtividade do processo e qualidade do produto (Stanbury; Whitaker; Hall, 1995; Schmidell *et al.*, 2001).

Os processos fermentativos podem ser do tipo fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FS). A FES, que é amplamente utilizada para a produção de fungos filamentosos como *Beauveria bassiana*, não utiliza água livre circulante, enquanto a FS envolve substratos solúveis em meio aquoso (Schimidell *et al.*, 2001; Mattedi *et al.*, 2023).

A fermentação em estado sólido apresenta benefícios ambientais, como a utilização de resíduos agroindustriais como substrato, menor consumo de energia e geração de resíduos, enquanto a fermentação submersa é mais escalável, com maior controle de condições e reprodutibilidade (Valicente *et al.*, 2018; Mattedi *et al.*, 2023).

Em situações em que não se tem acesso à processos fermentativos submersos controlados, a fermentação em estado sólido pode ser uma alternativa, podendo ser realizada em condições simples e seguras, tal qual demonstrado por Ferreira *et al.* (2019).

3.3.1. Fermentação em Estado Sólido (FES)

A fermentação em estado sólido (FES) é uma técnica que utiliza substratos sólidos, como cereais, grãos ou resíduos vegetais, para promover o crescimento de microrganismos, inclusive os de interesse agrícola, como *Beauveria bassiana* e *Bacillus thuringiensis* (Arruda *et al.*, 2003; Silva, 2007; Patil *et al.*, 2013; Lana *et al.*, 2019 Vidotto; Correia; Bagagli, 2022; Penãte; Arenòs; Artola, 2023). A FES é particularmente útil para pequenos produtores, pois requer menor investimento em equipamentos tecnológicos do que a fermentação líquida (Berbert-Molina *et al.*, 2008) e tem vantagens, como o menor consumo de água e energia.

Substratos como arroz, grãos, farelos ou tortas, bem como resíduos vegetais são comumente utilizados na fermentação em estado sólido para a produção de microrganismos de interesse agrícola. Esses substratos são amplamente disponíveis e acessíveis (Arruda *et al.*, 2003; Correia; Bagagli, 2022; Penãte; Arenòs; Artola, 2023).

Os reatores utilizados na fermentação em estado sólido são componentes chave para a produção de bioinsumos. Em pequenas escalas, é possível a utilização material simples, constituídos por recipientes de plásticos rígidos como garrafas pet ou embalagens de material PEAD (polietileno de alta densidade), ou sacos plásticos flexíveis de polietileno ou

polipropileno (Alves; Faria, 2010; Pan; Kim; Kim, 2010; Ferreira *et al.*, 2019; Lana *et al.*, 2019; Baris; Er, 2021; Aguiar *et al.*, 2022; Maciel *et al.*, 2024), sendo uma alternativa para a produção *on farm* de bioinsumos em pequenas propriedades (Lana *et al.*, 2019). O controle de contaminação é um desafio nesses reatores, mas o uso de protocolos de esterilização adequados garante a eficiência do processo de produção (Monnerat *et al.*, 2020).

3.3.2. Controle da contaminação em processos fermentativos

A esterilização de reatores, substratos e utensílios é essencial em processos fermentativos para garantir que não haja contaminação, eliminando microrganismos indesejados que poderiam comprometer a eficiência do processo e a qualidade do produto. Schmidell *et al.* (2001) apontam que a esterilização pode ser realizada por métodos físicos (calor seco, calor úmido, radiação ultravioleta, radiação gama) ou químicos (germicidas como hipoclorito de sódio). A escolha do método depende da natureza do material a ser tratado, das condições do ambiente e do tipo de microrganismo a ser eliminado.

O método de esterilização mais comum em processos fermentativos é o uso de calor úmido sob pressão, em que em geral se utilizam autoclaves. Em casos em que a aplicação de calor não é viável, o uso de germicidas químicos, como o hipoclorito de sódio, é amplamente recomendado, especialmente para a higienização de superfícies e ambientes (Stanbury; Whitaker; Hall, 1995; Santos *et al.*, 2020).

3.3. Controle biológico de pragas com microrganismos entomopatogênicos

Microrganismos entomopatogênicos são organismos capazes de infectar e causar doenças em insetos, sendo amplamente utilizados no controle biológico de pragas agrícolas. Esses microrganismos, que incluem principalmente fungos, bactérias e vírus, são considerados uma alternativa sustentável aos pesticidas químicos tradicionais, por apresentarem menor impacto ambiental e alta especificidade em relação às pragas-alvo (Fontes; Valadares-Inglis, 2020). Entre os exemplos mais comuns de microrganismos entomopatogênicos estão o fungo *Beauveria bassiana* e a bactéria *Bacillus thuringiensis*, ambos amplamente estudados e utilizados para o controle de diferentes espécies de insetos que atacam culturas de importância econômica (Embrapa, 2021).

O controle biológico de pragas com a aplicação de microrganismos entomopatogênicos é uma técnica que utiliza microrganismos vivos, ou substâncias produzidas por eles, para controlar pragas agrícolas. Ele é uma alternativa aos pesticidas químicos e tem ganhado destaque como uma ferramenta sustentável no manejo integrado de pragas (Valicente *et al.*, 2018). Além de ser uma técnica ecológica, o controle biológico reduz os riscos à saúde humana e promove a biodiversidade nas áreas agrícolas (Lana *et al.*, 2019).

Os principais microrganismos utilizados no controle biológico de pragas são fungos, bactérias e vírus, que apresentam alta eficácia no combate a diversas espécies de insetos prejudiciais à agricultura. Entre os fungos mais utilizados está o *Beauveria bassiana*, conhecido por infectar uma ampla gama de insetos, causando doenças que levam à morte das pragas. Além disso, o *Metarhizium anisopliae* também se destaca por seu uso no controle de pragas em diversas culturas (Fontes e Valadares-Inglis, 2020).

No caso das bactérias, o *Bacillus thuringiensis* (Bt) é o mais amplamente utilizado, sendo eficaz no controle de lagartas e outros insetos que atacam plantas. Essa bactéria atua produzindo toxinas que, ao serem ingeridas pelos insetos, causam paralisia no trato digestivo, levando à morte.

Esses microrganismos formam a base de muitos biopesticidas disponíveis comercialmente e estão no centro das pesquisas sobre produção em sistemas *on farm*, uma vez que sua multiplicação local pode reduzir custos e facilitar o acesso a tecnologias de controle biológico para pequenos e médios agricultores (Embrapa, 2021).

3.3.1. *Beauveria bassiana*

Beauveria bassiana é um fungo entomopatogênico amplamente utilizado na agricultura como bioinseticida. Ele infecta uma vasta gama de insetos-praga, sendo considerado uma alternativa promissora e eficaz aos pesticidas químicos tradicionais (Pham *et al.*, 2020). A produção de *B. bassiana* pode ser realizada por fermentação em estado sólido, utilizando substratos como arroz, que são acessíveis para pequenos produtores (Ferreira *et al.*, 2019).

A produção de *Beauveria bassiana* em meio sólido tem sido objeto de vários estudos com o objetivo de otimizar o rendimento e a qualidade dos esporos para o uso como bioinseticida. Pham *et al.* (2020) realizaram um estudo em que otimizaram a fermentação em estado sólido para a produção de conídios de *Beauveria bassiana* utilizando farelo de arroz como substrato. O experimento foi conduzido para melhorar a produção de esporos aéreos, resultando em uma concentração de aproximadamente $2,1 \times 10^{10}$ conídios por grama de substrato seco. Os autores ressaltam que a escolha do substrato, aliada a ajustes nas condições de fermentação, foi determinante para alcançar esses altos rendimentos, tornando o processo viável para a produção em larga escala.

Barış e Er (2021) investigaram a produção de conídios de *Beauveria bassiana* por meio de fermentação sólida utilizando diversos cereais como substrato. O estudo teve como foco a avaliação do impacto de diferentes grãos, como arroz e trigo, na produção de esporos aéreos. Após a otimização, os autores conseguiram produzir uma concentração de $1,8 \times 10^9$ conídios por grama de substrato. Eles também discutiram a importância da estrutura física do meio sólido na proliferação dos esporos, destacando que a fermentação em estado sólido é uma técnica promissora devido ao baixo custo dos substratos e ao elevado rendimento de esporos.

Esses estudos reforçam que o uso de substratos sólidos como farelo de arroz ou grãos integrais em processos de fermentação proporciona altos rendimentos na produção de *Beauveria bassiana*, tornando o método eficiente para a produção comercial de bioinseticidas, sendo que a aplicação de *Beauveria bassiana* como bioinseticida tem sido amplamente estudada em diversas culturas agrícolas.

Pham *et al.* (2020) relataram o uso desse fungo na cultura do arroz, onde ele foi eficaz no controle do percevejo-marrom (*Nilaparvata lugens*), um dos principais responsáveis pela perda de produtividade em plantações de arroz. A aplicação dos conídios produzidos por fermentação em estado sólido resultou em uma alta taxa de mortalidade das pragas, com efeitos prolongados devido à capacidade do fungo de persistir no ambiente e continuar infectando novas populações de insetos. Isso demonstrou que o uso de *Beauveria bassiana* pode ser uma alternativa sustentável para o manejo de pragas nessa cultura, reduzindo a dependência de pesticidas químicos e minimizando o impacto ambiental.

Bariş e Er (2021) avaliaram a aplicação de *Beauveria bassiana* na cultura de milho, visando o controle da lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*), uma das principais pragas que afeta essa cultura. A utilização dos conídios obtidos a partir da fermentação em cereais mostrou-se altamente eficiente, com uma redução significativa na população de lagartas. A pesquisa demonstrou que o bioinseticida pode ser aplicado diretamente nas plantas, com os conídios aderindo à superfície foliar e, posteriormente, infectando as pragas. Esse método de controle biológico é particularmente benéfico para o milho, pois reduz os custos de produção ao evitar a aplicação contínua de pesticidas e melhora a segurança alimentar ao minimizar os resíduos tóxicos nos grãos.

3.3.2. *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis (Bt) é uma bactéria que tem sido utilizada há décadas como bioinseticida. O Bt produz toxinas (δ -endotoxinas) que são letais para diversas ordens de insetos, especialmente Lepidoptera e Coleoptera (Monnerat *et al.*, 2020).

Silva *et al.* (2007) exploraram a produção de Bt em processos semicontínuos e em estado sólido, com foco na obtenção de bioinseticidas para a agricultura. O processo em estado sólido, utilizando resíduos agrícolas como substrato, gerou uma alta concentração de esporos viáveis de *Bacillus thuringiensis* ao final da fermentação, chegando a aproximadamente 10^{11} UFC/ml de substrato seco. Esses esporos, aplicados em culturas de milho para o controle de lepidópteros, mostraram uma alta taxa de mortalidade das pragas, demonstrando o potencial do uso desse microrganismo como uma alternativa eficaz e sustentável aos pesticidas químicos convencionais (Silva *et al.*, 2007).

A produção de *Bacillus thuringiensis* (Bt) por fermentação em estado sólido tem sido investigada como uma alternativa à tradicional cultura por fermentação submersa. No estudo realizado por Molina-Peñate *et al.* (2023), o Bt foi cultivado utilizando resíduos sólidos urbanos como meio de fermentação. Esse processo não só promoveu a valorização de resíduos orgânicos, mas também resultou em uma produção eficiente de esporos e cristais tóxicos de Bt. Ao final do processo, foram obtidos $2,9 \times 10^{10}$ UFC/ml de substrato seco, o que evidencia o potencial da fermentação em estado sólido para a produção de bioinseticidas. Esses esporos, quando aplicados em plantações, mostraram uma eficiência significativa no

controle de pragas, especialmente em culturas de tomate para o controle da traça-do-tomateiro (*Tuta absoluta*).

3.4. Produção de bioinsumos *on farm* por pequenos produtores

A agricultura sustentável visa promover a produção de alimentos de forma que minimize os impactos ambientais, otimize o uso de recursos e garanta a segurança alimentar (Brasil, 2021). Os bioinsumos têm um papel fundamental na agricultura sustentável, ao reduzir a necessidade de insumos químicos prejudiciais e promover o uso de recursos biológicos.

No Brasil, o setor agrícola é de grande relevância para a economia, dado que o agronegócio representa até 26% do PIB, concentrado principalmente na produção de commodities (Machado, 2021). Em partes, a relevância do setor agrícola é favorecida pelo clima do país que é extremamente favorável ao cultivo de diversas culturas ao longo de todo o ano, aliado ao uso de tecnologias como melhoramento genético de cultivares e emprego de boas práticas agrícolas, entre elas, o manejo de pragas e doenças, inevitáveis em cultivos massivos de alimentos (Cruz, 2022).

Pequenos produtores rurais são responsáveis por uma parte significativa da produção agrícola no Brasil, assim como em outros países em desenvolvimento (Brasil, 2021). A agricultura familiar ocupa 23% de toda a área de atividades agropecuárias no país, representando 76,8% dos estabelecimentos e sendo responsável pela diversificação na produção de alimentos, chegando a ser responsável pela maior parte da produção nacional bruta de mandioca, feijão, leite e suínos (IBGE, 2017).

Para esses produtores, o uso de bioinsumos é uma alternativa sustentável que reduz custos e promove a segurança alimentar, ao mesmo tempo em que minimiza os impactos ambientais (Monnerat *et al.*, 2020). Pequenos produtores enfrentam desafios relacionados ao acesso a tecnologias, como a falta de infraestrutura e conhecimento técnico, mas iniciativas de capacitação têm mostrado resultados promissores (Valicente *et al.*, 2018; Lana *et al.*, 2019).

Santos *et al.* (2020), ao analisar amostras de bioprodutos *on farm* no Vale do São Francisco, evidenciaram que 100% das amostras estavam contaminadas, com mais de 70%

delas contendo coliformes termotolerantes e *Salmonella* sp., indicando um grave problema na qualidade microbiológica desses bioinsumos. Os microorganismos eram cultivados em meio líquido, em caixas d'água e em sua maioria os reatores ficavam abertos como mostrado na Figura 4. A contaminação observada pode comprometer tanto a eficácia dos bioinsumos quanto a segurança, representando riscos à saúde dos trabalhadores e consumidores. Esses dados são alarmantes, pois apontam para riscos significativos de contaminação que podem comprometer a eficácia dos bioinsumos e representar uma ameaça à saúde pública.

Para garantir a qualidade desejada na produção de bioinsumos *on farm*, é essencial que haja um controle rigoroso dos processos produtivos, visando evitar o crescimento de microorganismos indesejados. A contaminação microbiológica não apenas reduz a eficácia do produto, mas também pode representar riscos significativos à saúde, especialmente quando patógenos estão presentes (Valicente, 2018; Santos, Dinnas & Feitoza, 2020; Matos & Silva, 2023; Lana *et al.*, 2022). A produção deve seguir as Boas Práticas de Fabricação (BPF), com a implementação de medidas de controle microbiológico (Abrunhosa, 2019; Lana *et al.*, 2022).

Atualmente, existem diferentes modelos de biofábricas *on farm* que variam conforme o nível de investimento. Nos modelos de alto investimento, encontram-se estruturas com características semelhantes a indústrias de biotecnologia, utilizando reatores de aço inoxidável, materiais sanitários e processos de esterilização com altas temperaturas. Esses sistemas garantem uma produção com alta concentração e pureza do microorganismo de interesse (Moreira, 2023). A Figura 3 apresenta alguns modelos de biorreatores.

Figura 3 - Biofábricas *on farm* constituída por equipamentos em material sanitário e instalações com elevado padrão de controle para contaminantes. (a) Produto SoluBio® ; (b) Produto Allbiom®.



(a)

(b)

Fontes: SoluBio® e Allbiom®

Já os modelos de biofábricas de baixo custo muitas vezes empregam reatores plásticos não sanitários, sem controle adequado de contaminação, o que aumenta a proliferação de patógenos (Santos *et al.*, 2020; Lana *et al.*, 2022), como pode ser observado na Figura 4.

Figura 4 - Biofábrica *on farm* constituídas por equipamentos de baixo custo.



Fonte: Adaptado de Santos *et al.* (2020).

Como pontuado por Embrapa (2021), a produção de bioinsumos *on farm* deve ser acompanhada por técnicos habilitados que orientem os pequenos produtores sobre as práticas adequadas de produção e controle de qualidade. Sem esse acompanhamento, os riscos de contaminação e ineficácia do produto aumentam consideravelmente (Moreira, 2023).

É necessário evitar o contato com ambientes não controlados durante a produção, como quando ocorre a abertura do reator em ambientes externos. A contaminação cruzada pode ser minimizada com protocolos de esterilização mais eficazes, como o uso de temperaturas elevadas ou tratamentos químicos apropriados (Schmidell *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2020).

Ao considerar essas medidas, é possível melhorar a qualidade e segurança da produção de bioinsumos *on farm* e garantir que essa prática sustentável seja uma solução viável para pequenos produtores, mantendo os benefícios ambientais e produtivos (Moreira, 2023). O uso de bioinsumos apresenta um enorme potencial para a agricultura familiar, desde que sejam seguidas diretrizes de controle rigoroso para evitar contaminações que possam comprometer a eficácia dos insumos e a saúde de quem os utiliza.

4. METODOLOGIA

4.1. Reatores, substrato e microrganismos para a Fermentação em Estado Sólido (FES)

Os recipientes utilizados como reatores para o cultivo dos microrganismos em meio sólido (FES) foram escolhidos devido à sua disponibilidade e baixo custo para a produção *on farm* de bioinsumos, sendo alternativas viáveis para pequenos produtores. Para tanto, quatro tipos de recipientes foram utilizados: garrafas de polietileno tereftalato (PET) de 2 litros com tampa, sacos de polietileno (PE), sacos de polipropileno (PP) com filtro de 0,2 µm e barricas de 5 litros de polietileno de alta densidade (PEAD). A Figura 5 ilustra os reatores.

Figura 5 – Reatores avaliados para o cultivo de *B. bassiana* e *B. thuringiensis* de forma *on farm* (a) Barrica; (b) Garrafa PET; (c) Saco PE; (d) Saco PP.



Fonte: Autoria própria.

O substrato utilizado foi o arroz parboilizado, adquirido em um comércio local, uma escolha comum em fermentação em estado sólido devido à sua estrutura física que fornece suporte ao crescimento de microrganismos e suas características nutricionais (Arruda *et al.*, 2003). O substrato foi previamente preparado de acordo com o procedimento estabelecido para cada reator, conforme descrito no item 4.2, para garantir a umidade adequada necessária ao processo de fermentação.

Os processos estabelecidos foram avaliados com o cultivo do fungo *Beauveria bassiana* e da bactéria *Bacillus thuringiensis*, isolados de produtos comerciais da empresa AGRINOR, em formulações para aplicação no controle de pragas ou propagação *on farm*. Esses microrganismos foram conservados a 5°C, e repicados a cada 6 meses em meio de ágar batata dextrose (PDA) para *B. bassiana* e ágar nutriente (NA) para *B. thuringiensis*.

O processo de preparo das seringas com *Bacillus thuringiensis* (Bt) para a Fermentação em Estado Sólido (FES) seguiu etapas padronizadas para garantir a pureza e concentração adequadas do microrganismo. Inicialmente, as placas de Petri foram cultivadas utilizando

meio de cultivo EMBRAPA Sólido, específico para o desenvolvimento de *Bacillus thuringiensis*. Após o período de crescimento das colônias, incubadas por 48 horas, cilindros com 6 mm de meio contendo o microrganismo foram retirados das placas com auxílio de um cortador estéril e transferidos para Erlenmeyers previamente preparados. Esses frascos continham 30 g de arroz, que foi hidratado com 15 mL de água destilada e posteriormente autoclavado a 121°C por 15 minutos, garantindo a eliminação de contaminantes. Os cilindros de meio de cultura foram então misturados ao arroz no Erlenmeyer, e o conjunto foi incubado a 28°C em estufa BOD por um período de 21 dias. Após a incubação, os esporos e células de Bt foram extraídos utilizando uma solução de água salina contendo 0,85% de NaCl e 0,05% de Tween 80, garantindo a separação adequada dos esporos para posterior uso.

Para o cultivo de *Beauveria bassiana* no processo de Fermentação em Estado Sólido (FES), o meio de cultivo utilizado nas placas de Petri foi o PDA (Potato Dextrose Ágar), adequado para o crescimento desse fungo entomopatogênico. Após o desenvolvimento das colônias, cilindros de meio contendo os propágulos de *Beauveria bassiana* foram cuidadosamente retirados e colocados em Erlenmeyers esterilizados, contendo 30 g de arroz previamente autoclavado a 121°C por 15 minutos junto com 15 mL de água. O arroz serviu como substrato sólido para o crescimento do fungo. O frasco foi incubado em estufa BOD a 28°C por 21 dias, permitindo o desenvolvimento e esporulação de *Beauveria bassiana*. Após o período de incubação, a massa de esporos foi extraída por meio de uma solução salina de 0,85% de NaCl e 0,05% de Tween 80, assegurando que os esporos fossem liberados para uso em posteriores aplicações agrícolas ou estudos laboratoriais.

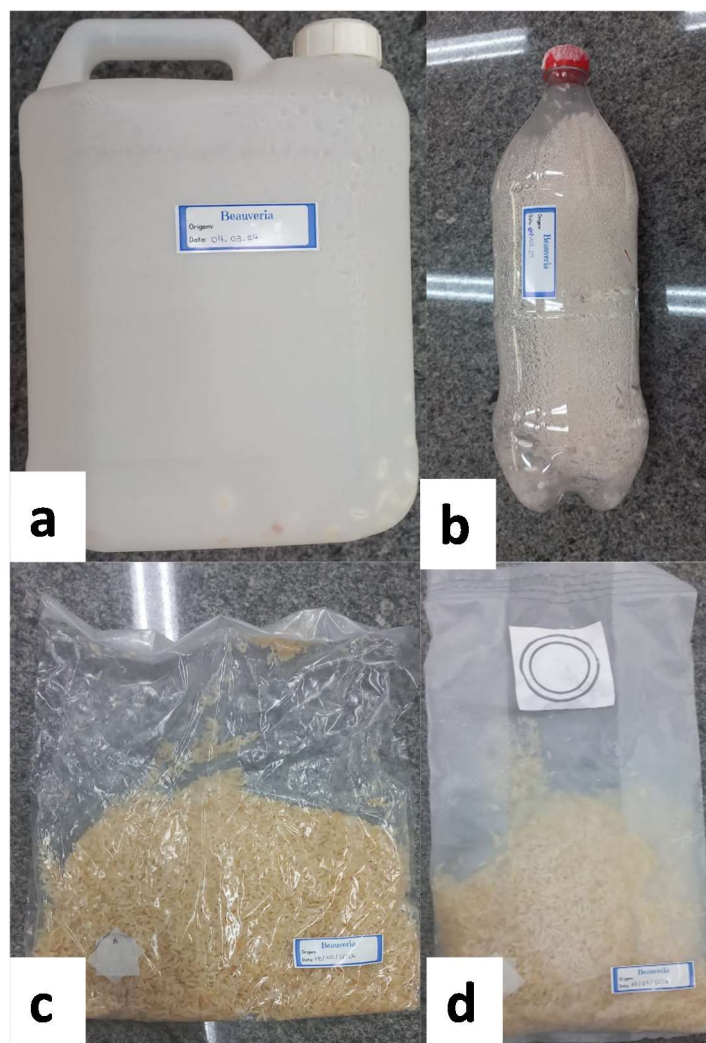
4.2. Procedimentos de preparo dos reatores

Para garantir a ausência de contaminantes nos reatores, optou-se pelo uso de temperaturas elevadas para a descontaminação. Os recipientes passíveis de serem expostos à elevadas temperatura sob pressão, foram autoclavados ou tratados em panela de pressão. Os recipientes mais sensíveis a temperaturas elevadas sob pressão foram higienizados por método químico seguido da aplicação de calor em temperaturas acima de 60 °C porém abaixo da temperatura de derretimento.

Os procedimentos de preparo de cada um dos recipientes utilizados no cultivo dos microrganismos estão descritos a seguir e a Figura 6 ilustra a configuração final de cada um.

- A) Garrafas PET: As garrafas PET de 2 litros foram higienizadas com uma solução de hipoclorito de sódio a 200 ppm durante 15 minutos, seguindo procedimentos adaptados de Ferreira *et al.* (2019). Após a higienização, 100 mL de água quente (acima de 60°C) foram inseridos nas garrafas e agitadas por 2 minutos. Posteriormente, 300 g de arroz cozido em uma proporção de 1 parte de água para 2 de arroz foram adicionados, ainda quente (acima de 60°C), à garrafa, que foi vedada com uma tampa furada, sendo o furo recoberto por fita do tipo Micropore. Após o tratamento térmico, os sacos foram resfriados até temperatura ambiente.
- B) Sacos de PE e PP: Os sacos de PE e PP foram preparados de acordo com o método descrito por Alves e Faria (2010) com adaptações. Inicialmente, 300 g de arroz foram deixados de molho por 15 minutos, e após a drenagem de 15 minutos, 450 g do arroz úmido foram inseridos nos sacos, os quais tiveram a abertura dobrada 6 vezes e foram grampeados. Os sacos foram fechados e esterilizados em panela de pressão elétrica por 30 minutos, garantindo a eliminação de possíveis contaminantes. Após o tratamento térmico, os sacos foram resfriados até temperatura ambiente.
- C) Barricas de PEAD: As barricas de PEAD de 5 litros tiveram as tampas furadas sendo este furo fechado com uma rolha de borracha. Furos foram feitos na parte superior, abaixo da alça das barricas, sendo estes com filtros de 0,2 µm para permitir a troca gasosa. Dentro de cada barrica, 300 g de arroz e 150 mL de água foram adicionados e a barrica foi submetida à esterilização em autoclave por 15 minutos a 121 °C. Após o tratamento térmico, os sacos foram resfriados até temperatura ambiente (Aguiar, 2022).

Figura 6 – Configuração final de cada reator após montagem e preparação, seguindo a mesma ordem dos tipos anteriores: (a) Barrica; (b) Garrafa PET; (c) Saco PE; (d) Saco PP.



Fonte: Autoria própria.

4.3. Inoculação dos microrganismos

Após os recipientes estarem em temperatura ambiente, foi realizada a inoculação com *B. bassiana* e *B. thuringiensis*. Uma suspensão de 5 mL de esporos ou células microbianas na concentração de 1×10^9 UFC/mL foi injetada em cada reator utilizando seringa e agulha estéreis. Os pontos de injeção foram vedados com fita Micropore, exceto da barrica de PEAD, onde a inoculação foi realizada pela rolha de borracha. A inoculação foi realizada próxima a uma lamparina contendo etanol como combustível, em bancada desinfetada com álcool 70%, a fim de simular um ambiente próximo ao de um produtor rural com pouca infraestrutura. Os recipientes foram agitados para homogeneizar o inóculo com o substrato, garantindo a distribuição adequada dos microrganismos.

4.4. Incubação

Os reatores foram incubados por 7 dias em ambiente com temperatura média de 23°C, porém sem controle efetivo. Durante o período de incubação, foi observado o desenvolvimento visual dos microrganismos no substrato, sem agitação, a fim de simular uma condição plausível para agricultores familiares com pouca infraestrutura. A Figura 7 ilustra condições como os recipientes ficam após o crescimento dos microrganismos de interesse, livre de contaminações visíveis.

Figura 7 – Condições dos reatores após o crescimento dos microrganismos de interesse, evidenciando ausência de contaminações visíveis e o crescimento característico do (a) *B. Thuringiensis* em saco pp e do (b) *B. bassiana* em Garrafa PET



Fonte: Autoria própria

Após o período de incubação, os microrganismos foram extraídos do arroz fermentado utilizando 500 mL de solução salina a 0,85% (m/v) contendo 0,05% de polisorbato 80, esterilizada a 121 °C por 15 minutos. As misturas foram agitadas por 5 minutos e filtradas em gaze estéril para separar os sólidos. Na extração, foram utilizados apenas materiais estéreis, mesmo não sendo essa a realidade de muitos produtores on farm, desejou-se avaliar apenas contaminantes advindos de falhas no processo de preparo dos reatores ou de inoculação.

Os extratos foram submetidos à quantificação do microrganismo alvo, bem como à quantificação de contaminantes possivelmente patogênicos, como *Salmonella* sp. e coliformes termotolerantes. Ainda, foram avaliados parâmetros físico-químicos como o pH,

utilizando pHmetro de bancada, e teor de sólidos solúveis, utilizando refratômetro portátil, dos extratos.

Foi avaliado, também, o impacto do aumento do tempo de incubação em sacos de polipropileno (PP) e PE para o *Bacillus thuringiensis*. O objetivo foi determinar se períodos prolongados resultariam em maior contagem de esporos, o que poderia otimizar a produtividade nos sistemas de cultivo (ARRUDA et al., 2003; MONNERAT et al., 2020).

Após o período de incubação, os microrganismos também foram extraídos do arroz e analisados da mesma forma descrito anteriormente neste tópico.

4.5.1. Quantificação de propágulos de *B. bassiana*

A quantificação de propágulos de *Beauveria bassiana* foi realizado com diluições decimais seriadas da amostra em tubos com solução salina (0,85% m:v) estéril com 0,05% (m:v) de polisorbato 80. Foram semeados 100 µL da diluição desejada em 2 placas de Petri contendo ágar PDA. Após espalhamento com alça de Drigalsky, as placas foram incubadas em estufa a 28 °C por 96 h e, então, foram contadas as unidades formadoras de colônias. O cálculo da quantidade de unidades formadoras de colônia por mL de amostra foi calculado pela equação 1.

$$Propágulos \left(\frac{UFC}{mL} \right) = \frac{\text{número médio de colônias nas placas} \times \text{fator de diluição}}{\text{volume de amostra semeado (mL)}} \quad \text{Eq. 1}$$

4.5.2. Quantificação de esporos de *B. thuringiensis*

A contagem de esporos para o *B. thuringiensis* foi executada conforme a metodologia proposta por Monnerat et al. (2020), com algumas modificações. Para isso, uma alíquota de 1 mL da amostra, sem diluição, foi transferida para um tubo Eppendorf. Esse tubo foi submetido a um choque térmico, sendo incubado em banho-maria a 80 °C por 12 min, seguido de resfriamento em banho de gelo por 5 min. Esse processo teve como objetivo eliminar as células vegetativas, mantendo somente os esporos. Posteriormente, a amostra foi submetida a diluições decimais seriadas em tubos contendo água destilada estéril. Foram, então, semeados 100 µL da diluição apropriada em duas placas de Petri contendo meio Embrapa sólido. As placas foram incubadas em estufa a 28 °C por um período de 48 h, após o qual as unidades formadoras de colônias foram

contadas e calculado a quantidade de unidades formadoras de colônia por mL de extrato, de acordo com a Equação 1.

4.5.3. Quantificação de coliformes termotolerantes

A quantificação de coliformes totais, termotolerantes e *E. coli* foi realizada pelo método APHA, conforme descrito por Silva *et al.* (2010), utilizando a quantificação em números mais prováveis por volume (NMP/mL). Primeiramente, foi realizado o teste presuntivo, onde foram realizadas diluições decimais seriadas da amostra em tubos com solução salina (0,85% m:v) estéril com 0,05% (m:v) de polisorbato 80. Alíquotas de 1 mL das diluições 0,1, 0,01 e 0,001 foram inoculadas em 3 tubos contendo caldo Lauril Triptose (LST), com um tubo de Duran invertido, e incubadas a 35°C por 24 a 48 horas. Os tubos que apresentaram presença de gás nos tubos de Duran foram submetidos ao teste de confirmação da presença de coliformes termotolerantes. Para tanto, 1 alçada de cada um dos tubos positivos foi transferida para tubos contendo meio E.C., com Duran invertido, e incubados a 45 °C por 24 h. A contagem do número de tubos positivos em cada diluição, permitindo a quantificação dos coliformes termotolerantes (NMP/ml) através do uso da tabela adequada para série de 3 tubos e diluições 0,1, 0,01 e 0,001.

4.5.4. Identificação da presença de *Salmonella* sp.

A presença de *Salmonella* spp. foi realizada de acordo com Silva *et al.* (2010), com modificações, sendo utilizados os meios de cultivos Agar Salmonella Shiguella (SS) e Agar Verde Brilhante (VBA) sendo a amostra previamente selecionada e enriquecida em caldo Selenito Cistina com incubação de 24 h. o caldo enriquecido foi transferido com auxílio de uma alça bacteriológica para placas contendo cada um dos ágar e foram incubadas a 35 °C por 24 h a 48 h. Colônias típicas foram buscadas para resultado positivo.

4.6. Elaboração de material de treinamento

O processo de elaboração do manual para treinamento de bioinsumos *on farm* foi desenvolvido com o objetivo de proporcionar uma ferramenta acessível e prática para pequenos produtores rurais. Esse material foi estruturado de maneira didática, visando facilitar a compreensão das etapas envolvidas na produção e uso de bioinsumos, como fungos e bactérias benéficos, diretamente nas propriedades. O manual incluiu instruções passo a

passo, desde a preparação do substrato e o cultivo de microrganismos até a aplicação dos bioinsumos nas lavouras, garantindo que os pequenos agricultores pudessem replicar os processos de maneira segura e eficiente em suas próprias fazendas.

A participação dos pequenos produtores foi fundamental na construção desse material. Durante o desenvolvimento do manual, foram realizadas consultas com produtores locais, a fim de identificar as principais dificuldades enfrentadas e adaptar as orientações à realidade do campo. A inclusão dos agricultores nesse processo garantiu que o manual fosse relevante e aplicável às suas necessidades, aumentando a probabilidade de adoção das tecnologias de bioinsumos. Com isso, o material não só contribuiu para a disseminação do conhecimento técnico, mas também fortaleceu a autonomia dos pequenos produtores, permitindo que implementassem soluções sustentáveis diretamente em suas propriedades.

4.7. Análises Estatísticas

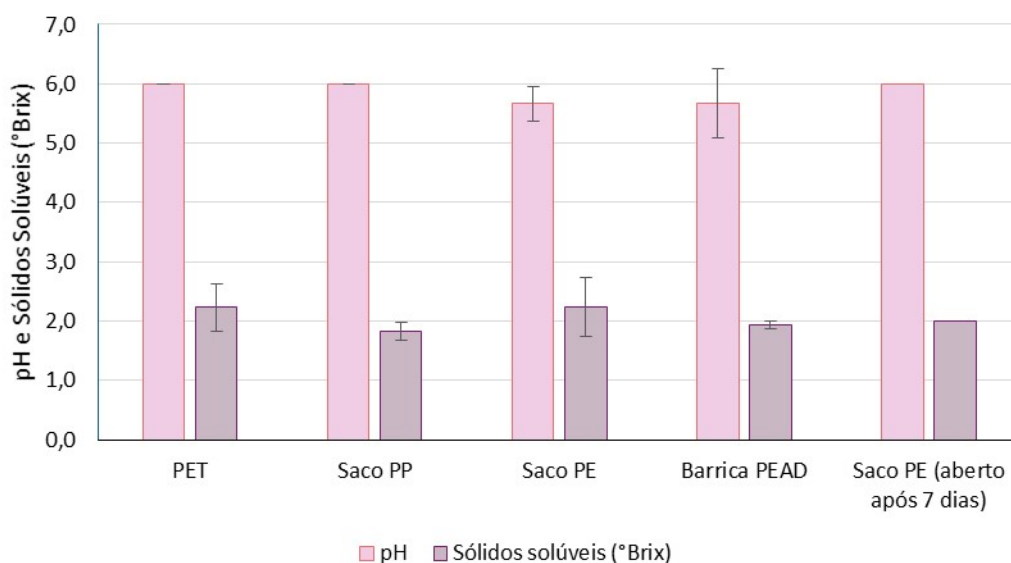
Os ensaios foram conduzidos em triplicata e as análises estatísticas foram realizadas através da ANOVA de um fator, com auxílio do software R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) versão 4.1.0, sendo realizadas comparação de médias pelo teste Tukey com 95% de confiança.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

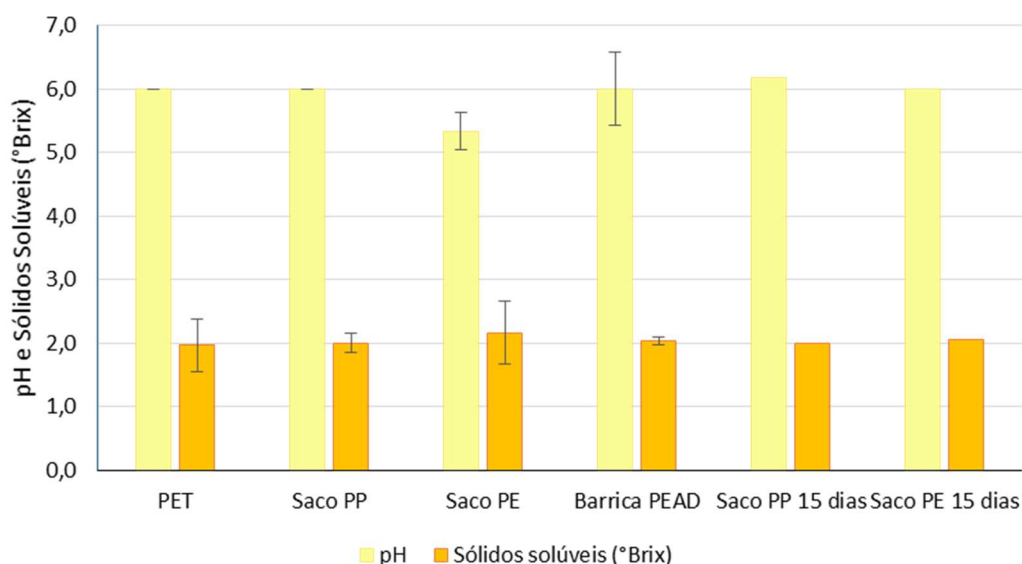
5.1. pH e Sólidos Solúveis dos extratos

A Figura 9 apresenta os resultados dos valores de pH e teor de sólidos solúveis (°Brix) para os extratos de *B. bassiana* e *B. thuringiensis* obtido para cada um dos reatores avaliados. Os valores de pH dos extratos fermentados permaneceram em torno de 6,0, um valor adequado para a aplicação agrícola dos bioinsumos e que permite, no caso do Bt, a estabilidade dos cristais entomocidas. Além disso, o teor de sólidos solúveis não apresentou variações significativas entre os diferentes recipientes, com um valor médio de 2,0 °Brix.

Figura 9 – pH e sólidos solúveis dos extratos obtidos do cultivo de (a) *B. Bassiana* e (b) *B. thuringiensis* nos diferentes reatores avaliados



(a)

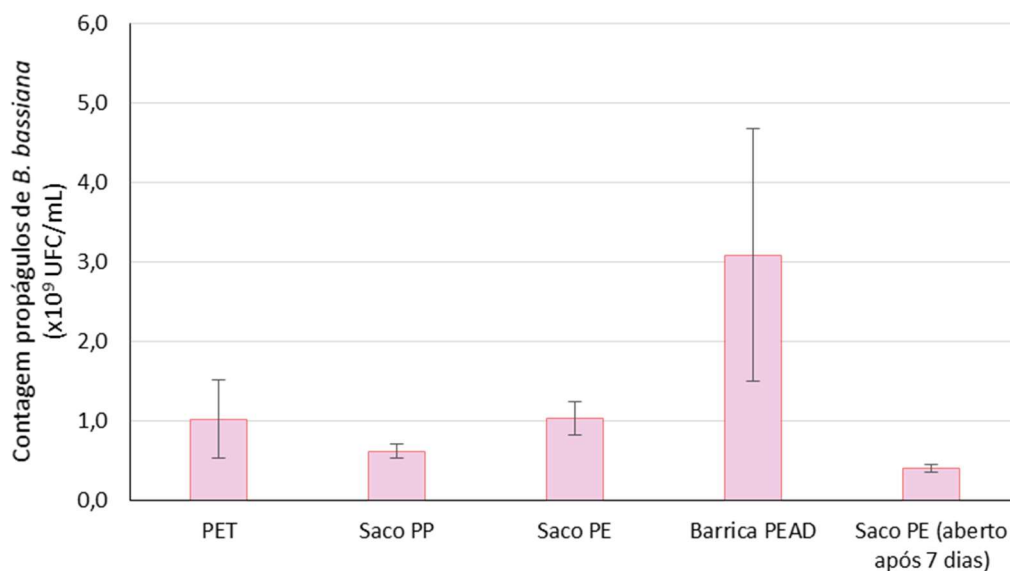


(b)

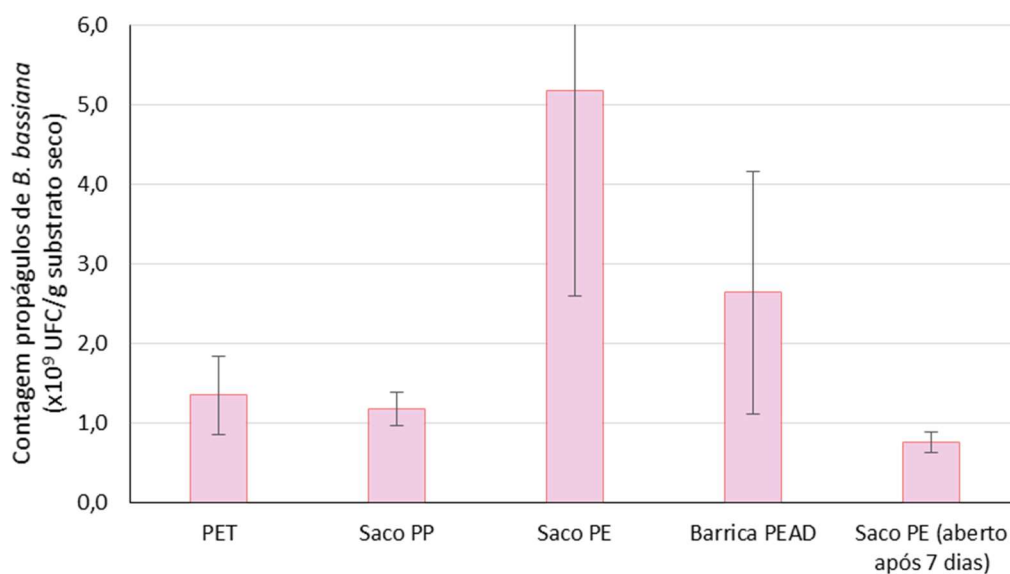
5.1. Quantificação dos microrganismos de interesse nos extratos das fermentações

A Figura 10 apresenta os resultados da quantificação dos propágulos de *B. bassiana* para os extratos obtidos em cada um dos reatores avaliados, sendo os resultados expressos em concentração de propágulos por volume de extrato (UFC/mL) e em concentração de propágulos por massa de substrato seco (UFC/g). As contagens dos microrganismos alvos atingiram valores, em média, entre 10^8 e 10^9 UFC/mL, valores satisfatórios do ponto de vista da aplicação dos bioinsumos a base de *B. bassiana* (Brasil, 2019).

Figura 10 – Concentração média de propágulos de *B. bassiana* (a) nos extratos obtidos do cultivo nos diferentes reatores avaliados (UFC/mL) e (b) por massa de substrato seco (UFC/g) utilizado nos cultivos e respectivos erros-padrão.



(a)



(b)

A análise estatística indicou que não houve diferenças significativas entre os diferentes recipientes para cada microrganismo, com um intervalo de confiança de 95% utilizando o teste de Tukey. Observa-se que os desvios-padrões das contagens foram muito elevados para alguns dos recipientes, o que pode ter dificultado a distinção entre as amostras. Isso indica que é preciso refinar o método, trabalhando pontos como inoculação, incubação e extração, para homogeneizar os resultados.

Avaliando a quantidade de propágulos no extrato obtidos de cada reator, o que apresentou maior contagem nos extratos foram as barricas de PEAD. Ao se avaliar a quantidade de microrganismos de interesse por grama de substrato seco utilizado nas fermentações, temos que a maior contagem foi observada nos sacos de PE após 7 dias de incubação, indicando maior conversão de substrato em células. A literatura recomenda que após 2 dias de incubação os sacos de PE sejam abertos para estimular a esporulação dos fungos (Alves; Farias, 2010; Baris; Er, 2021), no entanto, neste caso, a abertura conduziu à redução da contagem.

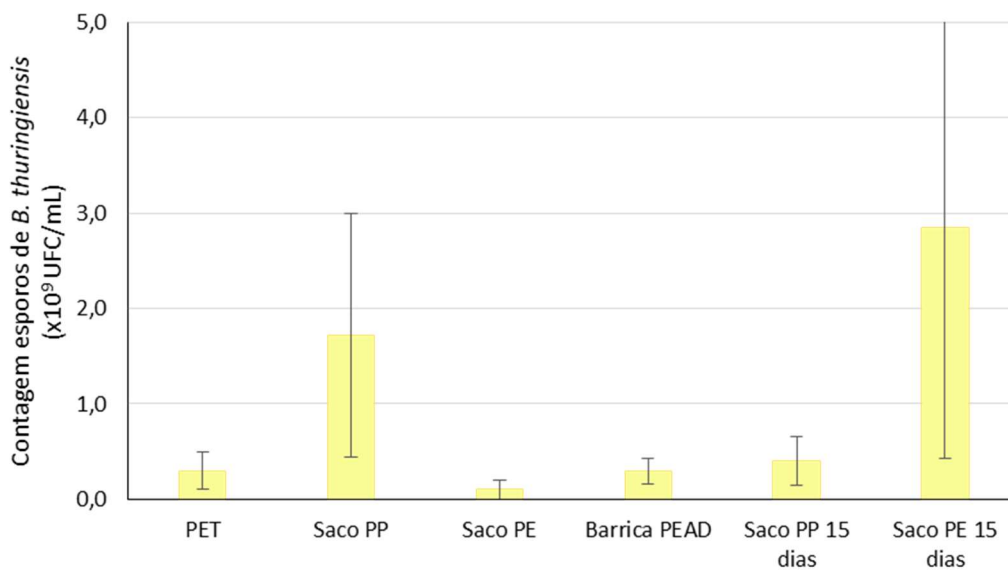
Pham, Kim e Kim (2010) obtiveram aproximadamente 2×10^9 UFC/ g de substrato seco ao cultivarem *B. bassiana* por 15 dias a 25 °C em garrafas plásticas contendo arroz polido como substrato.

Ferreira *et al.* (2019) ao cultivarem *B. bassiana* em arroz parboilizado cozido previamente a vapor e inserido em garrafas PET contendo um tampão de algodão no gargalo, obtiveram após 15 dias de incubação $6,5 \times 10^9$ conídios/g e $1,3 \times 10^9$ conídios/mL.

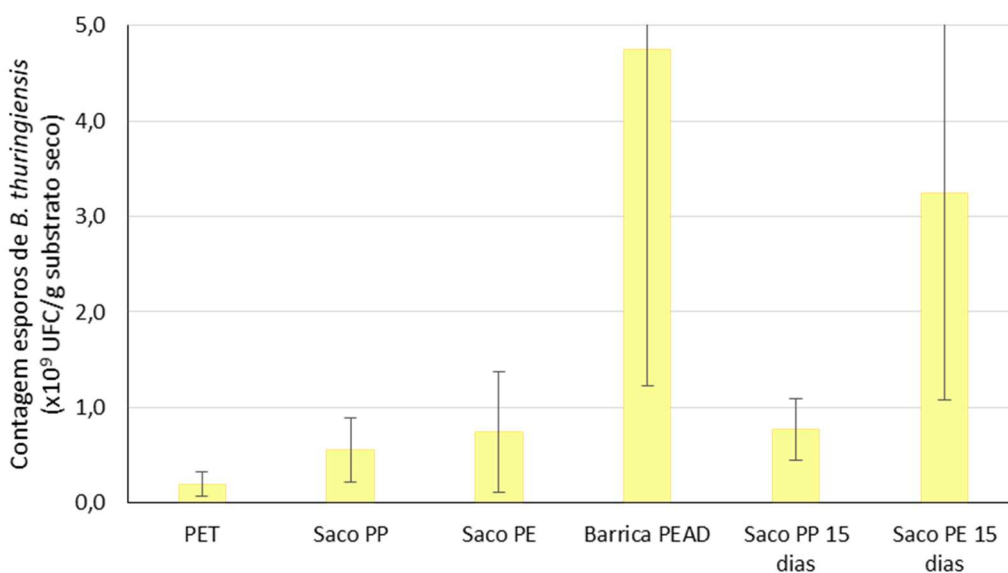
Baris e Er (2021) cultivaram *B. bassiana* em sacos de polipropileno contendo arroz quebrado ou grãos inteiros de arroz, sendo esses esterilizados e incubados a 25°C por 14 dias. Os autores observaram contagens de $10,2 \times 10^{10}$ conídios/g de substrato seco para o arroz quebrado e $9,6 \times 10^{10}$ conídios/ g de substrato seco para o arroz inteiro, sendo a extração realizada a seco.

A Figura 11 apresenta os resultados da quantificação dos esporos de *B. thuringiensis* para os extratos obtidos em cada um dos reatores avaliados, sendo os resultados expressos em concentração de esporos por volume de extrato (UFC/mL) e em concentração de esporos por massa de substrato seco (UFC/g). As contagens dos microrganismos alvos atingiram valores, em média, entre 10^8 e 10^9 UFC/mL, valores razoáveis para *B. thuringiensis* (Monnerat *et al.*, 2020).

Figura 11 – Concentração média de esporos de *B. thuringiensis* (a) nos extratos obtidos do cultivo nos diferentes reatores avaliados (UFC/mL) e (b) por massa de substrato seco (UFC/g) utilizado nos cultivos e respectivos erros-padrão.



(a)



(b)

Da mesma forma que observado para a *B. bassiana*, houve muita variação entre as réplicas das quantificações de esporos para o *B. thuringiensis*. A análise estatística indicou que não houve diferenças significativas entre os diferentes recipientes para cada microrganismo, com um intervalo de confiança de 95% utilizando o teste de Tukey. Novamente, há o indicativo que é preciso refinar o método, trabalhando pontos como inoculação, incubação e extração, para homogeneizar os resultados.

Avaliando a quantidade de esporos no extrato obtido de cada reator, o que apresentou maior contagem nos extratos foram os sacos de PE após 15 dias de incubação. Ao se avaliar a quantidade de microrganismos de interesse por grama de substrato seco utilizado

nas fermentações, temos que a maior contagem foi observada nas barricas de PEAD após 7 dias de incubação e nos sacos de PE após 15 dias, indicando maior conversão de substrato em células.

Capolbo *et al.* (2001) avaliaram a produção de esporos de Bt em sacos plásticos de polipropileno contendo arroz umedecido. Os sacos foram autoclavados, inoculados com a suspensão de esporos e incubados a 30 °C por 4 dias, sendo obtidos contagem de esporos na ordem de 10^9 UFC/g de substrato úmido.

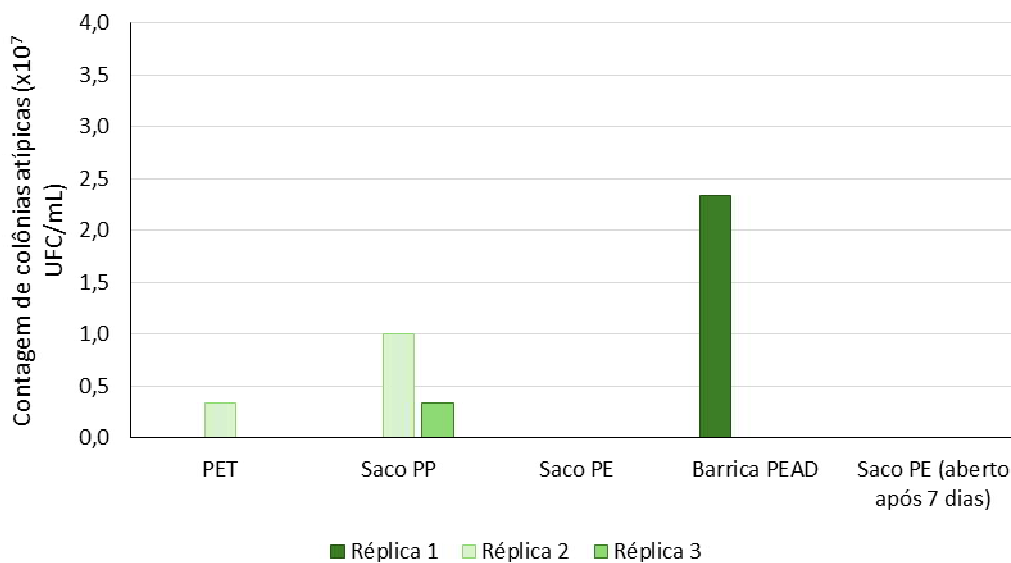
Peñate *et al.* (2022) utilizaram resíduos orgânicos sólidos de um município, parcialmente hidrolisado adicionado a um agente de corpo (maravalha), para cultivar *B. thuringiensis* em um reator de leito empacotado, aerado e sem controle de temperatura. A maior concentração de esporos de Bt observada foi de $6,4 \times 10^8$ esporos/g de substrato seco.

É importante ressaltar que a temperatura média em que os microrganismos foram mantidos (23 °C) é inferior as temperaturas ótimas de cultivo, estando essas entre 25 °C e 30 °C (Pham; Kim; Kim, 2010; Ferreira *et al.*, 2019; Monnerat *et al.*, 2020). Os ensaios foram realizados sem controle de temperatura pelo fato de muitos produtores pequenos, em especial da agricultura familiar, não conseguirem realizar a incubação em temperaturas controladas. No entanto, caso o produtor possua essa condição, seja pela climatização da sala de incubação, seja pelo uso de incubadoras, pode-se obter resultados melhores, mais homogêneos e com contagens superiores ou tempo de incubação reduzido.

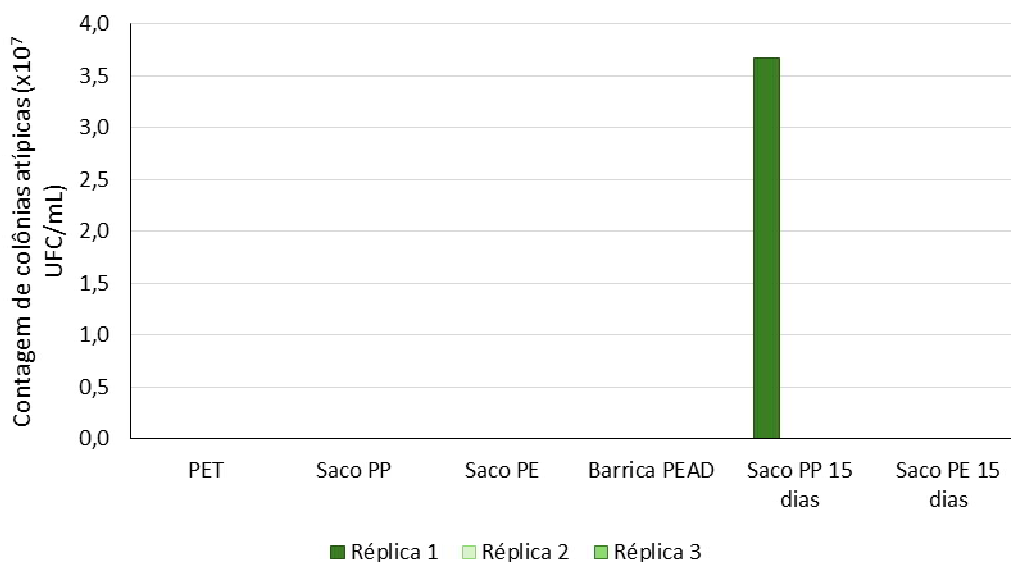
5.3. Presença de contaminantes microbiológicos nos extratos

A Figura 12 apresenta a contagem de colônias atípicas observadas durante a quantificação dos microrganismos alvo, sendo os dados apresentados para cada uma das réplicas para cada reator avaliado.

Figura 12 – Concentração média de colônias atípicas (UFC/mL) presentes na contagem de (a) propágulos de *B. bassiana* e (b) esporos de *B. thuringiensis*.



(a)



(b)

A concentração de colônias atípicas, ou seja, contaminantes, observados nos extratos foi baixa, sendo que para alguns reatores não foram observados contaminantes. A análise demais análises de contaminações microbiológicas não detectou a presença de patógenos, como *Salmonella spp.* e coliformes termotolerantes, em nenhum dos recipientes avaliados. Isso demonstra a eficácia dos protocolos de esterilização empregados e de boas práticas de manipulação dos materiais, corroborando com os resultados obtidos por Santos *et al.* (2020) e Matos e Silva (2023) e reiterando a orientação da Embrapa (2021) de que boas práticas de manipulação podem conduzir a produções *on farm* com maior qualidade e segurança, fato especialmente relevante em ambientes de produção *on farm*, onde o controle de qualidade

é mais difícil de ser mantido em comparação com processos industriais (Santos *et al.*, 2020; Lana *et al.*, 2019).

Este estudo reforça a importância de investir em protocolos para a produção de bioinsumos *on farm*, especialmente para pequenos produtores, indicando técnicas de esterilização adequadas, boas práticas para realização dos procedimentos e reatores que ofereçam barreiras eficazes contra contaminantes, mesmo em situações de recursos limitados.

5.5. Elaboração de materiais de treinamento

Considerando os resultados gerais das contagens dos microrganismos alvo, contaminantes e facilidade de execução dos protocolos na ausência de recursos e infraestrutura, caso comum de pequenos agricultores, em especial da agricultura familiar, foram elaboradas duas cartilhas para aplicação de treinamento e orientação de produtores que desejem realizar a produção de bioinsumos a base de fungos entomopatogênicos e *Bacillus*.

Os procedimentos podem ser observados na íntegra nos Anexo 1 e 2. Esses protocolos foram avaliados através de 2 treinamentos realizados com produtores no IFSP (Campus Avaré), 1 treinamento realizada em parceria com a empresa RAIAR, em Rio Verde - Goiás e 1 treinamento no assentamento Pirituba - São Paulo, na cooperativa Da Terra, podendo ser aprimorados de acordo com sugestões dos produtores. É importante salientar que os manuais e treinamentos foram realizados em parceria com o projeto de Extensão intitulado “Bioinsumos *on farm* para pequenos produtores: estruturando uma rede de apoio” vinculado ao edital PRX 08/2024.

O manual também incluiu orientações detalhadas sobre a montagem de reatores utilizando sacos plásticos e garrafas PET, alternativas econômicas e de fácil acesso para os produtores. Esses reatores, que já foram discutidos anteriormente, são essenciais para a produção de bioinsumos em pequena escala, utilizando materiais simples que podem ser facilmente encontrados nas propriedades rurais. O uso de sacos e garrafas PET para a fermentação em estado sólido foi amplamente explicado, com ilustrações demonstrando cada etapa do processo, desde a preparação do substrato até a inoculação e incubação dos

microrganismos. Essas instruções garantem que os produtores possam montar e operar os reatores com eficiência, otimizando a produção de microrganismos como *Bacillus thuringiensis* e *Beauveria bassiana* para controle biológico de pragas.

Essa abordagem prática, aliada à simplicidade e ilustrações, faz com que o manual seja uma ferramenta poderosa para difundir o conhecimento e as tecnologias de bioinsumos entre pequenos produtores, promovendo o uso sustentável e econômico de soluções biológicas diretamente no campo.

Além dos treinamentos e materiais desenvolvidos, vale destacar o relato de um pequeno produtor que implementou a produção *on farm* em sua propriedade. A adoção das técnicas descritas nos manuais e treinamentos trouxe mudanças significativas para a gestão de sua produção, aumentando a autonomia e reduzindo custos com insumos agrícolas. Segundo ele, a possibilidade de produzir bioinsumos utilizando recursos disponíveis na propriedade foi um divisor de águas, tanto na sustentabilidade quanto na eficiência do manejo agrícola. Esse depoimento foi realizado em reportagem do Planeta Campo, que pode ser acessado na íntegra pelo link https://www.youtube.com/watch?v=wdoB4_j9umo.

Figura 8 – Entrega dos manuais de treinamento elaborados para pequenos produtores, demonstrando o uso prático das instruções no campo.



6. CONCLUSÃO

Este estudo avaliou a viabilidade de diferentes recipientes para a produção de bioinsumos *on farm*, considerando pequenos produtores rurais. Utilizando garrafas PET recicladas, sacos de polietileno (PE), sacos de polipropileno (PP) e barricas de PEAD como reatores, os quais foram capazes de suportar o processo de fermentação em estado sólido (FES) tanto para *B. bassiana* quanto para *B. thuringiensis*, alcançando concentrações superiores a 10^8 UFC/mL, sem que houvesse detecção de contaminantes potencialmente patogênicos como *Salmonella* spp. e coliformes termotolerantes.

Conclui-se que os recipientes avaliados são opções viáveis e de baixo custo para a produção de bioinsumos *on farm*. Contudo, foi identificada a necessidade de melhorias nos protocolos a fim de garantir a homogeneidade e baixa variabilidade dos processos ainda que na ausência de ambientes controlados em relação à temperatura e infraestrutura.

Por fim, este estudo contribui para a implementação de soluções acessíveis e sustentáveis para a agricultura, incluindo a familiar, promovendo a independência de pequenos produtores em relação à obtenção de bioinsumos a base de microrganismos.

REFERÊNCIAS

AGRIBRASILIS. Bioinsumos devem representar 10% do mercado de defensivos e fertilizantes em 5 anos. **Agribrazilis**, 2023. Disponível em: <https://agribrazilis.com/2023/06/06/kynetec1/>. Acesso em: 30 set. 2024.

AGUIAR, A. B. Q. *et al.* **Avaliação da produção de *Bacillus thuringiensis* em estado sólido em condições não estéreis.** In: 13º CONGRESSO DE INOVAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO IFSP, 2022, São Paulo. Anais do 13º Congresso de Inovação, Ciência e Tecnologia do IFSP, 2022.

ALVES, Roberto Teixeira; FARIA, Marcos. Pequeno manual sobre fungos entomopatogênicos. In: Embrapa Cerrados, Planaltina (DF), p. 26-31, 2010.

ARRUDA, R. O. M. *et al.* Cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. israelensis em meio sólido. Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, v. 70, suplemento 3, p. 133-136, 2003.

BARIŞ, Cebail; ER, Mehmet Kubilay. Examining some cereals for mass production of beauveria bassiana (balsamo) vuillemin conidia by solid state fermentation. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi, Kahramanmaraş, v. 24, n. 6, p. 1263-1270, 2021.

BERBERT-MOLINA, M. A. *et al.* Cinética do crescimento de *Bacillus thuringiensis* var. israelensis em altas concentrações de glicose. **Revista de Microbiologia Industrial e Biotecnologia**, v. 35, n. 11, p. 1397-1404, 2008.

BRASIL. Decreto nº 10.375, de 26 de maio de 2020. Institui a Política Nacional de Inovação. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 26 maio 2020. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2019-2022/2020/Decreto/D10375.htm. Acesso em: 11 out. 2024.

BRASIL. Instrução Normativa SDA nº 36, de 13 de dezembro de 2019. Dispõe sobre a especificação de referência para produtos fitossanitários com uso aprovado na agricultura orgânica. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 17 dez. 2019.

BRASIL. Instrução Normativa SDA nº 36, de 13 de dezembro de 2019. Dispõe sobre a especificação de referência para produtos fitossanitários com uso aprovado na agricultura orgânica. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 17 dez. 2019.

Brasil. Instrução Normativa SDA nº 36, de 13 de dezembro de 2019. Dispõe sobre a especificação de referência para produtos fitossanitários com uso aprovado na agricultura orgânica. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 17 de dezembro de 2019.

BRASIL. Plano Nacional de Bioinsumos: medidas para impulsionar o mercado de produtos biológicos. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura>. Acesso em: 30 set. 2024.

CAPALBO, D. M. F. *et al.* Solid-state fermentation of *Bacillus thuringiensis* tolworthi to control fall armyworm in maize. **EJB Electronic Journal of Biotechnology**, v. 4, p. 4, 15 ago. 2001.

CRUZ, I. Controle biológico de pragas do milho: uma oportunidade para os agricultores. Embrapa- Brasília/DF, 2022.

DALZOTO, P. R.; UHRY, K. F. Controle biológico de pragas no Brasil por meio de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *Biológico*, São Paulo, v. 71, n. 1, p. 37-41, 2009.

EMBRAPA. Produção de microrganismos para uso próprio na agricultura (on farm) - Esclarecimentos Oficiais. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2021. Disponível em: https://www.embrapa.br/esclarecimentos-oficiais/-/asset_publisher/TMQZKu1jxu5K/content/nota-tecnica-producao-de-microrganismos-para-uso-proprio-na-agricultura-on-farm. Acesso em: 10 set. 2023.

EMBRAPA. Produção de microrganismos para uso próprio na agricultura (on farm) - Esclarecimentos Oficiais. Portal Embrapa, 2021. Disponível em: https://www.embrapa.br/esclarecimentos-oficiais/-/asset_publisher/TMQZKu1jxu5K/content/nota-tecnica-producao-de-microrganismos-para-uso-proprio-na-agricultura-on-farm-?inheritRedirect=false. Acesso em: 11 out. 2024.

FERREIRA, J. M. S. *et al.* Técnicas para produção artesanal e utilização do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* no campo. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2019. Disponível em: <https://www.embrapa.br/>. Acesso em: 10 set. 2023.

FERREIRA, J. M. S. *et al.* Técnicas para produção artesanal e utilização do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* no campo. Aracaju, SE: Embrapa, 2019.

IBGE. Agricultura familiar no Brasil: resultados do censo agropecuário 2017. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2019. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv101705.pdf>. Acesso em: 20 out. 2024.

KUMAR, D. *et al.* Biofertilizantes multifuncionais à base de consórcio microbiano promotores de crescimento e sua viabilidade técnico-comercial para a agricultura sustentável. In: RHIM, K. H.; KIM, Y. J. *Biotecnologia Microbiana em Horticultura*. Berlim: Springer, 2019. p. 201-221.

LANA, U. G. P. *et al.* Avaliação da qualidade de biopesticidas à base de *Bacillus thuringiensis* produzidos em sistema on farm. *Embrapa Milho e Sorgo*, v. 191, p. 23, 2019.

MACHADO, G.C. Agronegócio Brasileiro: importância e complexidade do setor. CEPEA, 14 jun. 2021.

MACIEL, G. L. *et al.* Influence of aeration on the cultivation of *Metarhizium anisopliae* through solid-state fermentation in plastic reactors. In: VI Simpósio de Microbiologia Agrícola, 2024, Piracicaba. *Anais do VI Simpósio de Microbiologia Agrícola*, 2024.

MATTEDI, A. *et al.* Solid-State Fermentation: Applications and Future Perspectives for Biostimulant and Biopesticides Production. *Microorganisms*, v. 11, p. 1408, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061408>. Acesso em: 2 nov. 2023.

MOLINA-PENATE, Esther *et al.* *Bacillus thuringiensis* production through solid-state fermentation using organic fraction of municipal solid waste (OFMSW) enzymatic hydrolysate. *Waste and Biomass Valorization*, Dordrecht, v. 14, n. 5, p. 1433-1445, 2023.

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

MOREIRA, Vinicius Augusto Ribeiro. **Estudo de bioreatores e protocolos de produção de bioinsumos on farm para pequenos produtores**. Avaré, 2023. 80 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Biosistemas) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia, Avaré, 2023.

PATIL, S. R. *et al.* Utilization of silkworm litter and pupal waste-an eco-friendly approach for mass production of *Bacillus thuringiensis*. **Bioresource Technology**, v. 131, p. 545–547, 1 mar. 2013.

PHAM, Tuan Anh; KIM, Jeong Jun; KIM, Keun. Optimization of solid-state fermentation for improved conidia production of *Beauveria bassiana* as a mycoinsecticide. *Mycobiology*, Seoul, v. 38, n. 2, p. 137-143, 2010.

SANTOS, A.; DINNAS, S.; FEITOZA, A. Qualidade microbiológica de bioprodutos comerciais multiplicados on farm no Vale do São Francisco: dados preliminares. *Enciclopédia Biosfera*, v. 17, n. 34, 2020.

SILVA, Millena da *et al.* Alternativas para a produção de bioinseticida Bti: uso do processo semicontínuo e do processo em estado sólido. 2007.

SILVA, N. *et al.* Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água. 4. ed. São Paulo: Varela, 2010. ISBN 978-85-7759-013-1.

STANBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J. Principles of fermentation technology. 2. ed. Grã-Bretanha: Butterworth-Heinemann, 1995.

SUMMIT AGRO. Mercado de bioinsumos cresce e tem futuro promissor no Brasil. Summit Agro Estadão, 2023. Disponível em: <https://summitagro.estadao.com.br/sustentabilidade/mercado-de-bioinsumos-cresce-e-tem-futuro-promissor-no-brasil/>. Acesso em: 30 set. 2024.

VALADARES-INGLIS, Maria Cleria; *et al.* CONTROLE BIOLÓGICO DE PRAGAS DA AGRICULTURA. Embrapa: Brasília, 2020. 514 p.

VALICENTE, F. H. *et al.* Riscos à produção de biopesticida à base de *Bacillus thuringiensis*. Circular Técnica, v. 239, p. 20, 2018.

VIDOTTO, J. C. D.; CORREIA, E. L.; BAGAGLI, M. P. **Avaliação de meios de cultura alternativos para a obtenção de bioinsumos à base de *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus subtilis* para uso na agricultura.** In: 13º CONGRESSO DE INOVAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO IFSP, 2022, São Paulo. Anais do 13º Congresso de Inovação, Ciência e Tecnologia do IFSP, 2022.

AGUIAR, A. B. Q. ; VIDOTTO, J. C. D. ; MOREIRA, V. A. R. ; BAGAGLI, M. P. **AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE *Bacillus thuringiensis* EM ESTADO SÓLIDO EM CONDIÇÕES NÃO ESTÉREIS.** In: 13º CONGRESSO DE INOVAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO IFSP, 2022, São Paulo. Anais do 13º CONGRESSO DE INOVAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO IFSP, 2022.

ANEXO 1



Produção de Bioinsumos “on farm”

PRODUÇÃO EM MEIO SÓLIDO MÉTODO 1 - GARRAFAS

Elaborado por:

Marcela Pavan Bagagli

Iris de Lima

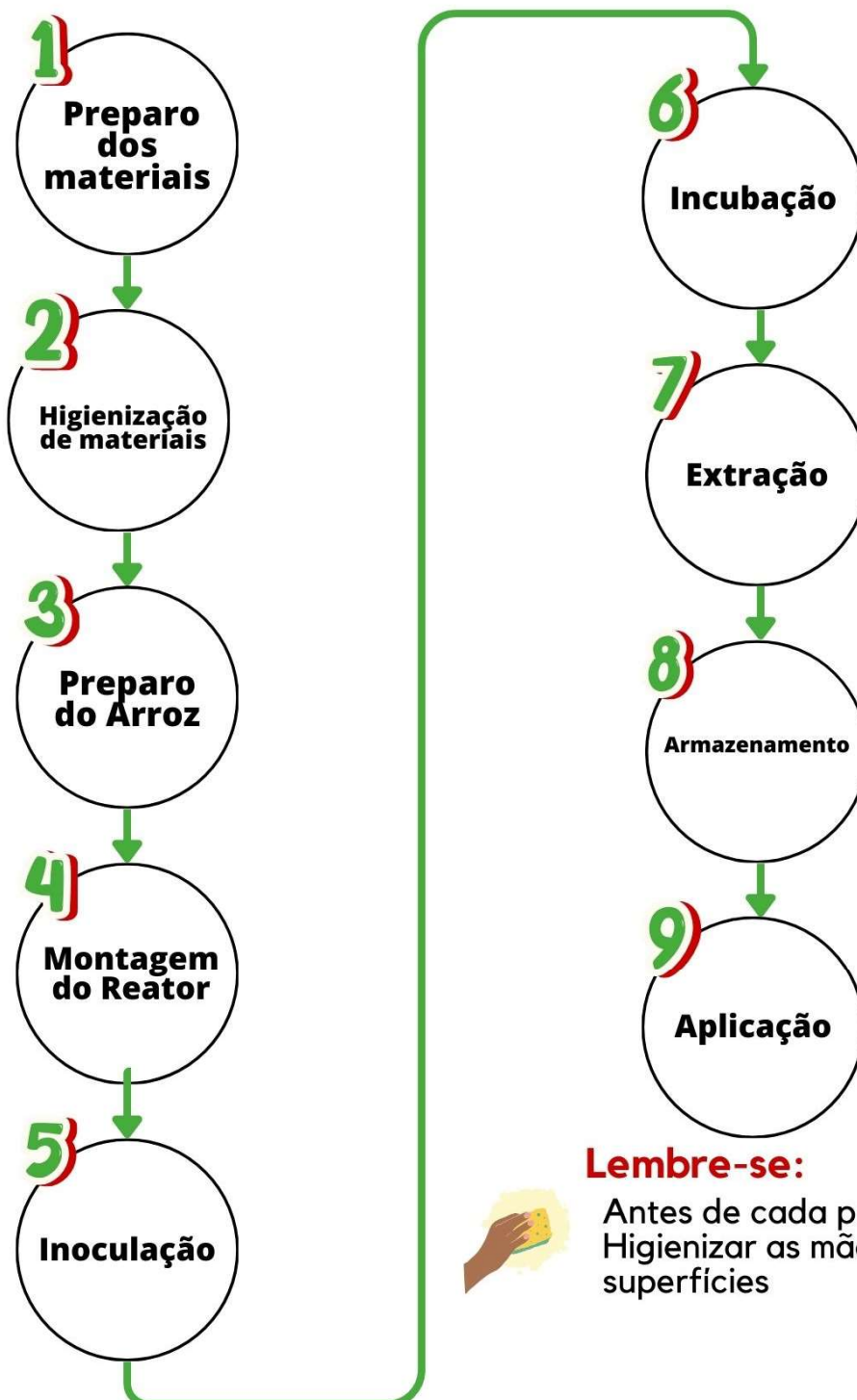
Luiza Helena Sampaio Moro

Orientação:

Marcela Pavan Bagagli

Produção de Bioinsumos “on farm”

PRODUÇÃO EM MEIO SÓLIDO



Lembre-se:

Antes de cada processo:
Higienizar as mãos e
superfícies

Produção de Bioinsumos "on farm"

FERMENTAÇÃO SÓLIDA - MÉTODO 1 - GARRAFAS

Lembre-se:

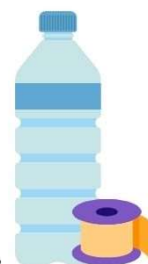
Antes de cada processo:
Higienizar as mãos e superfícies



1

Preparo dos materiais

Separe os recipientes que serão utilizados para cultivar o microrganismo (recipiente e fechamento), que chamaremos de reator; Separe 2 tampas, uma furada.



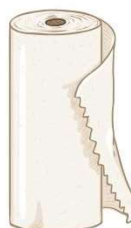
Separe os itens que serão utilizados para montar o reator, tais como:

- Funil
- Colher
- Panela elétrica ou cuscuzeira
- Chaleira elétrica (ou outra para aquecer água)
- Caneta e etiqueta para identificação
- Lamparina e fósforo



Separe os itens que serão utilizados para HIGIENIZAÇÃO:

- Água sanitária
- Balde
- Álcool 70%
- Papel toalha
- Cronômetro ou relógio



Produção de Bioinsumos "on farm"

FERMENTAÇÃO SÓLIDA - MÉTODO 1 - GARRAFAS



2

Higienização
de peças e
reatores

Prepare a água clorada:

- Para cada 1 L de água adicione 1 colher de sopa de água sanitária (10 mL)
- Prepare quantidade suficiente para higienizar os frascos e os utensílios!

Após lavar os frascos com água e detergente, enxague bem e complete a garrafa com a água clorada, ou coloque imerso em um recipiente.



*** Deixe por 15 min em contato e depois escorra e deixe secar naturalmente ***



Atenção: A água deve completar **TODA** a garrafa, incluindo o gargalo



Coloque todos os utensílios que serão utilizados e a tampa dos frascos **COMPLETAMENTE imersos** na água clorada



*** Deixe por 15 min em contato e depois escorra e deixe secar naturalmente ***

Atenção: não reutilizar a água



Produção de Bioinsumos "on farm"

FERMENTAÇÃO SÓLIDA - MÉTODO 1 - GARRAFAS

Lembre-se:

Antes de cada processo:
Higienizar as mãos e superfícies



O Arroz:

- Pode ser Tipo 1 ou Parboilizado (maior padronização)



Adicione na **Panela Elétrica** o Arroz e a Água:

- Para cada 300 g de arroz cru 150 mL de água

*** Essa quantidade é suficiente para 2 garrafas PET de 1,5 a 2,0L ***

Cozinhe o arroz até o tempo automático da panela. Mantenha a panela no modo de aquecimento. É importante que o arroz **ESTEJA QUENTE** para colocar nos reatores.



Pronto! Agora basta transferir para as garrafas

AINDA QUENTE!

(Deve incomodar as mãos ao segurar a garrafa)

Produção de Bioinsumos "on farm"

FERMENTAÇÃO SÓLIDA - MÉTODO 1 - GARRAFAS

Lembre-se:

Antes de cada processo:
Higienizar as mãos e superfícies



4

Montagem do Reator

OPÇÕES PARA O REATOR:

- Garrafa PET de 1,5 a 2 L

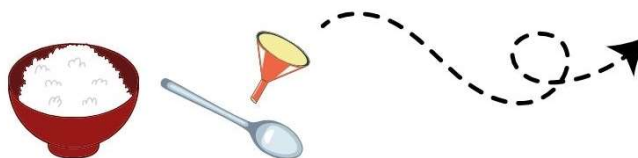
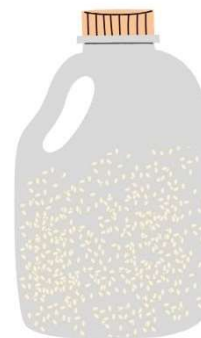
Atenção: Outras embalagens, como sacos em PE ou PP, também podem ser utilizadas, mas este protocolo funciona para os sugeridos

- Na tampa furada na parte superior, já **HIGIENIZADA**, cubra o furo com 2 camadas de curativo tipo MICROPORE

Atenção: Verifique se o micropore está bem aderido à tampa e não está molhado



- Coloque cerca de 100 mL (meio copo americano) de água quente (temperatura entre 60°C e 80°C) no frascos e espalhe por todo o corpo da garrafa por 1 minuto e descarte a água.
- Com a ajuda de um funil e colher **HIGIENIZADOS**, transfira cerca de 200g de arroz cozido AINDA QUENTE para o reator (aproximadamente 20 colheres de sopa).
- Feche e agite bem para que a temperatura do arroz se espalhe por todo reator, incluindo tampa.
- Deixe esfriar naturalmente.



Produção de Bioinsumos "on farm"

FERMENTAÇÃO SÓLIDA - MÉTODO 1 - GARRAFAS

Lembre-se:

Antes de cada processo:
Higienizar as mãos e superfícies

USE LUVAS!!



5

Inoculação

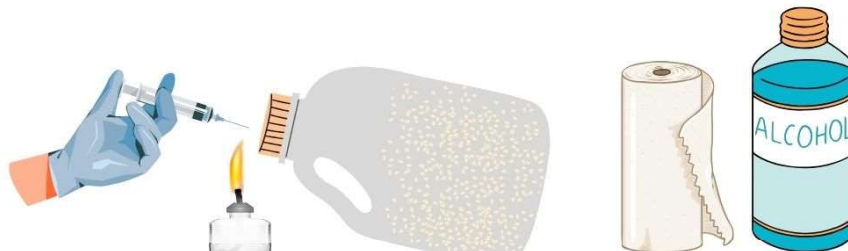
OPÇÕES PARA O INÓCULO:

- Produto comercial de qualidade próprio para multiplicação *on farm*
- Banco de microrganismos

Inóculo: uma quantidade de microrganismo de interesse com concentração adequada e sem contaminantes

Em uma mesa limpa e **HIGIENIZADA COM ÁLCOOL 70%**

- Acenda a lamparina
- Posicione o reator próximo a chama
- Introduza o inóculo utilizando uma seringa e agulha estéril
- Limpe o ponto de aplicação com álcool 70% (suavemente)
- Cubra o ponto de aplicação com Micropore
- Agite bem para cobrir o arroz com o inóculo



Atenção: Caso seja necessário abrir o reator, seja o mais rápido possível e não tire nem tampa e nem a abertura do reator de perto da chama

Atenção: Após a aplicação **HIGIENIZAR BEM A BANCADA**

Produção de Bioinsumos "on farm"

FERMENTAÇÃO SÓLIDA - MÉTODO 1 - GARRAFAS

Lembre-se:



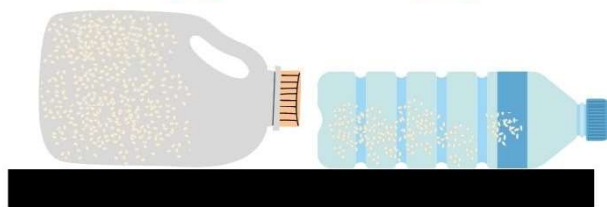
Antes de cada processo:
Higienizar as mãos e superfícies

6

Incubação

Incubar: manter o reator em ambiente adequado por tempo adequado para que o microrganismo cresça

- Mantenha os reatores na horizontal, espalhando bem o arroz ao longo do recipiente.
- O tempo de incubação dependerá da temperatura dos dias, variando de 5 a 10 dias.



Atenção: Os reatores não devem receber luz do sol diretamente e devem ficar em ambiente coberto

Exemplos de tempo de incubação:

- *Beauveria bassiana* - 7 dias



Produção de Bioinsumos "on farm"

FERMENTAÇÃO SÓLIDA - MÉTODO 1 - GARRAFAS

Lembre-se:

Antes de cada processo:
Higienizar as mãos e superfícies

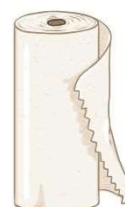


USE LUVAS, MÁSCARA E ÓCULOS!!



Em uma mesa limpa e
HIGIENIZADA COM ÁLCOOL 70%

- Verifique o crescimento do microrganismo
- Se estiver satisfatório, continue, se não, descarte* o material.
- Insira 300 mL de solução extratora** e agite bem por 5 min
- Passe por uma peneira higienizada coletando o líquido em um recipiente limpo e higienizado



***O material contaminado deve ser imerso em água clorada (25 ml por L) e depois descartado**

**** Solução extratora:**
Para cada 1 L de água colocar 8,5g de sal e 1 gota de detergente neutro (ou tween 80)

Produção de Bioinsumos "on farm"

FERMENTAÇÃO SÓLIDA - MÉTODO 1 - GARRAFAS

Lembre-se:

Antes de cada processo:
Higienizar as mãos e superfícies

USE LUVAS!!



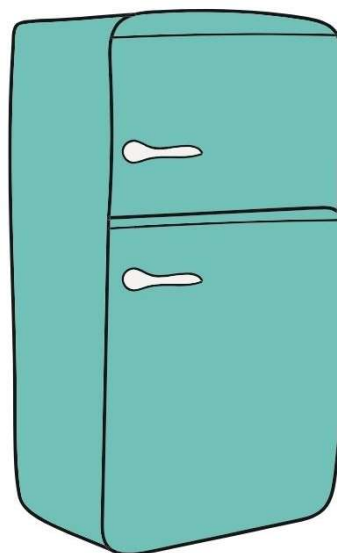
Atenção: o ideal é aplicar após a extração, garantindo que o produto NÃO estará contaminado e será eficiente



- Colocar o material em um frasco ESCURO com tampa e HIGIENIZADO
- Colocar O NOME
- NÃO ARMAZENAR MISTURADO E NEM DILUÍDO

Guardar no refrigerador
NÃO ARMAZENAR POR MAIS DE 2 SEMANAS

Atenção: Se fora armazenar, o melhor é armazenar os sacos contendo o microrganismo



Produção de Bioinsumos "on farm"

FERMENTAÇÃO SÓLIDA - MÉTODO 1 - GARRAFAS



1 REATOR
Em boas condições:



- de 200 a 300 ml de produto
- em média 10^8 unidades de microrganismos por ml

Atenção:

A pressão da praga ou doença deve ser avaliada para indicação de dose.
O ideal é sempre procurar orientação de um agrônomo para indicação de aplicação.

SUGESTÃO DE APLICAÇÃO

2 sacos 300g de arroz:
1 ha



Sempre use EPI



O Material extraído pode ser utilizado como inóculo, desde que extraído com solução extração ESTÉRIL e próximo a chama forte.

Atenção:

Todo material que entrar em contato com o líquido deve ser higienizado e esterilizado em panela de pressão ou autoclave.

SUGESTÃO DE APLICAÇÃO

1 sacos 300g de arroz:
50 L de meio de cultivo



Produção de Bioinsumos "on farm"

FERMENTAÇÃO SÓLIDA - MÉTODO 1 - GARRAFAS



Extração Para utilização como inóculo

- Esterilizar a solução de extração por 30 minutos na panela de pressão ou 15 minutos na autoclave
- Colete o extrato em recipiente esterilizado. A peneira também deve estar estéril.



- Utilizar touca, máscara e higienizar bem as mãos
- Ambiente deve estar limpo e controlado

ANEXO 2



Produção de Bioinsumos “on farm”

PRODUÇÃO EM MEIO SÓLIDO MÉTODO 2 - SACOS

Elaborado por:

Marcela Pavan Bagagli

Iris de Lima

Luiza Helena Sampaio Moro

Orientação:

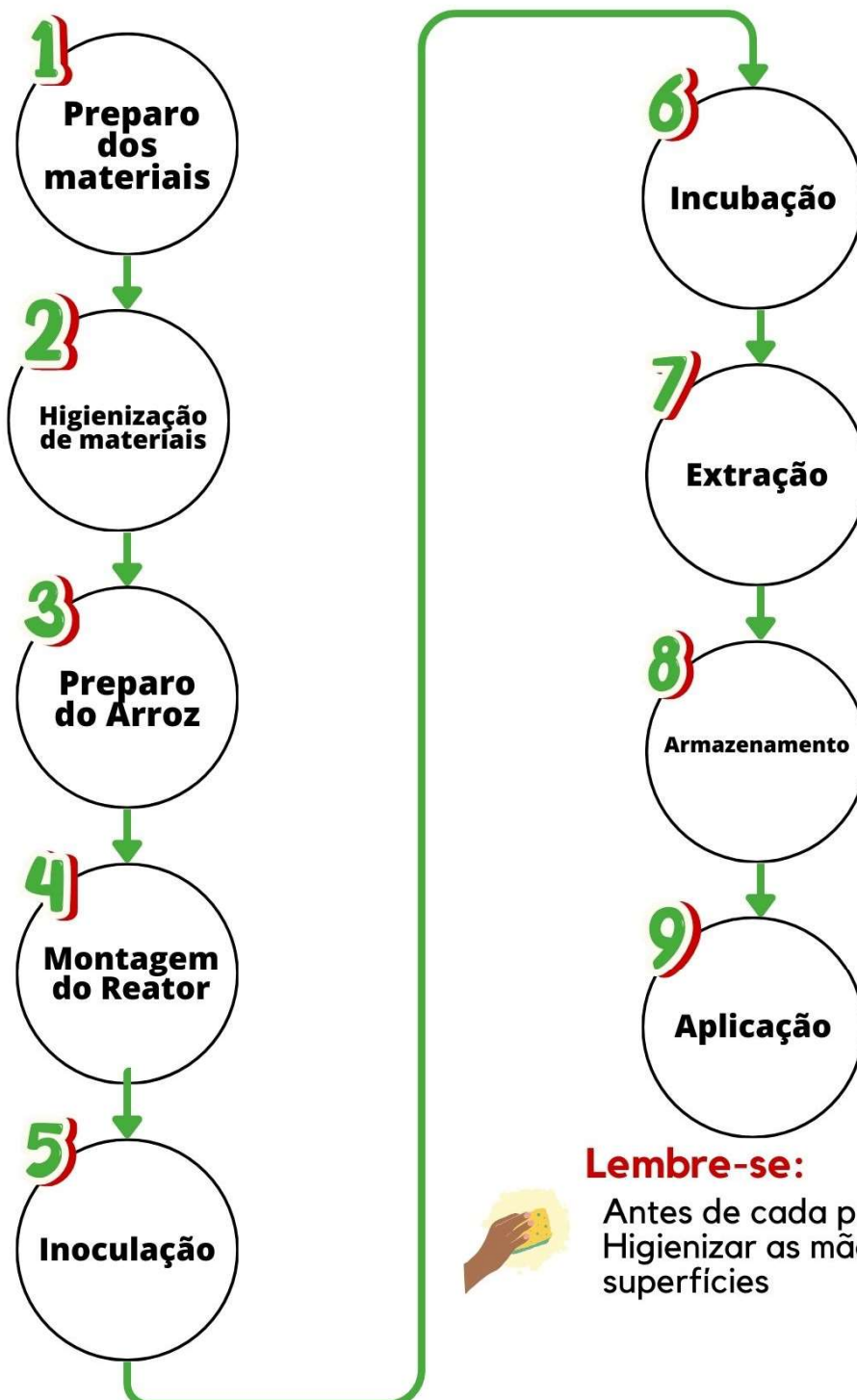
Marcela Pavan Bagagli

Apoio:



Produção de Bioinsumos “on farm”

PRODUÇÃO EM MEIO SÓLIDO



Lembre-se:



Antes de cada processo:
Higienizar as mãos e
superfícies

Produção de Bioinsumos "on farm"

FERMENTAÇÃO SÓLIDA - MÉTODO 2 - SACOS

Lembre-se:

Antes de cada processo:
Higienizar as mãos e superfícies



1

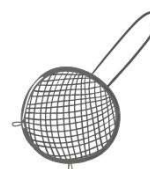
Preparo dos materiais

Separe os sacos que serão utilizados para cultivar o microrganismo, que chamaremos de reator, micropore e grapeador



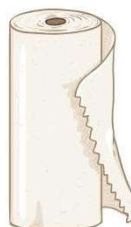
Separe os itens que serão utilizados para montar o reator, tais como:

- Peneira
- Balde
- Panela de pressão elétrica (ou autoclave)
- Caneta e etiqueta para identificação
- Lamparina e fósforo



Separe os itens que serão utilizados para HIGIENIZAÇÃO:

- Água sanitária
- Balde
- Álcool 70%
- Papel toalha
- Cronômetro ou relógio



Produção de Bioinsumos "on farm"

FERMENTAÇÃO SÓLIDA - MÉTODO 2 - SACOS

2

Higienização
de materiais

Prepare a água clorada:

- Para cada 1 L de água adicione 1 colher de sopa de água sanitária (10 mL)
- Prepare quantidade suficiente para higienizar os frascos e os utensílios!



- Coloque todos os utensílios que serão utilizados **COMPLETAMENTE** imersos na água clorada.

Deixe por 15 min em contato e depois escorra e deixe secar naturalmente!



Lembre-se:



Antes de cada processo:
Higienizar as mãos e
superfícies

Produção de Bioinsumos "on farm"

FERMENTAÇÃO SÓLIDA - MÉTODO 2 - SACOS



Lembre-se:

Antes de cada processo:
Higienizar as mãos e superfícies

USE LUVAS!!



OPÇÕES PARA O INÓCULO:

- Produto comercial de qualidade, próprio para multiplicação *on farm*
- Banco de microrganismos

Inóculo: uma quantidade de microrganismo de interesse com concentração adequada e sem contaminantes

Em uma mesa limpa e **HIGIENIZADA COM ÁLCOOL 70%**

- Acenda a lamparina
- Posicione o reator próximo a chama e marque o local de inoculação
- Introduza o inóculo
- Limpe o ponto de aplicação com álcool 70%
- Cubra o ponto de aplicação com Micropore
- Agite bem para cobrir o arroz com o inóculo



Atenção: Coloque dois pedaços de Micropore na região furada pela agulha.

Atenção: Após a aplicação HIGIENIZAR BEM A BANCADA

Produção de Bioinsumos "on farm"

FERMENTAÇÃO SÓLIDA - MÉTODO 2 - SACOS

Lembre-se:



Antes de cada processo:
Higienizar as mãos e superfícies

6

Incubação

Incubar: manter o reator em ambiente adequado por tempo adequado para que o microrganismo cresça

- Mantenha os sacos em pé, deixando o arroz bem expalhado pela sua superfície.
- O tempo de incubação dependerá da temperatura dos dias, variando de 5 a 10 dias.
- **Para FUNGOS:** Após 5 dias, caso o arroz não esteja completamente recoberto pelo fungo, fazer uma abertura nos sacos com uma tesoura HIGIENIZADA e deixar mais 4 dias.



Atenção: Os reatores não devem receber luz do sol diretamente e devem ficar em ambiente coberto

Exemplos de tempo de incubação:

- *Beauveria bassiana* - 7 dias



Produção de Bioinsumos "on farm"

FERMENTAÇÃO SÓLIDA - MÉTODO 2 - SACOS

Lembre-se:

Antes de cada processo:
Higienizar as mãos e superfícies



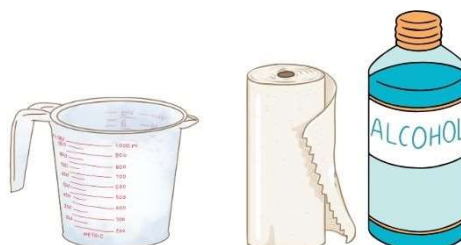
USE LUVAS, MÁSCARA E ÓCULOS!!



Em uma mesa limpa e

HIGIENIZADA COM ÁLCOOL 70%

- Verifique o crescimento do microrganismo
- Se estiver satisfatório, continue, se não, descarte* o material.
- Insira 300 mL de solução extratora ** agite bem por 5 min
- Passe por uma peneira HIGIENIZADA coletando o líquido em um recipiente limpo e higienizado



***O material contaminado deve ser imerso em água clorada (25 ml por L) e depois descartado**

** Solução extratora:

Para cada 1 L de água colocar 8,5g de sal e 1 gota de detergente neutro (ou tween 80)

Produção de Bioinsumos "on farm"

FERMENTAÇÃO SÓLIDA - MÉTODO 2 - SACOS



Lembre-se:

Antes de cada processo:
Higienizar as mãos e superfícies

USE LUVAS!!



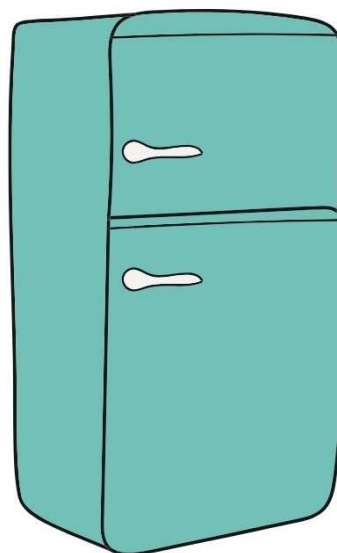
Atenção: o ideal é aplicar após a extração, garantindo que o produto **NÃO** estará contaminado e será eficiente



- Colocar o material em um frasco **ESCURO** com tampa e **HIGIENIZADO**
- Colocar O NOME e DATA
- **NÃO** ARMAZENAR MISTURADO E NEM DILUÍDO

Guardar no refrigerador
NÃO ARMAZENAR POR MAIS DE 2 SEMANAS

Atenção: Se for armazenar, o melhor é armazenar os sacos contendo o microrganismo



Produção de Bioinsumos "on farm"

FERMENTAÇÃO SÓLIDA - MÉTODO 2 - SACOS



1 REATOR
Em boas condições:



- de 200 a 300 ml de produto
- em média 10^8 unidades de microrganismos por ml

Atenção:

A pressão da praga ou doença deve ser avaliada para indicação de dose.
O ideal é sempre procurar orientação de um agrônomo para indicação de aplicação.

SUGESTÃO DE APLICAÇÃO

1 sacos 300g de arroz:
1 ha



Sempre use EPI



O Material extraído pode ser utilizado como inóculo, desde que extraído com solução extração **ESTÉRIL** e próximo a chama forte.

Atenção:

Todo material que entrar em contato com o líquido deve ser higienizado e esterilizado em panela de pressão ou autoclave.

SUGESTÃO DE APLICAÇÃO

1 sacos 300g de arroz:
50 L de meio de cultivo



Produção de Bioinsumos "on farm"

FERMENTAÇÃO SÓLIDA - MÉTODO 2 - SACOS



Extração Para utilização como inóculo

- Esterilizar a solução de extração por 30 minutos na panela de pressão ou 15 minutos na autoclave a 121°C
- Colete o extrato em recipiente esterilizado. A peneira também deve estar estéril.



- Utilizar touca, máscara e higienizar bem as mãos
- Ambiente deve estar limpo e controlado, sendo realizado próximo à chama ou na cabine de fluxo laminar