INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE SÃO PAULO

***CAMPUS* AVARÉ**

CURSO DE BACHARELADO EM ENGENHARIA DE BIOSSISTEMAS

Vinicius Augusto Ribeiro Moreira

ESTUDO DE BIOREATORES E PROTOCOLOS DE PRODUÇÃO DE BIOINSUMOS *ON FARM* PARA PEQUENOS PRODUTORES

AVARÉ

2023

Vinicius Augusto Ribeiro Moreira

ESTUDO DE BIOREATORES E PROTOCOLOS DE PRODUÇÃO DE BIOINSUMOS *ON FARM* PARA PEQUENOS PRODUTORES

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

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

AVARÉ

2023

Catalogação na fonte
Instituto Federal de São Paulo – Campus Avaré

Moreira, Vinicius Augusto Ribeiro
Estudo de Bioreatores e protocolos de produção de bioinsumos on farm para pequenos produtores/ Vinicius Augusto Ribeiro Moreira- Avaré, 2023. 80 p.

Orientador: Prof.ª Dra. Marcela Pavan Bagagli
Monografia (Graduação - Bacharelado em Engenharia de Biossistemas) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo - Campus Avaré, Avaré, 2023.

1. Reatores 2. On farm 3. Bioinsumos I. Bagagli, Marcela Pavan. II. Título.

Ata de Defesa de Trabalho de Conclusão de Curso - Graduação

Na presente data realizou-se a sessão pública de defesa do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado ESTUDO DE BIOREATORES E PROTOCOLOS DE PRODUÇÃO DE BIOINSUMOS *ON FARM* PARA PEQUENOS PRODUTORES apresentado pelo aluno **Vinicius Augusto Ribeiro Moreira (AV3003744)** do Curso **SUPERIOR EM ENGENHARIA DE BIOSSISTEMAS**, (Câmpus Campus Avaré). Os trabalhos foram iniciados às 14:00 pela Professora presidente da banca examinadora, constituída pelos seguintes membros:

Membros	IES	Presença (Sim/Não)	Aprovação/Conceito
Marcela Pavan Bagagli (Presidente/Orientador)	IFSP-Câmpus Avaré	Sim	Aprovado
Meliane Akemi Koike (Examinador 1)	IFSP - Câmpus Avaré	Sim	Aprovado
Juliano Amadeu Palma (Examinador 2)	IFSP - Câmpus Avaré	Sim	Aprovado

Observações:

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

[X] Aprovado(a)

[ ] Reprovado(a)

Nota Final: 9,8

O segundo examinador é avaliador externo:

[X]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,

5 de dezembro de 2023

Documento assinado eletronicamente por:

- **Marcela Pavan Bagagli, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO**, em 05/12/2023 08:36:09.
- **Meliane Akemi Koike, TECNICO DE LABORATORIO AREA**, em 07/12/2023 08:59:39.

Este documento foi emitido pelo SUAP em 05/12/2023. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QRCode ao lado ou acesse https://suap.ifsp.edu.br/autenticar-documento/ e forneça os dados abaixo:

Código Verificador: 659282
Código de Autenticação: e10e6c1ade

AGRADECIMENTOS

À minha família e à minha namorada, por serem meu alicerce e por todo o apoio durante a graduação, principalmente minha mamãe, que sempre cuidou de mim e lutou muito para que eu obtivesse tantas oportunidades na vida e minha vovó sempre fazendo minhas comidas favoritas.

À minha “segunda mãe” a Dra. Marcela Pavan Bagagli, que foi meu grande farol de conhecimento durante toda a execução deste trabalho, além de ser um exemplo de pessoa e profissional para a minha vida, apesar de ser jogadora de LoL.

À todos os colegas e amigos para a vida que fiz durante esses longos e curtos 5 anos de graduação, em especial a todos os meus colegas de laboratório do grupo CIABIO do qual tive a honra de trabalhar junto, compartilhar as conquistas, atuando praticamente como minha segunda família. Confesso que sentirei falta das “comilanças” e cafés da tarde com a companhia dessas pessoas tão incríveis.

Aos incríveis técnicos do IF e a todos os professores com quem tive a honra de aprender muitas coisas.

Ao Igor Sávio por ter me apresentado ao curso.

Ao Juliano da CATI de Manduri e ao Sérgio Pimenta que agregaram com ideias para o trabalho.

À empresa Raiar Orgânicos por conceder a bolsa e insumos que permitiram a realização deste trabalho.

Ao IFSP que permitiu com que eu tivesse todas essas experiências e a infraestrutura para realizar este trabalho.

E por último agradeço aos meus grandes amigos para vida Carlos, o economista mais bonzinho que conheço, Giovanni o médico que espero não cobrar consulta minha no futuro e ao Matheus enquanto ele não eliminar o mundo com sua culinária exótica.

“VI VERI VENIVERSUM VIVUS VICI”

(Christopher Marlowe,1589)

RESUMO

A busca por soluções mais sustentáveis, o aumento global na produção orgânica e a implementação do manejo integrado de pragas (MIP) são fatores que estimulam o uso de bioinsumos, em específico os de origem microbiológica que atuam como bioinseticidas. O aumento do mercado gera o aumento da pesquisa na área, bem como novos produtores desejando utilizar tal tecnologia, uma forma de baratear significativamente o custo é através da produção *on farm*, em que muitas são constituídas por produções amadoras, utilizando-se caixas d'água abertas como reatores instalados em ambientes inadequados. A ausência de controles rigorosos acaba, por muitas vezes, permitir a contaminação de tais fermentações, o que gera perda significativa na qualidade do produto, além de propiciar o crescimento de patógenos prejudiciais à saúde dos produtores. Desta forma, o presente trabalho visou avaliar as condições importantes para produção de bioinsumos *on farm*, focando no projeto de um fermentador com protocolos de higienização e utilização de fácil execução e acessíveis. O protocolo de higienização foi avaliado utilizando dois produtos a base de cloro ativo e, então aplicado nos reatores avaliados tendo como microrganismo modelo o *Bacillus thuringiensis* (Bt). As análises foram feitas por contagem de unidades formadoras de colônia, sendo avaliada a contagem de esporos do Bt, a contaminação por bactérias Gram negativas e bolores e leveduras. O modelo 5 de reator foi capaz de segurar contaminação por até 48 horas, com concentração de 6,6 x 10^6 de Bt, sendo necessário mais estudos para melhorar a eficiência da produção dos microrganismos. Por fim, foram elaborados três manuais para montagem e operação de reatores simples para fermentação submersa de microrganismos de interesse para a agricultura.

Palavras-chave: Reatores, *On farm*, Bioinsumos.

ABSTRACT

The search for more sustainable solutions, the global increase in organic production and the implementation of integrated pest management (IPM) are factors that encourage the use of bio-inputs, specifically those of microbiological origin that act as bio-insecticides. The increase in the market generates an increase in research in the area, as well as new producers wishing to use this technology. One way to significantly reduce the cost is through *on farm* production, many of which are made up of amateur productions, using open water tanks such as reactors installed in unsuitable environments. The absence of strict controls often ends up allowing the contamination of such fermentations, which generates a significant loss in the quality of the product, in addition to promoting the growth of pathogens that are harmful to the health of producers. Therefore, the present work aimed to evaluate the important conditions for the production of *on farm* bioinputs, focusing on the design of a fermenter and hygiene protocol that is easy-to-execute and accessible. The hygiene protocol was evaluated using two active chlorine-based products and then applied to the evaluated reactors using *Bacillus thuringiensis* (Bt) as a model microorganism. The analyzes were carried out by counting colony-forming units, evaluating the Bt spore count, contamination by Gram-negative bacteria, molds and yeasts. The model 5 was capable of holding contamination for up to 48 hours was obtained, with a concentration of $6,6 \times 10^{6}$of *Bt*, requiring further studies to improve the efficiency of microorganism production. Finally, three manuals were prepared for the assembly and operation of simple reactors for submerged fermentation of microorganisms of interest to agriculture.

Key-words: Reactors, On farm, Bioinputs.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Número de registros de bioinsumos desde 1991……..18

Figura 2. Ordem crescente de resistência dos microrganismos à esterilização e aos diferentes níveis de desinfetantes……..23

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.……25

Figura 4. Biofábricas *on farm* constituídas por equipamentos de baixo custo no vale do São Francisco.…….26

Figura 5. Biofábricas *on farm* constituída por equipamentos de custo intermediário proposto pela empresa Fotossíntese……..28

Figura 6. Comparação entre a concentração média de B. thuringiensis nas amostras analisadas. I: amostras inferiores ao padrão, S: amostras superiores ao padrão. Padrão: 9 Log UFC/mL, 1 ✖ 10^9 UFC/mL. O asterisco (*) representa a significância do teste t de Welch para duas amostras ($p \leq 0.01$) para a média dos dados.…….27

Figura 7. Aspecto das colônias bacterianas presentes em amostras de inoculantes à base de *Bacillus* cultivadas em meio Luria Bertani (LB). 1A e 2A referem-se às amostras produzidas em sistema *on farm* com foco na multiplicação de *B. megaterium* e *B. subtilis*; 1B e 2B são amostras com foco na multiplicação de *B. arayabhataii*. A primeira placa em cada linha horizontal refere-se ao produto comercial utilizado como controle.……..28

Figura 8. Procedimentos para avaliação dos sistemas fermentativos propostos….32

Figura 9. Pontos críticos para evitar contaminações e elevar a eficiência de processos fermentativos: uma visão geral do processo…….37

Figura 10. Pontos críticos para evitar contaminações e elevar a eficiência de processos fermentativos: visão detalhada do reator (fermentador). Indicações em vermelho apontam pelo menos um cuidado para evitar que o ponto acarrete contaminações……..38

Figura 11. Curva padrão para quantificação do teor de cloro em amostras de água construída com hipoclorito de sódio, absorbância por concentração……..40

Figura 12. Montagem do reator modelo 1 (Enzo).....42

Figura 13. Montagem do reator modelo 2 (Jessana).....44

Figura 14. Montagem do reator modelo 3 (Ace).....47

Figura 15. Ilustração da bolsa coletora estéril com o meio concentrado e inóculo após preparo em cabine de fluxo laminar.....48

Figura 16. Inserção do meio de cultura concentrado e inóculo com o uso de saco coletor estéril……49

Figura 17. Lâmina de esporos (A) e coloração de Gram (B) após 72 h de fermentação no modelo de reator 3 (Ace).....51

Figura 18. Montagem do reator modelo 4 (Sra. Barrica) sendo (1) saída de ar; (2) cabo de energia da bomba; (3) entrada de ar com o filtro; (4) ponto de inserção de meio de cultivo e inóculo……53

Figura 19. Meio concentrado e inóculo em garrafas estéreis……..55

Figura 20. Adaptação do método de inserção de meio de cultura concentrado e inóculo utilizando garrafas estéreis de alimentação parenteral……56

Figura 21. Microscopia óptica das amostras. (A) coloração de esporos do inóculo; (B) coloração de esporos e (C) coloração de Gram após 48 h de fermentação no modelo de reator 4 (Sra. Barrica).....58

Figura 22. Tubo difusor de bolhas alocado ao fundo do reator……59

Figura 23. Modelo de reator 5 (Rei Artor).....60

Figura 24. Inserção do inóculo pelo furo com auxílio de um funil estéril no modelo de reator 5 (Rei Artor).....61

Figura 25. Estrutura de chama próximo a manipulação do modelo de reator 5 (Rei Artor).....62

Figura 26. Microscopia óptica das amostras. (A) coloração de esporos do inóculo; (B) coloração de Gram do inóculo; (C) coloração de esporos e (D) coloração de Gram após 48 h de fermentação no modelo de reator 5 (Rei Artor).....64

Figura 27. Microscopia óptica das amostras. (A) coloração de esporos do inóculo; (B) coloração de Gram e (C) coloração de esporos para o tempo de 48 h de fermentação; (D) coloração de Gram e (E) coloração de esporos após 72 h de fermentação no modelo de reator 5 (Rei Artor), na segunda fermentação…….68

Figura 28. Fluxograma dos resultados obtidos em cada etapa do desenvolvimento do reator para cultivo de Bt on farm por fermentação submersa para pequenos produtores……..69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Quantificação de heterotróficos mesófilos totais, coliformes totais e termotolerantes e determinação da presença de Salmonella das amostras analisadas a partir da multiplicação on farm……26

Tabela 2. Microrganismos viáveis, expressos em UFC/mL, presentes na em meios para produção “*on farm*" de bioinseticidas……..31

Tabela 3. Médias obtidas da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) em meio PCA após 48 horas após a incubação……41

Tabela 4. Concentração de cloro livre obtida na água de torneira e 24 e 48 h após a cloração da água a 200 ppm.……42

Tabela 5. Contagem média de unidades formadoras de colônias (UFC) por mililitro (ml) nos tempos 0 e 72 h de fermentação no modelo de reator 1 (Enzo).....45

Tabela 6. Quantificação média de contaminantes da água clorada residual e do inóculo para a fermentação realizada no reator 2 (Jessana).....47

Tabela 7. Quantificação média de microrganismos esporulados durante os tempos de fermentação no modelo de reator 2 (Jessana).....48

Tabela 8. Teor de sólidos solúveis (°Brix) e pH durante os tempos de fermentação no modelo de reator 2 (Jessana).....48

Tabela 9. Quantificação média de contaminantes da água clorada residual e do inóculo para a fermentação realizada no reator 3 (Ace).....53

Tabela 10. Quantificação média de microrganismos esporulados durante os tempos de fermentação no modelo de reator 3 (Ace).....53

Tabela 11. Quantificação média de contaminantes da água clorada residual e do inóculo para a fermentação realizada no reator 4 (Sra. Barrica).....58

Tabela 12. Quantificação média de microrganismos esporulados durante os tempos de fermentação no modelo de reator 4 (Sra. Barrica).....58

Tabela 13. Teor de sólidos solúveis (°Brix) e pH durante os tempos de fermentação no modelo de reator 4 (Sra. Barrica).....58

Tabela 14. Quantificação média de contaminantes da água clorada residual e do inóculo para a fermentação realizada no reator 5 (Rei Artor).....63

Tabela 15. Quantificação média de microrganismos esporulados durante os tempos de fermentação no modelo de reator 5 (Rei Artor).....64

Tabela 16. Teor de sólidos solúveis (°Brix) e pH durante os tempos de fermentação no modelo de reator 5 (Rei Artor).....64

Tabela 17. Quantificação média de contaminantes da água clorada residual e do inóculo para a segunda fermentação realizada no reator 5 (Rei Artor).....66

Tabela 18. Quantificação média de microrganismos esporulados durante os tempos de fermentação para a segunda fermentação realizada no modelo de reator 5 (Rei Artor).....67

Tabela 19. Teor de sólidos solúveis (°Brix) e pH durante os tempos da segunda fermentação no modelo de reator 5 (Rei Artor).....67

LISTA DE ABREVIAÇÕES

MIP - Manejo Integrado de Pragas

Bt - *Bacillus thuringiensis*

EPA - Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

PIP - Protetores Incorporados em Plantas

FES - Fermentação em Estado Sólido

FS - Fermentação Submersa

UV - Ultravioleta

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

PCA - Plate Count Agar

PDA - Potato Dextrose Agar

UFC - Unidades Formadoras de Colônia

ABS - Absorbância

ppm- Parte por Milhão

µL - Microlitros

Rpm - Rotações por Minuto

GO - Goiás

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **15**
2 OBJETIVOS **17**
2.1 Objetivo Geral 17
2.2 Objetivos Específicos 17
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **17**
3.1 Mercado de produtos biológicos de aplicação na agricultura 17
3.2 Bioinsumos 18
3.2.1 Bioinseticidas 19
3.3. Processos fermentativos 19
3.3.1. Esterilização em processos fermentativos 21
3.5. Bacillus Thuringiensis 32
4 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS **33**
4.1 Identificação de pontos críticos para a contaminação em reatores para fermentação submersa e construção de modelos 33
4.2 Processos de Higienização 35
4.2.1 Higienização dos componentes do reator 35
4.2.2 Higienização da carcaça do reator 35
4.2.3 Análise da solução clorada residual 35
5 RESULTADOS **39**
5.1 Identificação de pontos contaminação das fermentações 39
5.2 Propostas de reatores e procedimentos operacionais 40
5.2.1. Avaliação da higienização da carcaça dos reatores 40
5.3.2 Avaliação da descontaminação da água de preparo do meio de cultivo 41
5.2.3 Avaliação do cultivo de Bacillus thuringiensis nos sistemas propostos 43
5.2.3.1 Construção e cultivo de Bt no modelo 1 - Enzo 43
5.2.3.2 Construção e cultivo de Bt no modelo 2 - Jessana 45
5.2.3.3 Construção e cultivo de Bt no modelo 3 - Ace 48
5.2.3.4 Construção e cultivo de Bt no modelo 4 - Sra. Barrica 53
5.2.3.5 Construção e cultivo de Bt no modelo 5 - Rei Artor 59
5.2.3.6 Cultivo de Bt no modelo 5 (Rei Artor) com modificações operacionais 66
5.2.4 Resumo visual dos resultados obtidos no cultivo de Bacillus thuringiensis nos sistemas propostos 69
6 CONCLUSÃO **71**
REFERÊNCIAS **72**

1 INTRODUÇÃO

O mercado de alimentos orgânicos se encontra em ascensão no mundo, possuindo grandes áreas em países como Austrália, China e Argentina. No Brasil, em 2017, cerca de 1.136.857 ha foram destinados para a produção de alimentos orgânicos (Willer;Lernoud, 2019), os quais apresentam uma opção mais sustentável para o meio ambiente quando comparado com outras formas de cultivo convencionais (Altieri, 2018). No entanto, para que seja viável a produção desses alimentos são necessárias alternativas para os produtos sintéticos químicos aplicados como promotores de crescimento ou controle de pragas e doenças. Neste cenário, ganham espaço os Bioinsumos.

De acordo com Brasil (2020) no decreto Nº 10.375, um bioinsumo é um produto de origem vegetal, animal ou microbiana com a finalidade de gerar uma resposta positiva na produção, armazenamento e/ou no beneficiamento de produtos agropecuários. Os bioinsumos podem atuar como bioestimulantes ou fitoprotetores, entre eles se destacam os bioinseticidas.

O mercado global de biopesticidas é estimado entre 3 a 4 bilhões de dólares (Marrone, 2019). No Brasil o crescimento do uso desses produtos foi de cerca de 28% em 2020, enquanto no mundo o crescimento foi de 15% (Brasil, 2021).

Existem diversos produtos biológicos utilizados como bioinseticidas a base de microrganismos, dentre esses, os microrganismos que mais se destacam são o *Bacillus thuringiensis* (Bt), o *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e *Baculovirus anticarsia* (Paula Júnior *et al*., 2013).

O Bt apresenta grande destaque, sendo que atua como um bioinseticida ao produzir, durante a sua esporulação, um corpo de inclusão protéico chamado δ-endotoxinas (Monnerat *et al*., 2018), que se torna tóxica para diferentes insetos das ordens Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera, bem como a nematóides (Bravo *et al*., 2005), porém essa proteína é biodegradável e não apresenta toxicidade a humanos.

O crescimento do uso de bioinsumos contribuiu para que propriedades agrícolas despertassem interesse em produzi-los para uso próprio, atividade esta conhecida como produção *on farm* (Embrapa, 2022) e constituindo uma opção de menor custo e maior praticidade para os produtores agrícolas, uma vez que não há necessidade de transporte e armazenamento dos produtos (Monnerat *et al*. 2020). Quanto ao inóculo para a produção se observa frequentemente o uso de produtos comerciais como base (Embrapa, 2022).

Nestas produções *on farm*, de baixo custo, é comum o uso de caixas d'água abertas como reatores, uso de água e meios de cultivo com elevada carga microbiana indesejada, bem como a atuação de mão-de-obra sem conhecimento técnico específico. Para maximizar os efeitos desejados em campo e minimizar riscos biológicos à saúde dos funcionários, técnicas de higiene são fundamentais, uma vez que o meio de cultivo favorece o crescimento de um variado grupo de microrganismos (Santos et al., 2020). Portanto, os contaminantes também podem se multiplicar de forma acelerada, podendo superar até o crescimento dos microrganismos de interesse, influenciando diretamente na concentração do agente biológico e consequente redução da sua eficácia (Valicente, 2018; Matos; Silva, 2023).

Desta forma, a implantação de boas práticas de fabricação e procedimentos operacionais padronizados na manipulação e higienização são fundamentais para o controle de qualidade, seguindo os limites aceitáveis de contaminantes (Pinto; Kaneko; Ohara, 2000). Um método barato e acessível utilizado para desinfecção é a utilização de compostos clorados, como o hipoclorito de sódio (presente na água sanitária).

Existe uma escassez de materiais de fácil acesso voltados para a produção de microrganismos *on farm*, com alternativas de baixo custo e seguras, o que pode acarretar em produções com baixa qualidade, gerando riscos à saúde dos manipuladores e ineficácia do produto, o que torna tal tecnologia menos acessível e mais perigosa para pequenos produtores.

Desta forma, o seguinte trabalho tem como objetivo validar processos e modelos de reatores e processos de operações de modo que seja possível reduzir

significativamente a contaminação, principalmente de patógenos, de um produto *on farm* e obter produto com quantidade significativa de agentes ativos, utilizando modelos simples e baratos, além de gerar um manual de instruções.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Propor e avaliar processos e procedimentos para utilização de biorreatores para produção de bioinsumos *on farm*, por fermentação submersa, em pequenas propriedades rurais, de forma a obter produtos aplicáveis na agricultura.

2.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos do trabalho foram:

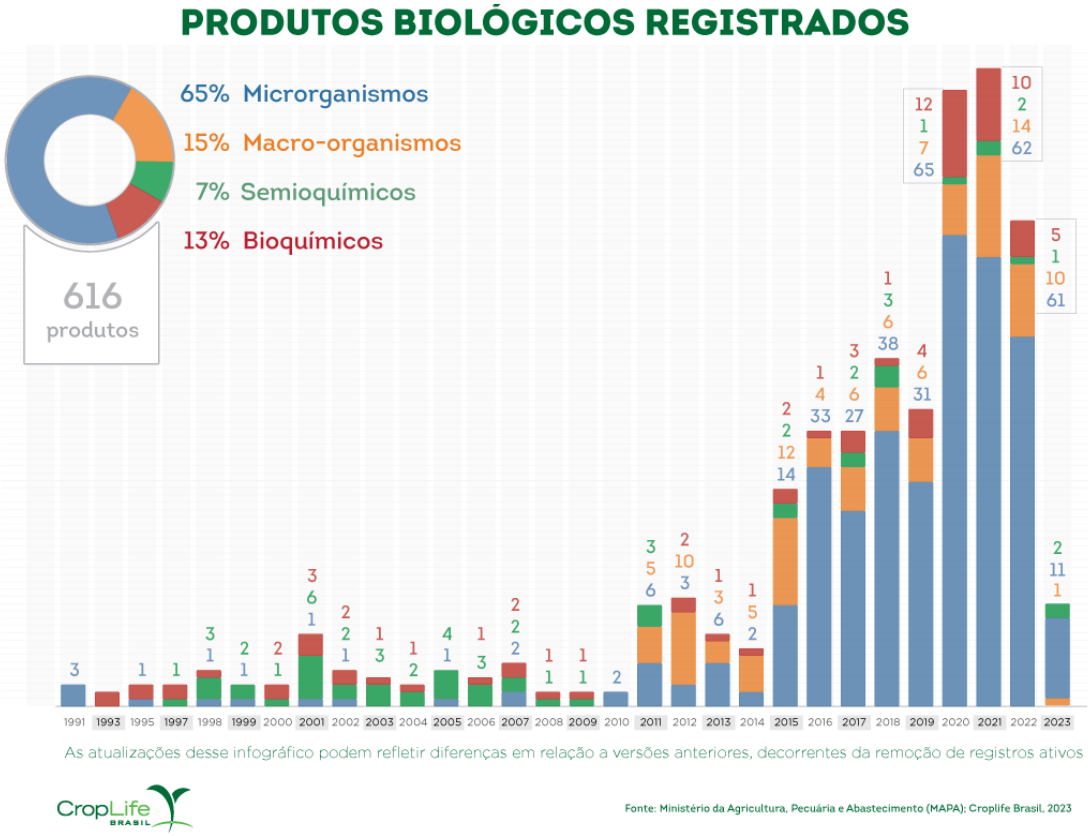
- Propor e avaliar biorreatores para fermentação submersa, voltados para pequenos produtores rurais;
- Avaliar processo de higienização do biorreator;
- Avaliar procedimentos de operações do biorreator;
- Avaliar fermentações de *Bacillus thuringiensis* (Bt) utilizando os métodos propostos.
- Elaborar manual de construção e operação dos processos propostos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Mercado de produtos biológicos de aplicação na agricultura

O Brasil tem tomado posição favorável ao mercado dos produtos biológicos com aplicação na agricultura. Com a criação do plano nacional de bioinsumos, vem apresentando um crescimento exponencial, alcançando 28% de crescimento no uso por ano (Brasil, 2021). Dados mais recentes do mercado demonstram um crescimento nos produtos comerciais disponíveis, sendo que de 2021 para 2022 houve 157 novos produtos dessa categoria registrados, mostrando um aumento de 70% comparado a 2021 (Brasil, 2022). É possível observar na figura 1 que desses produtos, 65% são à base de microrganismos.

Figura 1. Número de registros de bioinsumos desde 1991.



Fonte: CropLife Brasil, disponível em: https://croplifebrasil.org/publicacoes/produtos-biologicos-registrados/. Acesso em: 7 de nov. 2023.

3.2 Bioinsumos

De acordo com o decreto Nº 10.375 de 2020, do MAPA, um bioinsumo é um produto de origem vegetal, animal ou microbiana com a finalidade de gerar uma resposta positiva na produção, armazenamento e/ou no beneficiamento de produtos agropecuários. Os bioinsumos podem atuar como fitoprotetores ou bioestimulantes, dentre os diversos produtos que se enquadram como bioinsumos fitoprotetores é possível destacar os bioinseticidas.

3.2.1 Bioinseticidas

De acordo com a agência de proteção ambiental dos Estados Unidos (EPA) os bioinseticidas podem ser classificados em três tipos, sendo eles os bioquímicos naturais que atuam através de mecanismos não tóxicos a humanos (pesticidas bioquimicos), os microrganismos entomopatogênicos (fungos, bactérias, vírus ou

nematóides) e protetores incorporados em plantas (PIP), derivados de plantas geneticamente modificadas .

Dentre toda a gama de produtos, um microrganismo se destaca: o *Bacillus thuringiensis*, sendo um grande exemplo de bioinseticida de sucesso possuindo grande presença no mercado (Bravo *et al*., 2011; Kumar *et al*., 2021).

3.3. Processos fermentativos

O conceito de fermentação não é algo novo para a humanidade, visto que há registros de práticas fermentativas desde 4000 a.c. Portanto, o que houve com o passar do tempo foi a sofisticação e melhoramento de processos, chegando nos dias de hoje, onde é possível ter um alto controle e eficiência de uma fermentação (Stanbury; Whitaker; Hall, 1995).

De acordo com Stanbury; Whitaker; Hall, 1995, existem 5 grandes grupos importantes de processos fermentativos comerciais: Aqueles que produzem células microbianas (ou biomassa) como produto; Aqueles que produzem enzimas microbianas; Aqueles que produzem metabólitos microbianos; Aqueles que produzem produtos recombinantes; Aqueles que modificam um composto que é adicionado à fermentação do processo de transformação.

Para o bom desenvolvimento de processos fermentativos, independente de qual deles, é importante levar em consideração a formulação do meio de cultivo a ser utilizado durante o desenvolvimento do inóculo e do processo de produção. Ainda, técnicas de esterilização do meio, equipamentos principais e equipamentos auxiliares são de extrema importância para a eficiência dos processos fermentativos, eliminando contaminantes. O uso de uma cultura ativa e pura em quantidade suficiente para inocular o recipiente de produção, bem como o estabelecimento de condições ótimas para o desenvolvimento dos microrganismos, influenciam a produtividade do processo. A extração do produto e sua purificação, embora não sejam parte em si do processo fermentativo, apresentam relevância para a qualidade final do produto desejado. Por fim, os efluentes e resíduos produzidos pelo processo devem ser corretamente destinados, evitando impactos ambientais adversos dos processos fermentativos (Stanbury; Whitaker; Hall, 1995; Schmidell *et al*., 2001; Mattedi *et al*., 2023).

Os dois principais tipos de fermentação, em relação ao estado físico, são a fermentação em estado sólido (FES) e a fermentação submersa (FS). Na FES não há presença de água livre circulante, enquanto na FS há a presença de água livre e substratos solúveis (Farinas *et al*., 2014). Processos fermentativos são muitos utilizados nos setores industriais tais como o farmacêutico (sintetizando enzimas e proteínas benéficas), o alimentício (com bebidas e alimentos fermentados como cerveja e queijo), o agrícola (com bioinsumos), entre outros.

Para a produção de produtos a base de microrganismos, a técnica de produção mais utilizada é a FS, entre as vantagens de se utilizar tal técnica se destaca a constância e controle da produção, tendo fácil reprodutibilidade, bem como fácil escalabilidade e manipulação do processo (Stanbury; Whitaker; Hall, 1995; Schmidell *et al*., 2001; Pandey, 2003; Holker; Lenza, 2005; Mattedi *et al*., 2023). Já as desvantagens da FS se destaca a alta tecnologia aplicada, sendo necessário um fermentador (biorreator) que muitas vezes é complexo e caro, além de necessitar de um sistema de aeração estéril (Pandey, 2003; Mattedi *et al*., 2023).

A FES, por sua vez, é muito utilizada para a multiplicação de fungos filamentosos, apresentando como pontos positivos o seu meio de cultivo, que pode ser composto de resíduos industriais, e baixa energia envolvida, o que permite uma produção mais sustentável e que contribui uma economia circular . Esse método tem como pontos negativos principalmente a sua difícil escalabilidade, e grande heterogeneidade do meio de cultura, o que dificulta o controle de tais processos bem como impacta a constância de resultados obtidos (Pandey, 2003; Holker; Lenza, 2005; Mattedi *et al*., 2023).

3.3.1. Esterilização em processos fermentativos

A esterilização é um processo que envolve a eliminação completa de todos os microrganismos, incluindo bactérias, vírus, esporos e outros patógenos, bem como suas formas não vegetativas (como esporos bacterianos). A esterilização é usada para garantir que um objeto, superfície ou substância esteja livre de qualquer forma de vida microbiana viável. A desinfecção, por outro lado, é um processo que reduz significativamente a carga microbiana de uma superfície, mas não

necessariamente elimina todos os microrganismos, sendo um processo menos rigoroso em comparação a esterilização (Schmidell *et al*., 2001; Roberts, 2009).

A esterilização e desinfecção podem ocorrer por agentes físicos ou agentes químicos. Os principais agentes físicos esterilizantes são o calor seco, o calor úmido, a radiação ultravioleta e a radiação gama (Schmidell *et al*., 2001; Nogueira *et al*., 2015). Dentre esses, o principal método utilizado é a esterilização por calor, porém, em situações em que não se permite que seja utilizado tal método, para alcançar o grau de higienização (limpeza mais desinfecção) necessário em um processo específico, recorre-se o uso de germicidas químicos (Schmidell *et al*., 2001; Nogueira *et al*., 2015).

Ao contrário da esterilização por aplicação de calor, essas substâncias em geral funcionam à temperatura ambiente, mas exigem tempos de contato mais longos para obter o efeito desejado. Além disso, a eficácia desses agentes de desinfecção depende de diversos fatores, como as propriedades físicas do material a ser tratado e as condições químicas do ambiente (Schmidell *et al*., 2001; Roberts, 2009; Nogueira *et al*., 2015).

Todos esses fatores podem afetar negativamente o processo de esterilização ou desinfecção, e apenas a prática contínua pode levar ao desenvolvimento de um procedimento padronizado que garanta o nível de redução de contaminantes apropriado para um determinado processo industrial (Schmidell *et al*., 2001). Um agente químico ideal pode variar de acordo com o tipo de operação e equipamentos envolvidos, porém, de forma geral deve ser barato, de fácil acesso e manipulação, solúvel em água e não ser tóxico ao ser humano (Nogueira *et al*., 2015).

Em um processo fermentativo é preciso esterilizar a superfície de contato dos equipamentos com o material a ser fermentado, os meios de cultivo (líquido e/ou sólido) e o ar que fará a oxigenação do meio (Schmidell *et al*., 2001).

A esterilização de superfícies envolve a eliminação de microrganismos em objetos, equipamentos, superfícies de trabalho e ambientes. Métodos comuns incluem o uso de desinfetantes, produtos químicos esterilizantes e radiação ultravioleta. Desinfetantes são frequentemente usados em ambientes hospitalares e laboratóriais para desinfetar superfícies de alto toque, como maçanetas e mesas. A

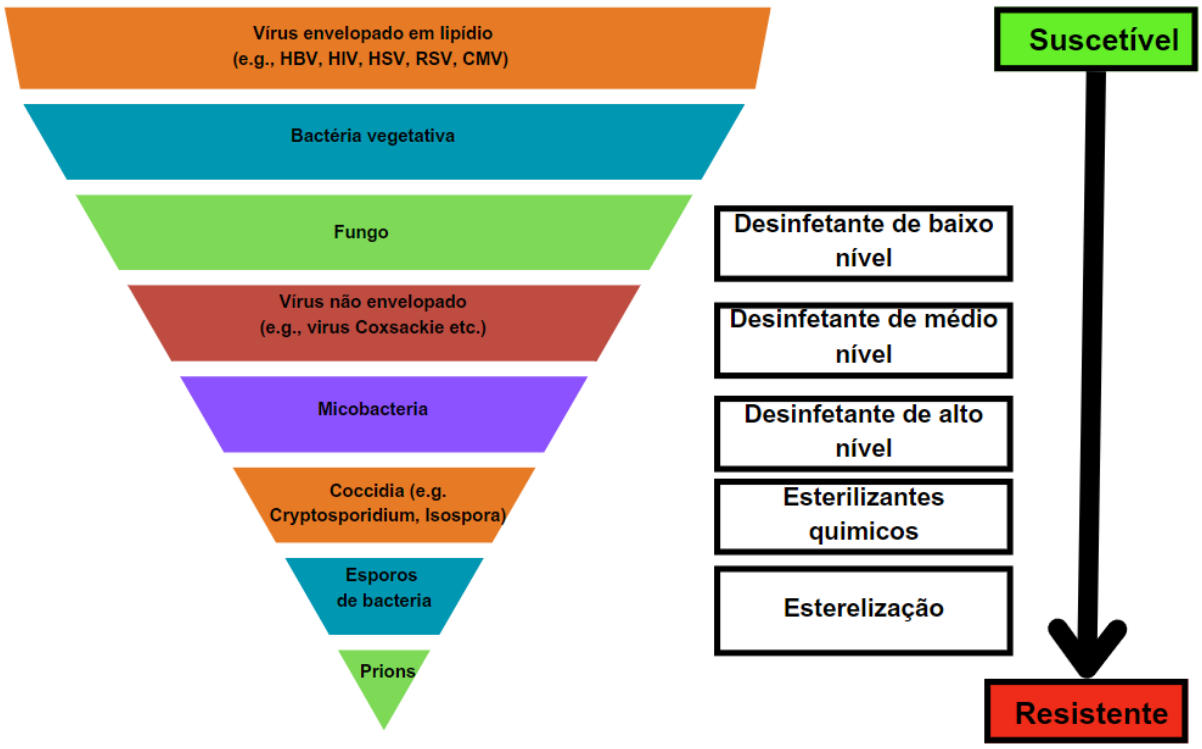
radiação ultravioleta é usada para desinfecção do ar e superfícies, expondo os microrganismos à radiação ultravioleta (UV) germicida que danifica seu DNA e RNA (Roberts, 2009; Pereira *et al*., 2014).

A esterilização de líquidos, como soluções aquosas, podem ocorrer por meio de métodos como autoclavação, filtração esterilizante ou tratamento térmico. A autoclavação é um processo que utiliza calor úmido sob pressão para eliminar microrganismos. Isso é eficaz na esterilização de líquidos, pois a pressão impede que a água evapore a altas temperaturas. A filtração esterilizante envolve a passagem do líquido através de filtros com poros pequenos o suficiente para reter microrganismos. Outros métodos de esterilização química, como a esterilização com óxido de etileno, também podem ser usados, dependendo da compatibilidade do líquido com esses processos (Schmidell *et al*., 2001; Roberts, 2009).

A esterilização do ar por filtração se destaca como a escolha para alcançar elevadas taxas de ar esterilizado, devido aos custos reduzidos associados a esse procedimento e à disponibilidade de filtros altamente confiáveis (Schmidell *et al*., 2001; Roberts, 2009). Embora seja possível considerar alternativas, como o uso de calor ou de gases esterilizantes, incluindo óxido de etileno e peróxido de hidrogênio, a filtração ainda se mantém como a opção preferencial (Schmidell *et al*., 2001; Roberts, 2009).

De acordo com Tietjen; Cronin; McIntosh (1992), uma esterilização eficaz requer tempo, superfície de contato, temperatura e, no caso da esterilização a vapor, alta pressão. A eficácia de qualquer método de esterilização também depende do tipo e o número de microrganismos presentes, da quantidade e tipo de material orgânico que protege os microrganismos e o número de fissuras e fendas em um instrumento/superfície que podem abrigar microrganismos. Cada tipo de microrganismo possui resistência diferente aos diferentes tipos de esterilização que, de forma resumida, podem ser observados na figura 2.

Figura 2. Ordem crescente de resistência dos microrganismos à esterilização e aos diferentes níveis de desinfetantes.



Fonte: Adaptado de Mohapatra (2017).

O hipoclorito como desinfectante se destaca uma vez que atende aos padrões como um agente químico ideal, sendo capaz de inativar microrganismos em meio líquido, apesar de perder sua eficácia quando há alta concentração de matéria orgânica (Souza; Daniel, 2005), apresentando excelente ação microbicida na higienização de superfícies (Meyer, 1994; Pereira *et al*., 2014).

3.4. Fermentações *on farm*

A produção *on farm,* em resumo, é a produção de bioinsumos na propriedade agrícola exclusivamente para uso próprio, sendo proibida a comercialização. Ainda não há legislação específica que regulamente essa produção mas, de acordo com a nota técnica da Embrapa (2021), para se produzir *on farm* é recomendado que seja feito um cadastro de estabelecimento produtor junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), é necessário que a produção seja supervisionada por um técnico habilitado e que a produção seja apenas de

microrganismos que constam na lista do MAPA. Não existe nenhuma obrigatoriedade quanto ao controle de qualidade na produção *on farm*, ainda, porém é necessário que o produto agrícola tenha uma boa qualidade para que se obtenha os efeitos desejados (Lana *et al*., 2022).

Para que seja possível obter a qualidade desejada é necessário que exista um controle dos processos produtivos, a fim de evitar que ocorra o crescimento de microrganismos indesejados, uma vez que tal contaminação além de impactar na eficiência do produto pode gerar riscos à saúde quando há a presença de patógenos (Valicente, 2018; Santos *et al*., 2020; Matos; Silva, 2023; Lana *et al*., 2022).

Atualmente existem uma variedade de modelos de equipamentos e infraestrutura de biofábricas *on farm*, sendo que podem ser de alto, médio e baixo investimentos. Nos modelos de alto investimento é possível observar elementos construtivos que se assemelham como uma indústria biotecnológica, empregando reatores de aço-inox (material sanitário), processos esterilização com aplicação de temperatura elevada e possibilitam uma produção com alta concentração e pureza do microrganismo de interesse (figura 3). Empresas como SoluBio® e Allbiom oferecem produtos e soluções nesta linha de investimento.

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)

Fonte: SoluBio®; Allbiom®.

Modelos de baixo custo, por sua vez, são equipados com reatores plásticos, muitas vezes não sanitários, com pouco ou nenhum controle de contaminantes no processo, o que reduz a qualidade do produto final. A figura 4 traz observações feitas por Santos *et al.* (2020), que avaliaram a qualidade microbiológica de bioprodutos multiplicados *on farm* no Vale do São Francisco e evidenciaram a contaminação de 100% das amostras além da presença de coliformes termotolerantes e *Salmonella* sp. em mais de 70% das amostras, sendo que as quantificações de possíveis contaminantes e do microrganismo de interesse em diferentes produtos amostrados podem ser observadas na tabela 1.

Figura 4. Biofábricas *on farm* constituídas por equipamentos de baixo custo no vale do São Francisco.

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

Tabela 1. Quantificação de heterotróficos mesófilos totais, coliformes totais e termotolerantes e determinação da presença de Salmonella das amostras analisadas a partir da multiplicação on farm.

Amostras	**Quantificação de Bactérias Heterotróficas Totais (UFC/ mL^{-1})**	**Coliformes Totais (NMP/mL)**	**Coliformes Termotolerantes (NMP/mL)**	**Salmonella – Shigella**
A1 - E (*Bacillus amyloliquefaciens* D-747)	4,9 . 10^{10}	>1.100	210	**Ausente**
A2 - G (*Chromobacterium subtsugae*)	7,1 . 10^{10}	>1.100	1.100	**Presente**

A3 - A (*Azospirillum brasilense*)	5,5 . 10^{10}	>1.100	21	**Presente**
A4 - P (*Saccharopolyspora spinosa*)	1,6 . 10^{11}	>1.100	93	**Presente**
A5 – B (*Bacillus thuringiensis* var. kurstaki HD-1)	2,4 . 10^{11}	>1.100	7,4	**Presente**
A6 – CS1 (*Saccharopolyspora spinosa*)	3,9 . 10^{8}	>1.100	11	**Presente**
A7 – CC1 (*Chromobacterium sp.*)	9 . 10^{7}	>1.100	20	**Presente**
A8 – S1 (*Bacillus subtilis* QST 713)	4,2 . 10^{9}	>1.100	<3,0	**Presente**
A9 – S2 (*Bacillus subtilis* QST 713)	2,2 . 10^{10}	>1.100	210	**Presente**
A10 – CS2 (*Saccharopolyspora spinosa*)	3,1 . 10^{10}	<3,0	<3,0	**Ausente**
A11 – CC2 (*Chromobacterium sp.*)	1,3 . 10^{9}	<3,0	<3,0	**Ausente**
A12 – S3 (*Bacillus subtilis* QST 713)	4,8 . 10^{9}	>1.100	>1.100	**Presente**

Fonte: Santos *et al*., 2020.

Modelos intermediários, por sua vez, atuam como um meio termo entre as duas produções, apresentando menor investimento quando comparado aos reatores em aço-inox e esterilização por temperatura, maior eficiência quando comparados aos reatores de baixo custo em caixas d´água. Estes modelos, em geral, não evitam completamente contaminações pelo ambiente, sendo que muitas vezes a inoculação é feita em ambiente não controlado com a abertura da tampa do reator e o processo de esterilização é químico, com pouco controle, muitas vezes sendo menos eficiente que os processos térmicos (Schmidell *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2020). A figura 5 apresenta um sistema da empresa Fotossíntese.

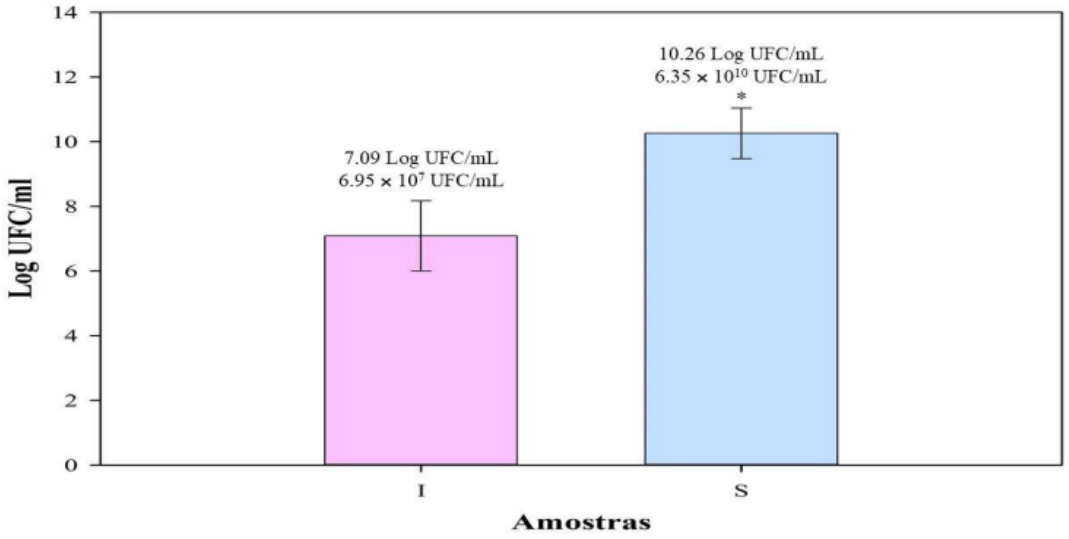
Figura 5. Biofábricas *on farm* constituída por equipamentos de custo intermediário proposto pela empresa Fotossíntese.

Fonte: Fotossíntese, disponível em: https://fotossintese.ind.br/loja/artigo/fotossintese-desenvolve-biofabricas-on-farm-moveis-prontas-para-uso. acesso em: 07 de nov. 2023.

Outro estudo realizado por Matos; Silva (2023), onde foram analisadas 57 amostras de bioinsumos originárias de 21 propriedades rurais, observou-se que 32 possuíam concentrações viáveis do microrganismo de interesse. Ao compararem a concentração do microrganismo de interesse com a de contaminantes, foi possível observar que no grupo em que atingiu a concentração de microrganismos de

interesse desejada, foi maior, enquanto no grupo em que não atingiu a concentração foi menor, conforme apresentado na figura 6.

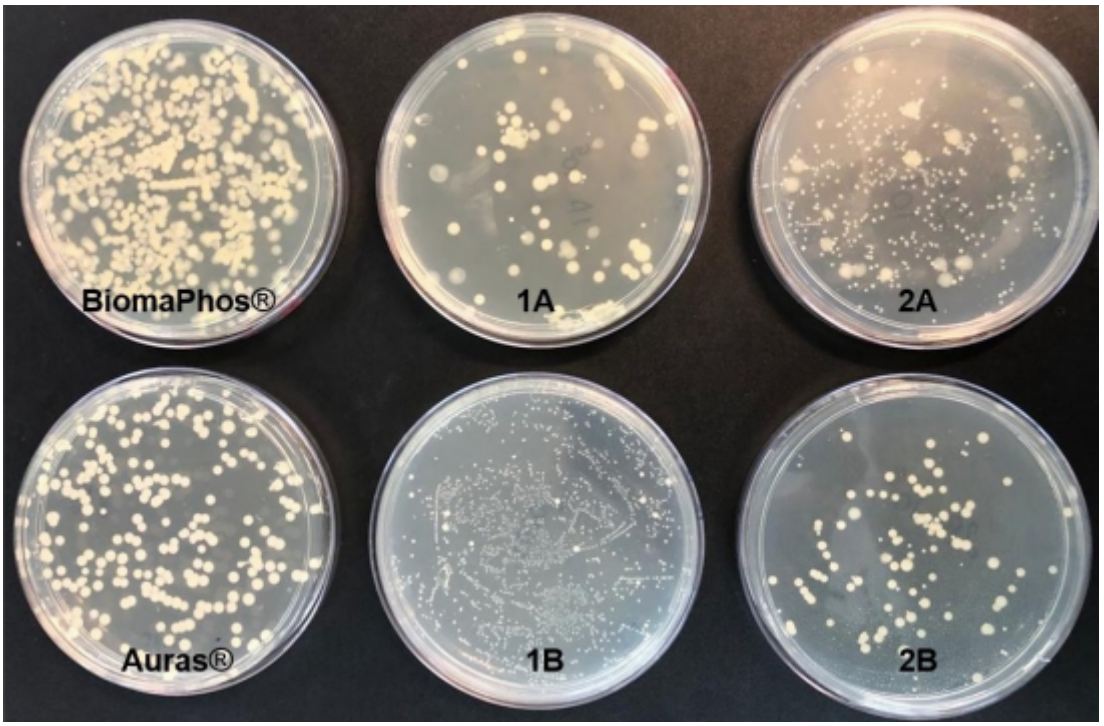
Figura 6. Comparação entre a concentração média de *B. thuringiensis* nas amostras analisadas. I: amostras inferiores ao padrão, S: amostras superiores ao padrão. Padrão: 1 x 10^9 UFC/mL (9 Log UFC/mL). O asterisco (*) representa a significância do teste t de Welch para duas amostras ($p \leq 0.01$) para a média dos dados.



Fonte: Matos; Silva (2023).

Em outro estudo desenvolvido por Lana *et al*. (2022), onde houve a caracterização e comparação de 4 amostras de produtos *on farm* a base de *Bacillus* com 2 produtos comerciais semelhantes, foi possível observar que nas amostras *on farm* haviam alta presença de contaminantes patogênicos, enquanto os comerciais não havia a presença de nenhum patógeno. A comparação dos microrganismos que cresceram de tais amostras pode ser observado na figura 7.

Figura 7. Aspecto das colônias bacterianas presentes em amostras de inoculantes à base de *Bacillus* cultivadas em meio Luria Bertani (LB). 1A e 2A referem-se às amostras produzidas em sistema *on farm* com foco na multiplicação de *B. megaterium* e *B. subtilis*; 1B e 2B são amostras com foco na multiplicação de *B. arayabhataii*. A primeira placa em cada linha horizontal refere-se ao produto comercial utilizado como controle.



Fonte: Lana *et al*. (2022).

Lana *et al*. (2019) analisaram 10 amostras de biopesticida à base de *Bacillus thuringiensis*, de produtores *on farm*, de diferentes propriedades da região de Jataí (GO), comparando com um produto comercial equivalente. Os autores observaram que todas as amostras produzidas *on farm* estavam contaminadas por patógenos.

Saionara (2022), ao comparar bioinsumos produzidos por uma biofábrica *on farm* com produtos comerciais, observou que a maioria dos bioinsumos comerciais possuíam o mínimo de concentração de células exigidas para a aplicação no campo. No caso da biofábrica *on farm* analisada havia contaminação dos produtos produzidos, enfatizando que há a necessidade de implementar boas práticas de fabricação nesses tipos de sistemas de produção e pontuando que um produto *on farm* não terá o mesmo nível tecnológico de um produto comercial.

Abrunhosa (2019) conduziu um experimento para avaliar a contaminação de meios de cultura utilizados para produção *on farm* de bioinseticida, também propondo um kit que auxilia o produtor no controle da produção *on farm*. Os resultados obtidos foram similares aos trabalhos anteriores, observando a presença de patógenos em todas as amostras, como evidenciado pela tabela 2.

Tabela 2. Microrganismos viáveis, expressos em UFC/mL, presentes na em meios para produção “*on farm*" de bioinseticidas.

Micro-organismo	Micro-organismos viáveis em placas 90x15mm					Micro-organismos viáveis no kit laboratorial				
	ME *Bt*	A	B	C	D	ME *Bt*	A	B	C	D
Salmonella	-	-	-	-	-	0	0	0	>300.000	0
Escherichia coli	-	-	-	-	-	0	>300.000	>300.000	>300.000	>300.000
Enterococos	0	0	0	>300.000	0	0	0	0	>300.000	0
Estreptococos	-	-	-	-	-	0	>60.000	0	>300.000	>100.000
Bacillus thuringiensis	-	-	-	-	-	>300.000	>300.000	>300.000	>300.000	>300.000
Coliformes termotolerantes	-	-	-	-	-	0	>300.000	>300.000	>300.000	>300.000
Fungos	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0

Fonte: Abrunhosa (2019).

Tais resultados preocupantes levantaram questionamentos de muitos pesquisadores que alertavam para a necessidade de uma modernização da legislação para obtenção de bioinsumos *on farm* (Faria; Landgraf, 2022, Meyer, 2022) ainda alerta que a produção de inóculos em sistema *on farm* podem representar um retrocesso na tecnologia de fixação biológica de nitrogênio. Apesar de existirem notas técnicas como as da Embrapa, ainda é necessário que haja uma legislação que auxilie e organize esse tipo de produção.

Em resumo, é fundamental que haja um conhecimento sobre as etapas produtivas para reconhecer os mecanismos por trás da contaminação (Bugno; Buzzo; Pereira, 2003). E é necessário que haja o uso de boas práticas de fabricação (BPF) nesse tipo de produção, uma vez que o controle da contaminação microbiana é um aspecto importante na garantia da qualidade do produto (Sharpell; Manowitz, 1991; Abrunhosa, 2019; Lana *et al*., 2022). Portanto é necessário que sejam desenvolvidos processos eficientes e simplificados para os pequenos produtores que dispõem de poucos recursos para investir em uma produção *on farm*, e que garanta no mínimo uma produção segura, sem a presença de patógenos.

3.5. *Bacillus Thuringiensis*

Bacillus thuringiensis é uma bactéria Gram-positiva que foi isolada pela primeira vez em 1901 pelo cientista japonês Shigetane Ishiwatari. Ela é encontrada naturalmente em ambientes, como no solo, e é conhecida por sua capacidade de produzir proteínas tóxicas para insetos. Essas proteínas, chamadas de proteínas Cry (*crystal proteins*) ou δ-endotoxinas. O Bt produz tais cristais durante sua fase estacionária de crescimento, onde esporula. Essas proteínas Cry são altamente tóxicas para larvas de insetos, especialmente aquelas de ordens como Lepidoptera (borboletas e mariposas), Coleoptera (besouros) e Diptera (moscas). (Whiteley *et al*., 1986; Bravo *et al.*, 2005)

As proteínas Cry são ingeridas pelas larvas de insetos e, no ambiente alcalino do trato digestivo do inseto, as proteínas se solubilizam e se tornam toxinas ativas que se ligam a receptores específicos na membrana do intestino, perfuram a membrana e levam à morte do inseto devido a danos no sistema digestivo e subsequente inanição (Whiteley *et al*., 1986; Bravo *et al*., 2005).

Uma das principais vantagens de Bt é sua toxicidade seletiva. As proteínas Cry afetam principalmente insetos-alvo específicos, poupando organismos não-alvo, incluindo humanos, animais e insetos benéficos. O Bt tem sido amplamente utilizado como biopesticida na agricultura orgânica e convencional. Também tem sido utilizado para modificações genéticas em plantas como milho e algodão para expressar genes da proteína Cry, tornando essas plantas resistentes a insetos-alvo (Bravo *et al*., 2011; Weiser *et al*., 1986; Fontes; Valadares-Inglis *et al.*, 2020).

Apesar do Bt ser reconhecido principalmente por seus efeitos inseticidas, estudos apontam que na realidade tal microrganismo possui características multifuncionais, podendo atuar como antifúngico e estimulante de crescimento (Fernandes *et al*., 2019; Unzue *et al.*, 2022).

O *Bacillus thuringiensis*, necessita de altos níveis de aeração para esporular, sendo necessário taxas de aeração de 80 mL/250 mL (Boniolo *et al.,* 2012; Pan *et al.,* 2021), portanto ele atua como um bom modelo de microrganismo na construção de um reator. Quanto à concentração desejada, o isolado CBMAI 1398, tem sua concentração recomendada (Brasil, 2018) como: 2,0 x 10^8 UFC por mililitro ou grama de produto formulado. Portanto, de forma genérica a concentração desejada em cada fermentação *on farm* é de 2,0 x 10^8 UFC/mL.

4 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

4.1 Identificação de pontos críticos para a contaminação em reatores para fermentação submersa e construção de modelos

A partir de um reator básico para condução de fermentações submersas, conforme descrito por Stanbury; Whitaker; Hall (1995), Waites *et al*. (2001) e Schmidell *et al.* (2001), realizou-se uma análise crítica sobre os pontos de contaminação e a busca de soluções para os problemas identificados. Em seguida foram montados reatores, sendo avaliada a qualidade microbiológica do produto final obtido, tendo como bactéria modelo *Bacillus thuringiensis*, uma bactéria Gram positiva.

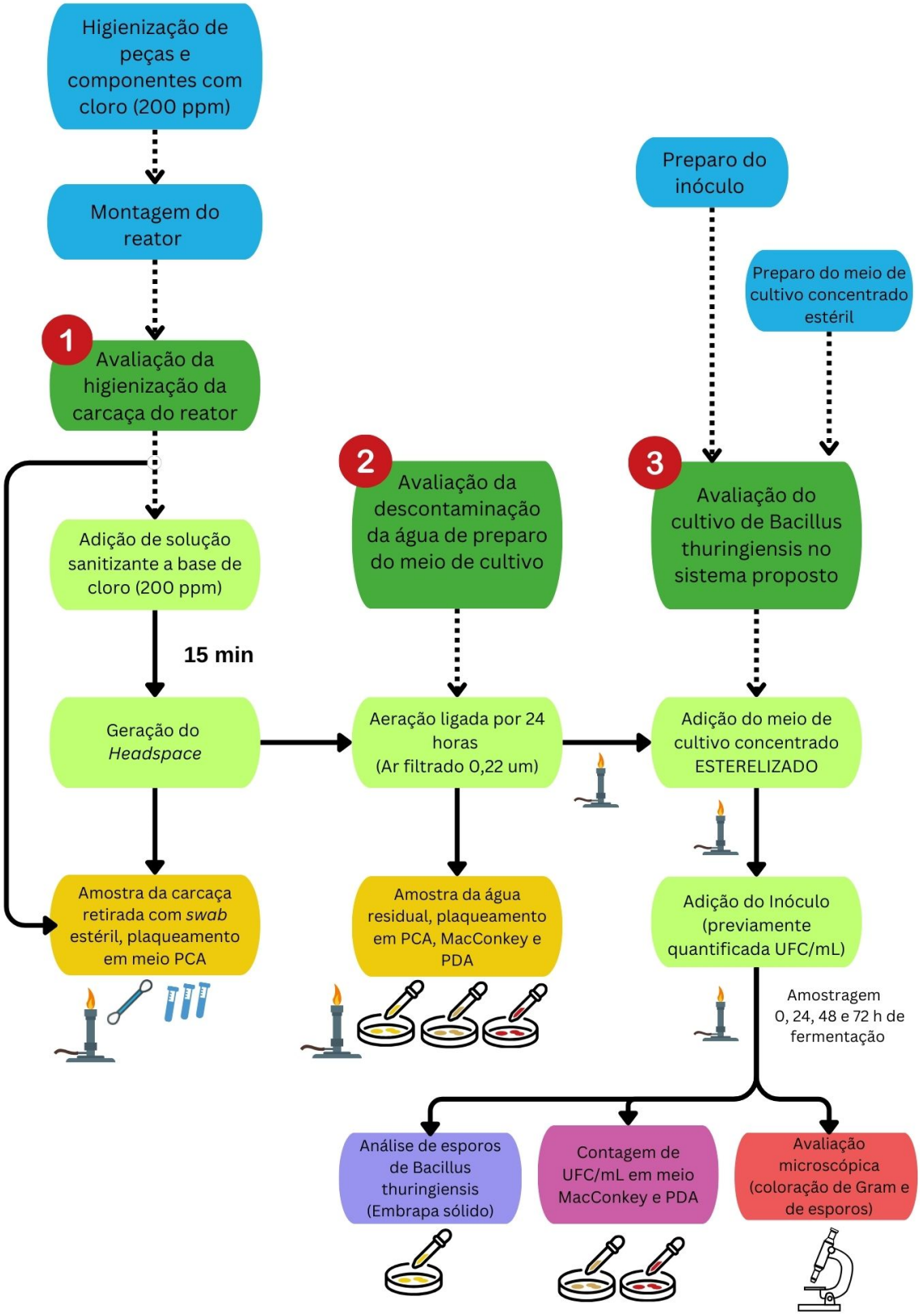
Em cada reator montado, a partir dos resultados obtidos, foi feito uma avaliação e definidos novos pontos de melhoria. Os reatores com melhor performance e praticidade de montagem e operação foram selecionados.

Os reatores avaliados foram de material plástico, em geral de uso alimentício, mas não só. O meio de cultivo foi sempre elaborado com a água residual de higienização dos reatores, após a formação de uma área livre na parte superior, denominada de headspace. Foram avaliados 2 métodos de aeração, aeração por

Venturi, com o uso de bomba interna e externa, e aeração com compressor de ar. O ar foi filtrado testando filtro caseiro e filtro comercial.

A figura 8 apresenta de forma resumida e visual a sequência metodológica utilizada para avaliar os sistemas de fermentação propostos, as quais serão descritas nos seguintes itens.

Figura 8 - Procedimentos para avaliação dos sistemas fermentativos propostos.



Fonte: Autoria própria.

4.2 Processos de Higienização

Para as higienizações de componentes e do reator em si, optou-se por compostos clorados de fácil acesso, sendo estes o hipoclorito de sódio (água sanitária) e Dicloro-S-Triazinetrione Clorin®), ambos com concentração de 200 ppm. Tais agentes químicos foram escolhidos uma vez que possuem características de solução ideal para higienização definida por Nogueira *et al*.(2015).

4.2.1 Higienização dos componentes do reator

Inicialmente foi feita a lavagem das peças do reator e, dependendo do modelo, da bomba com esponja e detergente neutro. As peças (mangueiras, conexões, e componentes no geral) foram submersas em solução aquosa de hipoclorito de sódio a 200 ppm por 24 horas.

4.2.2 Higienização da carcaça do reator

O ensaio foi realizado em triplicata, com solução sanitizante de hipoclorito de sódio 200 ppm. Foram retiradas amostras com *swab* estéril da área previamente demarcada de 25 cm^2 da carcaça, a fim de se verificar o nível de contaminação na superfície interna do reator que permaneceu em contato com a solução clorada a 200 ppm por 15 min. A amostragem foi realizada em ambiente limpo e estéril com o auxílio de chama, em três momentos distintos: uma após a primeira etapa da higienização, outra logo após a formação do *headspace* e, a última, 24 h após a geração do *headspace*. Os *swabs* foram inseridos em 9,9 mL em água destilada estéril e alíquotas de 0,1 mL foram plaqueadas (em triplicata) em placas de Petri contendo meio *Plate Count Agar* (PCA), para contagem de mesófilos totais, sendo incubadas a 30 °C por 48 h e, na sequência, foram contadas as unidades formadoras de colônia e feito o cálculo para determinação da concentração de UFC/mL.

4.2.3 Análise da solução clorada residual

As soluções sanitizantes cloradas residuais, com a qual pretendia-se dissolver o meio de cultivo, foram analisadas, antes da inoculação, em relação à contaminação por bolores e leveduras, sendo realizada a contagem de UFC em meio Potato Dextrose Agar (PDA), e bactérias Gram negativas, sendo feita a

contagem de UFC em meio ágar Macconkey, ambos sem diluição. Os resultados foram expressos em UFC/mL de solução.

O teor de cloro da água foi medido inicialmente com um kit Genco e, nos ensaios finais, de acordo com Andriola *et al.* (2019), por análise colorimétrica, utilizando reação com iodo e um espectrofotômetro.

4.3 Acompanhamento das fermentações

4.3.1 Preparo de inóculo

Para as fermentações, o microrganismo escolhido foi o *Bacillus thuringiensis* (Bt) devido à maior disponibilidade de materiais e estudos relacionados. A inserção do inóculo no reator foi avaliada visando respeitar os padrões de encaixe de conexão e de modo que ele seja prático para o produtor e minimize contaminações.

A cepa de *Bacillus thuringiensis* (Bt) utilizada foi isolada a partir de produtos da empresa de bioinsumos AGRINOR Fertilizantes, sendo conservadas em *slants* de ágar nutriente recobertos por vaselina líquida sob refrigeração (5 °C) e mantidos no laboratório de microbiologia do Instituto Federal de São Paulo – Campus Avaré, até o momento de uso.

O pré-inóculo de Bt foi cultivado em placa de Petri contendo meio sólido à base de agar nutriente, proposto pela Embrapa (Monnerat *et al.*, 2020) e foram incubados por 48h a 28 °C.

O inóculo de cada fermentação foi preparado com a mesma técnica, foram adicionados 14 discos, de 15 mm de diâmetro, do pré-inóculo para cada 250 mL de meio líquido. Então, foi conduzido incubação em agitador orbital a 200 rpm e 28 °C. Os meios de cultivo utilizados foram o Embrapa Líquido, meio com farelo de soja, descrito por Vidotto, ou o meio descrito por Xavier *et al.* (2022), os quais serão descritos no item seguinte. O tempo de incubação foi 24 ou 48 h, dependendo do ensaio.

4.3.2 Preparo do meio de cultivo estéril concentrado

Os meios de cultivo utilizados foram sendo aprimorados ao longo do processo de desenho do reator, de acordo com as necessidades e descobertas de

cada fermentação. Inicialmente foi utilizado como meio de cultivo o meio Embrapa Líquido, proposto por Monnerat *et al*. (2022) que possui em sua formulação 1g/L extrato de levedura, 1 g/L de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), 10 g/L de caldo nutriente, 10 mL/L sais minerais (0,2 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,04 g/L de $MnSO_4$, 0,0058 g/L de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,0075 g/L de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 3,0 g/L de KCl, 0,00135 g/L de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,03 g/L $CoCl2 \cdot 6H_2O$) com pH ajustado para 7,0.

O meio a base de farelo de soja utilizado no segundo modelo de reator foi composto de 10 g/L de melaço de cana, 20 g/L de farelo de soja, 0,1 g/L de fosfato monobásico, 0,2 g/L de fosfato dibásico e 3,3 mL/L de antiespumante (AGRINOR). O pH foi ajustado para 7,0.

O terceiro meio de cultivo utilizado foi o meio desenvolvido por Xavier *et al*. (2022) tendo em sua formulação 15g/L de melaço; 10g/L de extrato de levedura; 1,5g/L de fosfato monobásico; 1,5g/L de fosfato dibásico, sendo acrescentado 2 mL/L de antiespumante (AGRINOR). O pH foi ajustado para 7,0 e o meio de cultivo foi autoclavado (121°C por 15 minutos).

4.3.3 Acompanhamento das fermentações

As fermentações foram amostradas através um registro acoplado na parte inferior da carcaça do reator, previamente higienizado com álcool 70 % e próximo a chama de uma lamparina.

As amostras foram retiradas nos tempos 0, 24, 48 e 72 h de fermentação, em volume aproximado de 15 mL, utilizando frascos estéreis, sendo submetidas às análises microbiológicas (contagem de microrganismos esporulados, contagem de bolores e leveduras e de bactérias Gram-negativas), pH (utilizando papel indicador) e microscopia óptica sob coloração de Gram e de esporos.

4.4. Metodologias analíticas

4.4.1 Contagem de Bolores e leveduras e bactérias Gram-negativas

A contagem de contaminação foi realizada de acordo com o proposto por Monnerat *et al*. (2020), com modificações. Foram semeados 100 µL da diluição decimais seriadas desejada em 3 placas de Petri contendo meio ágar MacConkey (MC) para bactérias Gram-negativas e *Potato Dextrose Agar* (PDA), para bolores e

leveduras. As placas foram mantidas em estufa a 30 °C por 24h 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.

4.4.2 Contagem de bactérias esporuladas

A contagem de esporos bacterianos foi realizada de acordo com o proposto por Monnerat *et al*. (2020), com modificações, sendo que uma alíquota de 1,5 mL da amostra, sem diluição, foi transferida para um tubo eppendorf e submetido à choque térmico em banho maria a 80 ºC por 12 min seguido de banho de gelo por 5 min, a fim de eliminar células vegetativas e manter apenas os esporos viáveis. Em seguida, foram feitas diluições decimais seriadas da amostra, em tubos contendo água destilada. Foram semeados 100 µL da diluição desejada em 3 placas de Petri contendo meio EMBRAPA sólido (0,1% extrato de levedura, 0,1 % KH_2PO_4, 2 % de ágar nutritivo, 10 mL/L de solução de sais composta por 1% de $CaCO_3$, 1 % de $MgSO_4.7H_2O$, 0,1 % de $FeSO_4.7H_2O$, 0,1 % de $MnSO_4.7H2O$ e 0,1 % de $ZnSO_4.7H_2O$). As placas foram mantidas em estufa a 28 °C por 24h 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.

$$UFC/mL = \frac{número\ médio\ de\ colônias\ nas\ placas \times fator\ de\ diluição}{volume\ de\ amostra\ semeado\ (mL)} \qquad \text{eq. (1)}$$

4.4.3 Coloração de Gram

Primeiramente foi feito um esfregaço da amostra em lâmina para microscopia limpa. O esfregaço foi fixado utilizando um bico de Bunsen e, após o resfriamento das lâminas, foi feita a coloração. Primeiramente as lâminas foram recobertas por 1 min como solução de cristal violeta (1%), sendo este removido por lavagem com água corrente. Na sequência, as lâminas foram recobertas por 1 min com solução de lugol fraco (0,3%). Após a remoção do lugol com água corrente, foi feita a lavagem das lâminas com solução alcoólica de acetona (30%). Por fim, as lâminas foram recobertas por 30 segundos com solução de fucsina fenicada e novamente lavadas em água corrente. Após secas naturalmente, foram levadas ao microscópio óptico para observação.

4.4.4 Coloração de esporos de bactérias e cristais de *Bacillus thuringiensis*

A coloração de esporos foi realizada conforme descrito por Ammons; Rampersad (2002), sendo utilizada solução 0,13% de azul de Coomassie® em ácido acético 50% para cobrir as lâminas, já fixadas, por um minuto. Na sequência, o corante foi removido com água corrente e após secas naturalmente, foram levadas ao microscópio óptico para observação. Nesta coloração os esporos ficam pouco corados enquanto as células vegetativas e os cristais de proteína Cry ficam com coloração azul intensa.

5 RESULTADOS

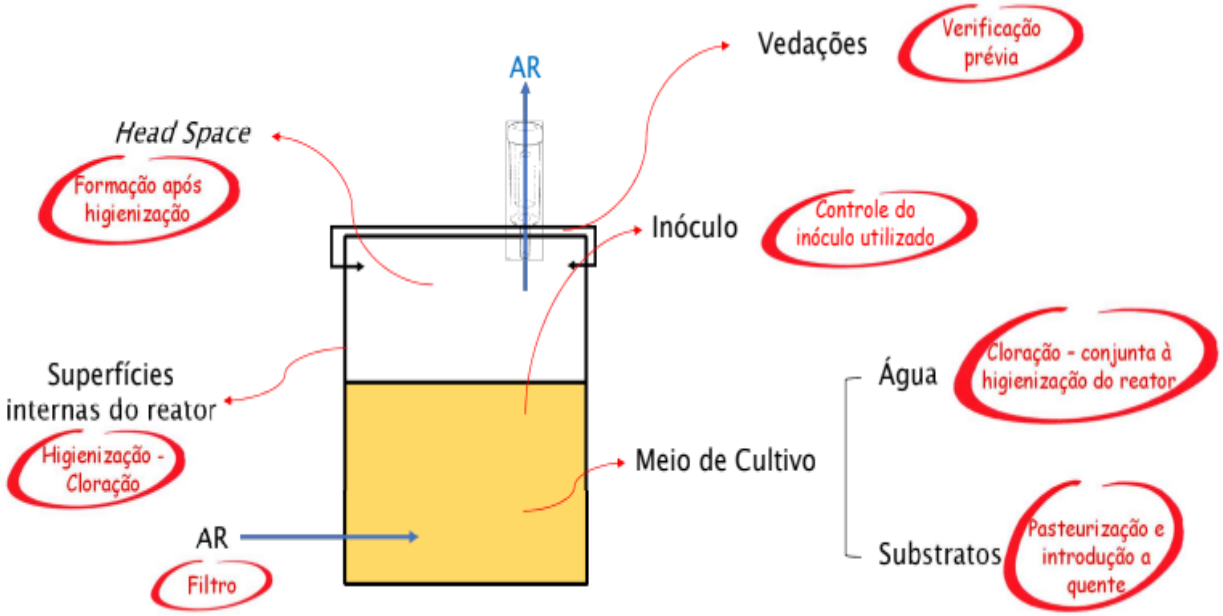
5.1 Identificação de pontos de contaminação das fermentações

A partir de um modelo genérico básico de reator observado na literatura (Stunbury; Whitaker; Hall, 1995; Schmidell *et al*., 2001) foi elaborado um mapa mental para identificação dos possíveis pontos originários de contaminações nas fermentações, incluindo ambiente, procedimentos e processos, os quais podem ser observados nas figuras 9 e 10.

Figura 9. Pontos críticos para evitar contaminações e elevar a eficiência de processos fermentativos: uma visão geral do processo.

Fonte: Elaborado por Marcela Pavan Bagagli

Figura 10. Pontos críticos para evitar contaminações e elevar a eficiência de processos fermentativos: visão detalhada do reator (fermentador). Indicações em vermelho apontam pelo menos um cuidado para evitar que o ponto acarrete contaminações.



Fonte: Elaborado por Marcela Pavan Bagagli e Vinícius Augusto Moreiro Ribeiro.

5.2 Propostas de reatores e procedimentos operacionais

5.2.1. Avaliação da higienização da carcaça dos reatores

Inicialmente foi realizada a lavagem da carcaça interna e externa, do reator e da bomba utilizando esponja e detergente neutro. Na sequência, foi retirada uma amostra (T1) para realizar a análise da contaminação da superfície interna inicial do reator.

As demais peças (mangueiras, conexões, e componentes no geral) foram submersas em solução aquosa de hipoclorito de sódio a 200 ppm por 24 h.

Na sequência houve a montagem do reator e o mesmo foi completamente preenchido com solução aquosa de hipoclorito de sódio a 200 ppm, sendo fechado e em seguida foi realizado um teste hidráulico para verificar sua vedação. Com o reator vedado e completamente preenchido com a solução sanitizante. Após 15 minutos, houve o início do processo de formação do espaço livre superior

(*headspace)*, sendo aberto a torneira inferior para o escoamento de parte da água de sanitização. Durante o processo, permitiu-se a entrada de ar filtrado no reator. Na sequência, foi retirada a amostra do tempo de 15 min (T2) e outra após 24 h (T3) o processo em funcionamento.

A quantificação média dos microrganismos (UFC/mL) detectados na carcaça do reator podem ser observados na tabela 3, sendo o ensaio realizado em triplicata.

Tabela 3. Médias obtidas da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) em meio PCA após 48 horas após a incubação.

Amostra (tempo)	**Réplica 1**	**Réplica 2**	**Réplica 3**
	UFC/mL média		
T1 (antes da higienização)	100	1300	667
T2 (após 15 min de higienização e formação do *headspace*)	67	200	233
T3 (após 24 h de processo)	400	0	67

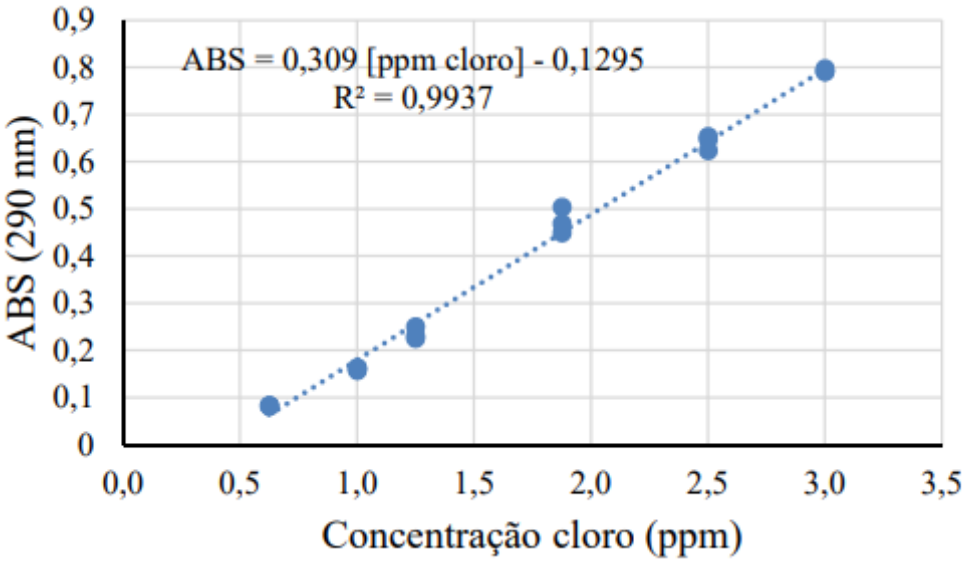
Observando os resultados obtidos é possível notar que houve uma redução significativa na contagem de unidades formadoras de colônia nas amostras T2 e T3 em todos os testes, exceto no primeiro teste que, apesar do T1 ter apresentado redução, o T3 possivelmente foi contaminado durante o manejo com a amostra, o que explicaria o aumento de 4 vezes a contaminação em comparação com o T1.

5.3.2 Avaliação da descontaminação da água de preparo do meio de cultivo

A água de sanitização residual, utilizada para o preparo dos meios de cultivo dentro do reator, foi analisada antes de todas as fermentações em todos os modelos de reatores. Não foi possível observar o crescimento microbiano em nenhum dos testes e em nenhum dos meios avaliados (PDA, MacConkey e PCA), portanto a água residual estava livre de contaminantes no início de cada fermentação.

Quanto à presença de cloro do hipoclorito de sódio. A figura 11 apresenta a curva analítica (curva padrão) para as análises de quantificação de cloro por colorimetria, que foi utilizada nos ensaios finais do trabalho, substituindo o kit Genco.

Figura 11. Curva padrão para quantificação do teor de cloro em amostras de água construída com hipoclorito de sódio, absorbância por concentração.



Os resultados obtidos da absorbância da água foram expressos na tabela 4.

Tabela 4. Concentração de cloro livre obtida na água de torneira e 24 e 48 h após a cloração da água a 200 ppm.

Amostra (Tempo em h)	**ABS média (290 nm)**	**Concentração média de Cloro livre (ppm)**
Água da Torneira	0,155	0,90
24	0,679	209,3
48	0,637	198,4

Ou seja, foi possível observar que mesmo após 48 horas com o aeração da água clorada, a concentração de cloro se manteve em 200 ppm na água residual, utilizada para o preparo dos meios de cultivo.

5.2.3 Avaliação do cultivo de *Bacillus thuringiensis* nos sistemas propostos

5.2.3.1 Construção e cultivo de Bt no modelo 1 - Enzo

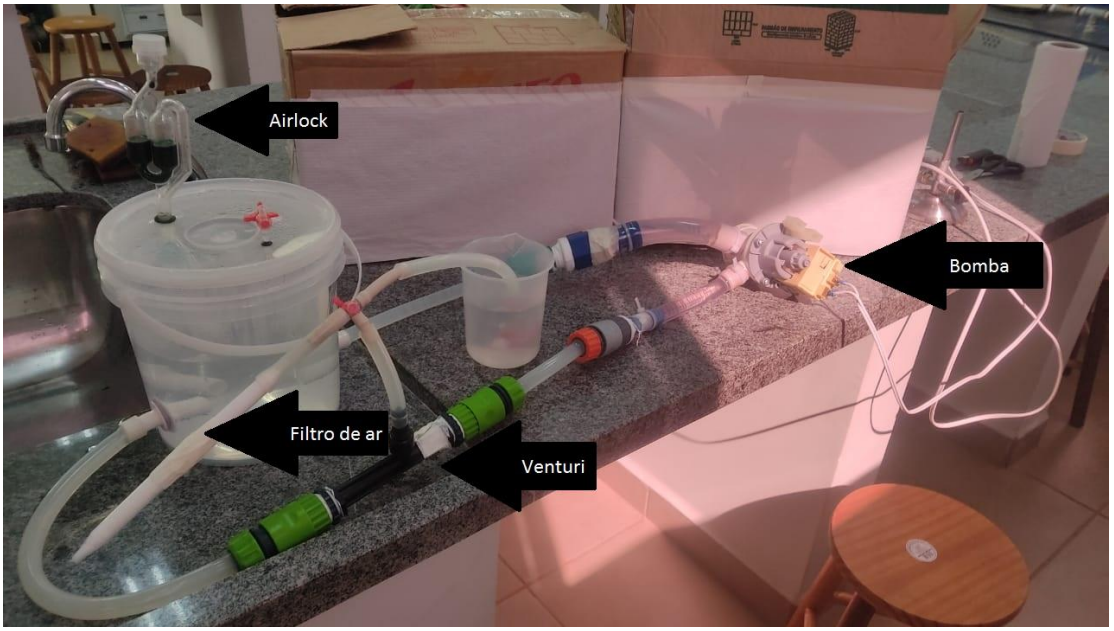
O primeiro reator (modelo 1), foi montado em um balde plástico, de grau alimentício, com volume útil de 3 L e volume de trabalho de 2,4 L. Foram feitas 3 aberturas (com 1,5 cm de diâmetro) equidistantes na parte inferior ao redor das paredes, onde foram encaixadas 3 torneiras plásticas.

Os furos foram feitos o mais baixo possível, sendo que dois deles foram colineares, e um deles 1 cm acima dos demais. As 2 torneiras encaixadas de forma colinear foram cortadas mantendo apenas a estrutura onde foram encaixados 2 tubos de silicone (1 cm de diâmetro interno), sendo que a parte da mangueira mais baixa serviu para a entrada dos fluidos no recipiente, sendo conectada a um tubo de Venturi (½ polegada). Na zona de baixa pressão do tubo Venturi (estreitamento) foi conectado um tubo de silicone (0,5 cm de diâmetro) e neste, uma válvula de 3 vias, a qual foi utilizada para realizar a sucção de meio líquido e para a entrada de ar filtrado no reator. A outra extremidade do tubo Venturi foi conectada por meio de tubos a uma bomba d 'água de máquina de lavar, ligada à torneira de saída do biorreator, fechando o sistema de circulação do fluido.

Para dar praticidade à montagem e armazenamento do biorreator os tubos foram ligados com conectores rápidos de mangueiras de jardinagem, formando 4 peças principais, o biorreator com as mangueiras externas, a bomba, um tubo que liga a bomba ao Venturi e o Venturi com a válvula de 3 vias.

Na tampa do biorreator foram feitos dois buracos colineares, sendo um deles para encaixar uma válvula de 3 vias e outro para encaixar um *airlock*. O modelo final do reator pode ser observado na figura 12. A válvula na tampa foi conectada internamente a um tubo flexível para facilitar a coleta de amostras. Foi demarcada com fita adesiva uma área de 18 cm^2 para coleta de amostra da contaminação da carcaça interna do reator na área do *headspace*.

Figura 12. Montagem do reator modelo 1 (Enzo)



Fonte: Autoria própria

Nesta construção foi observada a ausência de padrão nos encaixes das mangueiras com a bomba, tornando necessário o uso de muitas adaptações (conexões) que podem se tornar pontos de contaminação. O uso do *airlock* também não se mostrou muito prático uma vez que dependendo da intensidade da aeração, a solução alcoólica acabava por evaporar rapidamente, gerando um ponto de atenção.

Foi preparado 50 mL de inóculo em meio Embrapa Líquido proposto por Monnerat *et al*. (2020), o mesmo foi incubado por 48 h em agitador orbital a 200 rpm e 28°C. O meio utilizado para a fermentação também foi o meio Embrapa líquido, porém este foi concentrado, sendo diluído em 400 mL de água e não em 2,4 L. Este meio foi pasteurizado (Ebulição por 5 minutos) e inserido, ainda quente, no reator pelo sistema Venturi. Após homogeneização, foi inserido o inóculo da mesma maneira, próximo à chama de uma lamparina. Ao término das inserções, o tubo utilizado foi mergulhado e mantido em álcool 70 %.

Foram retiradas amostras com 0 h e 72 h de fermentação, os resultados podem ser observados na tabela 5.

Tabela 5. Quantificação média de unidades formadoras de colônias (UFC) por mililitro (ml) nos tempos 0 e 72 h de fermentação no modelo de reator 1 (Enzo).

Tempo (h)	PDA	MacConkey	Embrapa Sólido
	UFC/mL média		
0	7.10^3	$1,1.10^4$	$5,5.10^6$
72	5.10^3	$> 3.10^6$	$6,4.10^6$

Foi possível observar crescimento de contaminantes Gram-negativos superior à concentração de microrganismo de interesse após 72 h de fermentação, evidenciando um dos problemas das fermentação *on farm*, manter um nível de pureza viável e seguro de microrganismos de interesse.

O método de inserção do inóculo apesar de ser fácil manipulação, apresentou problemas uma vez que houve a entrada de ar não filtrado durante a sucção dos componentes. O ponto de coleta de amostra acabou gerando uma zona morta o que poderia influenciar nos resultados, portanto foi reduzido a quantidade de amostras da fermentação a ser retiradas.

Não foi possível observar a presença das proteínas de interesse, nem características típicas do *Bt* na microscopia óptica, indicando o insucesso do processo. Assim, um outro modelo foi avaliado.

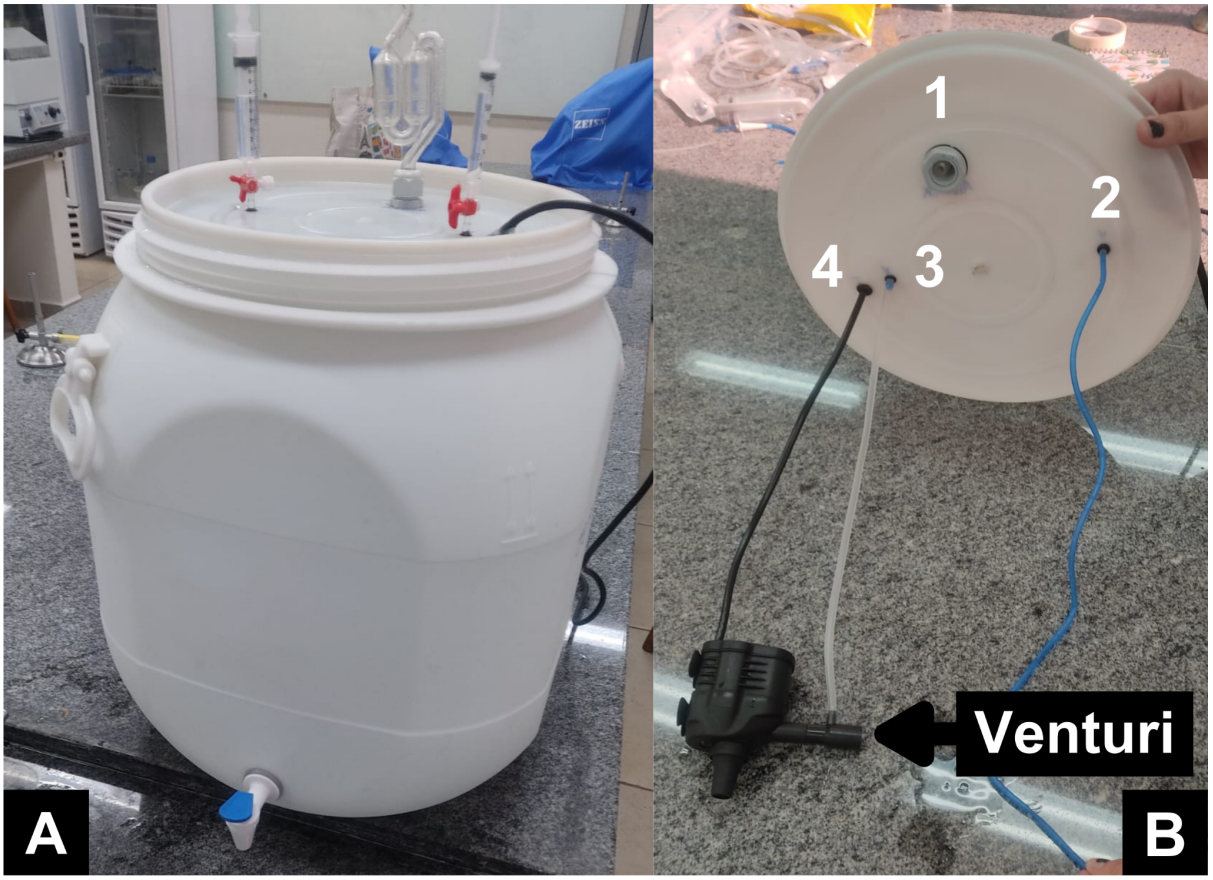
5.2.3.2 Construção e cultivo de Bt no modelo 2 - Jessana

Levando em conta os resultados obtidos com a fermentação e manipulação do modelo 1, foi elaborado um novo protótipo, visando reduzir a superfície de tubulações externas e padronizar os encaixes de itens acessórios. Para tanto a bomba foi alterada sendo substituída por uma submersa (de aquário) com vazão de 1.000 L/min. Levando em conta o alto volume demandado em fermentações *on farm* houve a alteração da carcaça por uma maior, sendo esta nova com volume máximo de 50 litros, e 30 litros de volume de trabalho.

Como o Venturi já é acoplado na bomba de aquário, foi necessário apenas adaptar a tampa e carcaça, sendo que na carcaça foi feito apenas o furo para encaixar a torneira destinada à descarga de produto fermentado.

Na tampa foram feitos 4 furos, sendo os furos 1 e 2 destinados para o *airlock* e para a coleta de amostra, ambos iguais aos furos da tampa do primeiro reator. O furo 3 foi destinado a passagem do cabo de energia da bomba e o furo 4 para conectar a válvula de 3 vias que seria ligada ao Venturi, ambas as conexões também utilizavam *o-ring* para evitar vazamentos, e este foi acoplado ao filtro de ar de algodão esterilizado. O modelo 2 e sua tampa podem ser observados na figura 13. Para evitar vazamentos na tampa foi aplicado silicone em gel.

Figura 13. Montagem do reator modelo 2 (Jessana), (a) vista lateral; (b) vista inferior da tampa (1) *airlock*; (2) coletor de amostras; (3) entrada de ar, meio de cultivo e inóculo pelo Venturi; (4) cabo de energia da bomba.



Fonte: Autoria própria

Foi realizada a higienização do reator seguindo o método elaborado no item 4.2, com hipoclorito de sódio. Pensando na realidade do agricultor e reduções de custo, o meio de cultura foi alterado, sendo utilizado o meio a base de farelo de soja, conforme descrito no item 4.3.2. O volume de meio de cultura concentrado utilizado foi 500 mL e o mesmo foi pasteurizado da mesma forma que a fermentação anterior (modelo de reator 1).

Foi utilizado 700 mL de inóculo, que foi produzido no mesmo meio de cultura e incubado por 48 h em agitador orbital a 200 rpm e 28 °C. A contagem do microrganismo de interesse no inóculo também foi realizada utilizando a metodologia descrita por Monnerat *et al.* (2020).

Foram retiradas amostras da água clorada residual, do inóculo e após 10 minutos, 24 e 48 h de fermentação. Os resultados dessa fermentação podem ser observados nas tabelas 6, 7 e 8.

Tabela 6. Quantificação média de contaminantes da água clorada residual e do inóculo para a fermentação realizada no reator 2 (Jessana).

Amostra	**PDA**	**MacConkey**	**Embrapa Sólido**
	UFC/mL média		
Água clorada residual	0	0	-
Inóculo	-	-	$5,4.10^{8}$

Tabela 7. Quantificação média de microrganismos esporulados durante os tempos de fermentação no modelo de reator 2 (Jessana).

Tempo (h)	PDA	MacConkey	Embrapa sólido
	UFC/mL média		
0	80	0	$< 1 . 10^{2}$
24	$4 . 10^{5}$	$9,9 . 10^{5}$	$< 1 . 10^{4}$
48	$3 . 10^{5}$	$1,6 . 10^{6}$	$< 1 . 10^{4}$

Tabela 8. Teor de sólidos solúveis (°Brix) e pH durante os tempos de fermentação no modelo de reator 2 (Jessana).

Tempo (h)	Teor de sólidos solúveis (°Brix)	pH
0	1,0	6,0
24	1,0	6,0
48	1,0	6,0

Não foi possível observar um crescimento significativo de Bt mas foi observada alta presença de contaminantes.

Nesta fermentação foram identificados quatro problemas críticos: o farelo de soja utilizado no meio de cultura não se solubilizou, o que acabou por entupir os tubos de equipo, e impossibilitando que houvesse a passagem de todo o farelo. A tampa e as peças com *o-ring* se mostraram pouco eficientes para vedação, em especial o cabo da bomba submersa, o que gerou espaço para a entrada de contaminantes. A forma de retirar a amostra se mostrou pouco prática, o que pode ter afetado significativamente a qualidade das amostras retiradas e, por fim, o volume de trabalho se mostrou muito elevado para ensaios em escala laboratorial.

Somado aos problemas, houve também a necessidade de alterar o método de coleta de amostra, uma vez que o método atual gerava pontos mortos que

influenciam na amostra e pontos de risco para a entrada de ar não filtrado durante a coleta. Esse ponto e volume do reator foram alterados no modelo seguinte.

5.2.3.3 Construção e cultivo de Bt no modelo 3 - Ace

A carcaça do reator 3 apresentou dois furos na lateral onde foram acoplados dois registros, sendo um deles utilizado como nova fonte para coletar a amostra. Em sua tampa foram feitos 3 furos, sendo um destinado ao *airlock*, um ao cabo de energia da bomba submersa e outro às conexões do Venturi. A bomba de aquário utilizada foi a mesma do reator anterior.

Desta vez o cabo de energia e o Venturi foram presos com o uso de um prensa cabos e veda rosca, substituindo os *o-rings*. Enquanto as conexões para o Venturi foram padronizadas com válvulas e uniões de engate rápido para tubos tipo DMFIT. Desta forma houve padronização nas peças e melhoria nas vedações dos componentes. Outro ponto importante foi a troca do filtro de ar de algodão por um filtro estéril de seringa com 0,22 µm e 30 mm de diâmetro externo.

O volume útil do reator foi de 10 L, sendo 7 L utilizados como volume de trabalho. O reator apresentou uma falha grave de vedação na tampa e, para minimizar este defeito, foi utilizado papel plástico e fita adesiva. A aparência final do reator pode ser observada na figura 14.

Figura 14. Montagem do reator modelo 3 (Ace).

Fonte: Autoria própria

As amostras foram coletadas diretamente da torneira, próximo à chama de uma lamparina, em um frasco previamente esterilizado. Após a coleta, a torneira foi lavada com álcool 70%.

O ponto principal desta fermentação foi testar a utilização dos novos componentes de vedação e principalmente um outro método de inserção do inóculo e meio de cultura. Ainda, foi alterado o meio de cultivo, para evitar as dificuldades encontradas no reator anterior.

Foi realizada a higienização do reator seguindo o método descrito no item 4.2, com hipoclorito de sódio. O meio de cultivo utilizado nesta fermentação foi o descrito por Xavier *et al*. (2022), que utilizava melaço e extrato de levedura completamente solubilizados em água. O meio de cultivo preparado para suprir a concentração de 7 L, foi preparado concentrado, sendo diluído em 1,5 L de água destilada. Após diluição, desta vez, o meio foi autoclavado (121ºC, 1 atm por 15 min).

Foram utilizados 140 mL de inóculo, que foi produzido no mesmo meio de cultura e incubado por 48 h em agitador orbital a 200 rpm e 28 °C. A contagem do microrganismo de interesse no inóculo também foi realizada utilizando a metodologia descrita por Monnerat *et al*. (2020).

Para inserir o inóculo e o meio de cultura concentrado, ambos foram misturados em capela de fluxo laminar estéril, em um saco coletor de urina estéril (figura 15) e, posteriormente, foi inserido pela estrutura conectada ao Venturi. Tal método pode ser observado na figura 16.

Figura 15. Ilustração da bolsa coletora estéril com o meio concentrado e inóculo após preparo em cabine de fluxo laminar.

Fonte: Autoria própria

Figura 16. Inserção do meio de cultura concentrado e inóculo com o uso de saco coletor estéril.

Fonte: Autoria própria

Foram retiradas amostras da água clorada residual e dos tempos 0, 24, 48 e 72 h de fermentação. Foi feito, também, uma análise microscópica do tempo 72 h com coloração para esporos e Gram. Os resultados dessa fermentação podem ser observados na Tabela 9 e 10 e na figura 17.

Tabela 9. Quantificação média de contaminantes da água clorada residual e do inóculo para a fermentação realizada no reator 3 (Ace).

Amostra	PDA	MacConkey	Embrapa Sólido
	UFC/mL média		
Água clorada residual	0	0	-
Inóculo	-	-	$< 1 . 10^{6}$

Tabela 10. Quantificação média de microrganismos esporulados durante os tempos de fermentação no modelo de reator 3 (Ace).

Tempo (h)	PDA	MacConkey	Embrapa sólido
	UFC/mL média		
0	0	0	-
24	$> 3 . 10^{5}$	$> 3 . 10^{5}$	$5 . 10^{5}$
48	$3 . 10^{5}$	$< 1 . 10^{4}$	$< 1 . 10^{5}$
72	$< 1 . 10^{4}$	$2,5 . 10^{7}$	$1 . 10^{3}$

A concentração de Bt no inóculo se mostrou inferior aos resultados anteriores, não sendo desejável concentrações inferiores a 10^{8} UFC/mL.

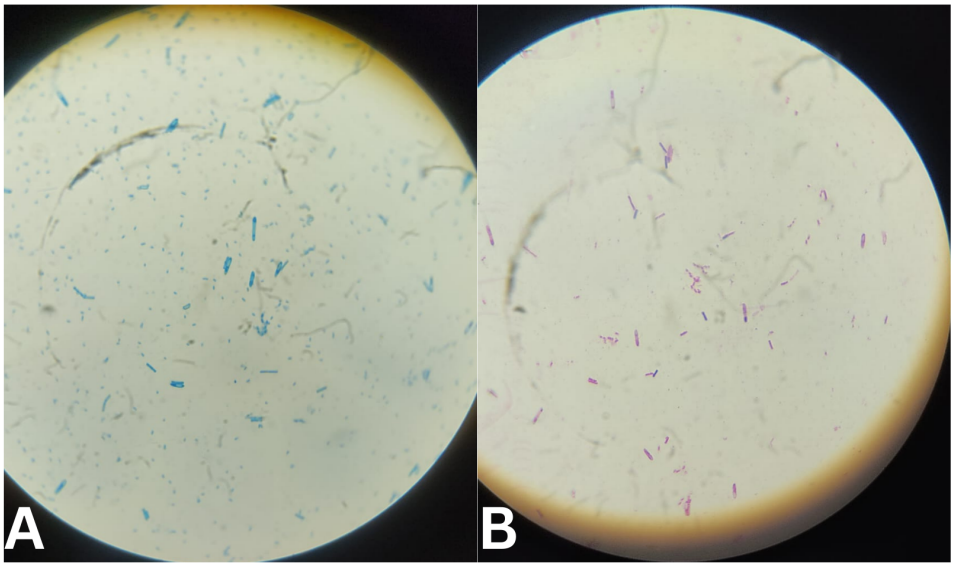
Foi possível observar uma queda na concentração do Bt e elevada presença de contaminantes ao longo dos tempos de fermentação, evidenciando novamente a importância da vedação em uma fermentação *on farm* e como a presença de contaminantes pode acabar inibindo o crescimento do microrganismos de interesse.

O método de inserção e meio de cultura se mostraram muito prático, porém a manipulação do saco na inserção dos meios ainda apresentou falhas e pontos de melhoria. O uso do Venturi para inserir o meio não apresentou a agilidade esperada, as conexões se mostraram eficientes na vedação e manipulação, porém a estrutura

para o Venturi utilizou muitas peças que possuíam muitos pontos mortos, o que pode contribuir para uma eventual contaminação.

Nesta fermentação não houve a adição de antiespumante, o que resultou no meio espumando, chegando a entrar em contato com a solução do *airlock*, mas não houve vazamentos do meio para fora do reator, porém isso também potencializou a contaminação presente na fermentação.

Figura 17. Lâmina de esporos (A) e coloração de Gram (B) após 72 h de fermentação no modelo de reator 3 (Ace).



Fonte: Autoria própria

É possível observar a presença de células bacterianas rosa (Gram-negativas) na lâmina de coloração de Gram, bem como a ausência de proteínas de interesse e microrganismos com características típicas de Bt.

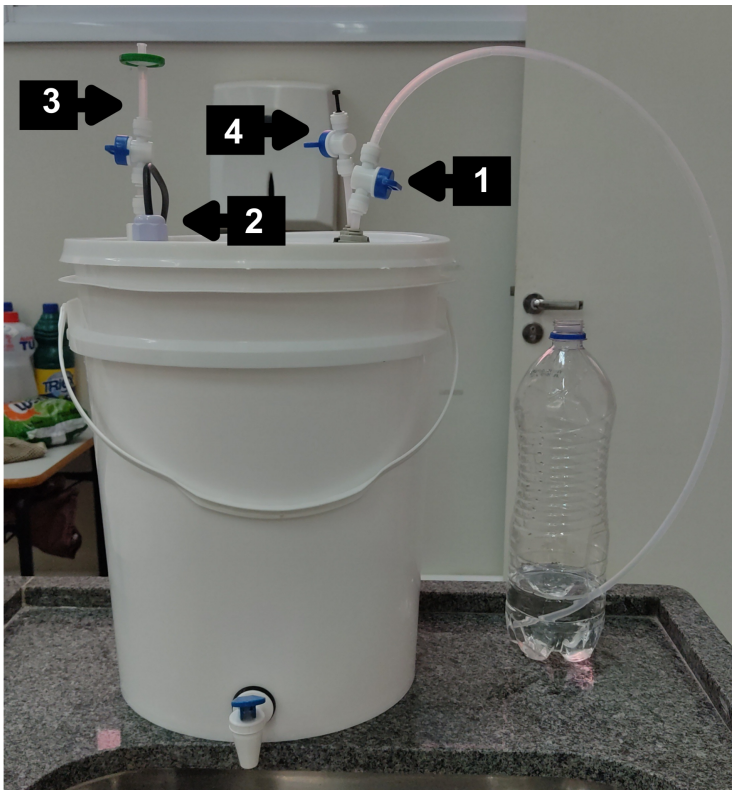
5.2.3.4 Construção e cultivo de Bt no modelo 4 - Sra. Barrica

Baseado nos resultados anteriores foi elaborado um novo reator, agora construído em balde de PEAD grau alimentício, com volume total de 20 L, tendo 14 L de volume de trabalho. Foi utilizada a bomba de aquário submersa dos modelos anteriores.

A principal alteração neste modelo foi a substituição da forma de inserção do meio de cultura, que deixou de ser pelo Venturi. Para tanto, a carcaça se manteve com um único furo para o registro de coleta de amostra e descarga do produto

fermentado, enquanto a tampa apresentou 4 furos. O furo 1 foi destinado para a união de engate rápido, que se encaixou em um tubo DMFIT de ¼” que seguia para um recipiente com água sanitária, desta forma substituindo o uso do *airlock* para uma saída de gases mais prática e segura para evitar escape de meio fermentado para o ambiente. O furo 2 foi destinado ao cabo de energia da bomba, porém foi utilizado um modelo menor de prensa cabos, a fim de aprimorar a vedação do cabo, que continuou sendo um ponto de atenção no reator anterior. O furo 3 conectou a entrada do Venturi da bomba através de uma união de engate rápido a um registro de engate rápido, que por fim se conectou ao filtro estéril de 0,22 µm. O furo 4 foi destinado a uma união de engate rápido conectado a uma válvula de engate rápido, tal furo foi destinado para inserir o meio de cultura e inóculo. A transferência destes passou a ser por gravidade, visto que o Venturi não apresentou vantagem significativa nos testes anteriores, além de minimizar espaços mortos que poderiam abrigar contaminação. O modelo final do reator pode ser observado na figura 18.

Figura 18. Montagem do reator modelo 4 (Sra. Barrica) sendo (1) saída de ar; (2) cabo de energia da bomba; (3) entrada de ar com o filtro; (4) ponto de inserção de meio de cultivo e inóculo.



Fonte: Autoria própria

Este modelo de reator apresentou uma grande evolução em relação ao construtivo, com menos “gambiarras”, sendo mais fácil de replicar e operar, tendo todas as peças padronizadas, compatíveis de fácil higienização e vedação.

Foi realizada a higienização do reator seguindo o método elaborado no item 4.2, com o Dicloro-S-Triazinetrione. Também foi realizado o ensaio de quantificação de cloro na água residual, sendo observado os resultados na tabela 4.

O meio de cultivo utilizado nesta fermentação foi o meio desenvolvido por Xavier *et al.* (2022), sendo adicionado 2 mL/L de antiespumante (AGRINOR). O meio de cultivo preparado para suprir a concentração de 14 L, foi preparado concentrado, sendo diluído em 1 L de água destilada, sendo autoclavado (121°C, 1 atm por 15 minutos).

Foram preparados 500 mL de inóculo, utilizando o meio Embrapa líquido desenvolvido por Monnerat *et al.* (2020), o inóculo foi incubado em agitador orbital a 200 rpm e 28 °C por 48 h. O método de inserção utilizado foi similar ao do modelo 3, porém o saco foi substituído por garrafas estéreis (de alimentação parenteral) e o inóculo não foi misturado ao meio de cultivo (figura 19).

Figura 19. Meio concentrado e inóculo em garrafas estéreis.

Fonte: Autoria própria

As garrafas, então, foram acopladas no reator com o auxílio de um equipo estéril, desta forma evitando vazamentos. Tal operação também foi feita próximo à chama e com o manipulador utilizando touca, máscara, avental e luvas, para evitar a

presença de contaminantes (figura 20). O meio de cultura concentrado foi inserido e, após 10 min, o microrganismo foi inoculado. Desta forma o cloro residual reagiria primeiro com o meio concentrado e teria um impacto menor no microrganismo de interesse.

Figura 20. Adaptação do método de inserção de meio de cultura concentrado e inóculo utilizando garrafas estéreis de alimentação parenteral.

Fonte: Autoria própria

Foram retiradas amostras da água residual, inóculo (antes de se misturar com o meio concentrado) e amostras nos tempos 10 minutos, 24, 48, 72 e 144 h após a inoculação. Os resultados dessa fermentação podem ser observados nas tabelas 11, 12 e 13.

Tabela 11. Quantificação média de contaminantes da água clorada residual e do inóculo para a fermentação realizada no reator 4 (Sra. Barrica).

Amostra	PDA	MacConkey	Embrapa Sólido
	UFC/mL média		
Água clorada residual	0	0	-
Inóculo	-	-	$1,6 \cdot 10^{7}$

Tabela 12. Quantificação média de microrganismos esporulados durante os tempos de fermentação no modelo de reator 4 (Sra. Barrica).

Tempo (h)	PDA	MacConkey	Embrapa Sólido
	UFC/mL média		
0	0	63	$5,2 \cdot 10^{5}$
24	$2,6 \cdot 10^{5}$	$8,3 \cdot 10^{5}$	$8,3 \cdot 10^{5}$
48	$1 \cdot 10^{4}$	$5,1 \cdot 10^{6}$	$5,6 \cdot 10^{5}$
72	$< 1 \cdot 10^{4}$	$< 1 \cdot 10^{4}$	$6,6 \cdot 10^{5}$
144	$1 \cdot 10^{7}$	$< 1 \cdot 10^{4}$	$< 1 \cdot 10^{4}$

Tabela 13. Teor de sólidos solúveis (°Brix) e pH durante os tempos de fermentação no modelo de reator 4 (Sra. Barrica).

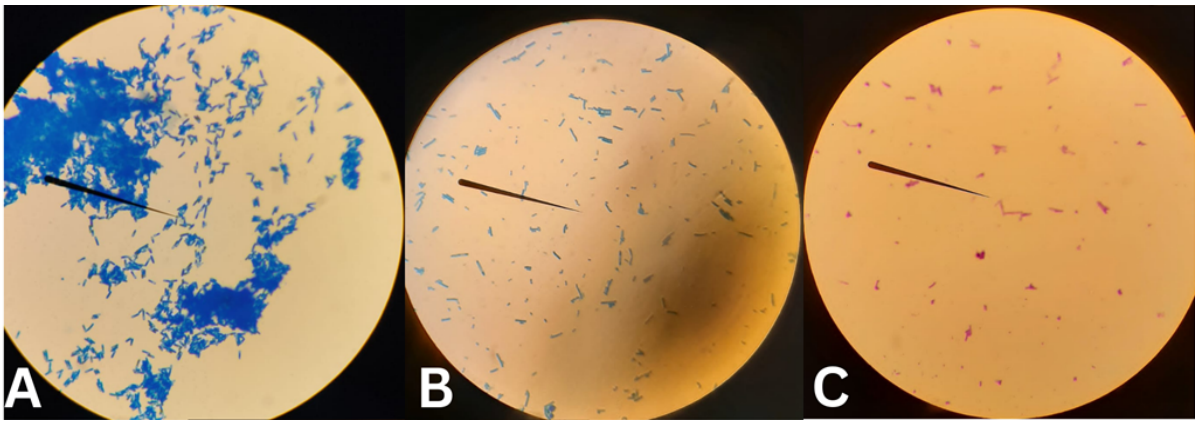
Tempo (h)	Teor de sólidos solúveis (°Brix)	pH
0	2,8	6,0
24	2,4	5,5
48	2,6	5,5
72	2,8	4,0

Esta fermentação apresentou um pH abaixo do esperado de início o que pode ter impactado no crescimento do Bt, o qual necessita de pHs entre 6,0 e 7,0 para iniciar a fermentação, assim como uma flutuação baixa do teor de sólidos solúveis (°Brix).

Novamente é possível observar que não houve um crescimento significativo de Bt e houve um crescimento elevado de contaminação nos tempos de fermentação. Outro ponto observado foi a dificuldade de contabilizar a diluição necessária, uma vez que o crescimento de contaminantes foi muito rápido, e houve a estagnação do crescimento de Bt.

Foram feitas lâminas do inóculo e do tempo 48 h, que seria o ideal para o término de uma fermentação *on farm*, as quais podem ser observadas na figura 21.

Figura 21. Microscopia óptica das amostras. (A) coloração de esporos do inóculo; (B) coloração de esporos e (C) coloração de Gram após 48 h de fermentação no modelo de reator 4 (Sra. Barrica).



Fonte: Autoria própria

Foi possível observar que o inóculo possuía células vegetativas típicas de Bt, bem como esporos, embora ainda em menor quantidade, o que é desejável para o inóculo, uma vez que os microrganismos devem estar em sua fase de crescimento exponencial para serem inoculados (Schmidell *et al*. 2001)

A amostra retirada após 48 h de fermentação apresentou estruturas celulares muito parecidas, porém na lâmina de coloração de Gram foi possível observar estruturas diferentes, com coloração rosada, evidenciando a contaminação presente

nas contagens deste mesmo tempo. Além de não ser possível observar a presença de *Bt* esporulado ou a presença de cristais.

5.2.3.5 Construção e cultivo de Bt no modelo 5 - Rei Artor

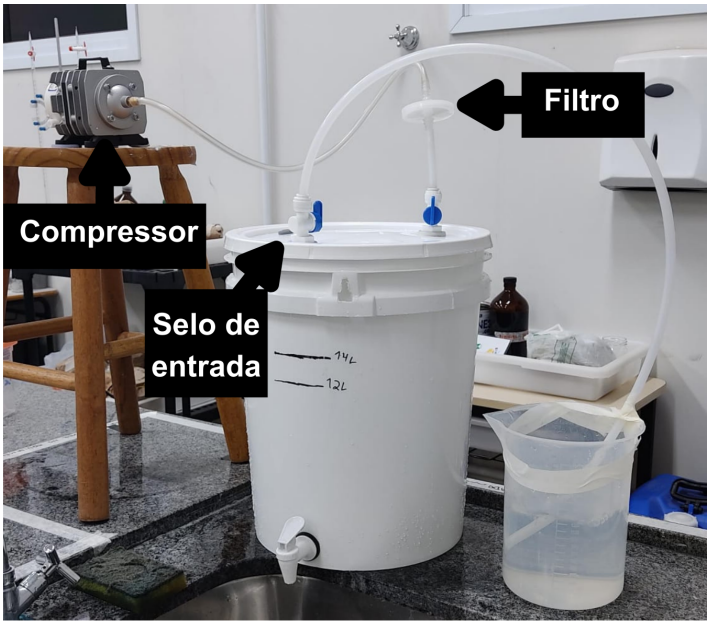
Utilizando a mesma carcaça do reator anterior, foi preparado uma nova tampa, onde a bomba interna submersa foi substituída por um compressor externo (tipo de aquário; 40 L/min), sendo também modificado o método de inserção de meio de cultivo e inóculo, visando reduzir a quantidade de pontos de vedação da tampa.

A nova tampa apresentou 3 furos, o furo 1 foi destinado a união de engate rápido que se encaixa em um tubo DMFIT que seguiu para um recipiente com água sanitária, semelhante ao anterior, porém desta vez o diâmetro da conexão DMFI e do tubo nela conectado foi alterado para ⅜” facilitando a saída de ar. O furo 2 foi destinado para a entrada de ar vinda do compressor e passando por um filtro estéril de 0,22 µm e 55 mm de diâmetro externo, valor este 1,5 vezes superior ao do modelo anterior, a fim de facilitar a aeração, e sendo conectado internamente a um tubo difusor de bolhas (de aquário) conforme ilustra a figura 22. O furo 3 foi destinado a uma tampa de borracha, do tipo garrafa de penicilina, sendo utilizado para o novo método de inserção. O modelo final do reator pode ser observado na figura 23.

Figura 22. Tubo difusor de bolhas alocado ao fundo do reator.

Fonte: Autoria própria

Figura 23. Modelo de reator 5 (Rei Artor).



Fonte: Autoria própria

Este modelo de reator apresentou a construção mais simples entre todos os modelos avaliados, apresentando também uma operação muito simplificada. Tem como ponto fraco o tubo difusor, que acaba sendo um ponto que pode acumular contaminação devido a sua característica porosa, se não for realizado um boa higienização, sendo necessário que haja sua troca frequente. Outro diferencial desse modelo foi o aumento significativo de aeração do meio, a qual não foi quantificada mas qualitativamente observada pela formação de bolhas no interior do reator.

Foi realizada a higienização do reator seguindo o método elaborado no item 4.2, com o Dicloro-S-Triazinetrione. Uma solução de 6g de Tiossulfato de Sódio, irradiado com UV por 15 min em câmara de fluxo laminar, em 20 ml de água destilada estéril, foi preparada para realizar a neutralização do cloro residual da água de limpeza do equipamento, uma vez que no ensaio realizado para o Modelo 4, observou-se que a concentração do mesmo ainda estava muito elevada, retardando ou dificultando o crescimento do Bt. Após a inserção do tiossulfato de sódio, foi medido o nível de cloro por colorimetria (item 5.2.3), não sendo observada a presença de cloro residual.

O meio de cultivo utilizado nesta fermentação foi o meio desenvolvido por Xavier *et al.* (2022), sendo adicionado 2 mL/L de antiespumante (AGRINOR). O meio de cultivo preparado para suprir a concentração de 14 L, foi preparado concentrado, sendo diluído em 1 L de água destilada, sendo autoclavado (121°C, 1 atm por 15 minutos). Foi preparado 750 ml de inóculo, utilizando o meio Embrapa líquido desenvolvido por Monnerat *et al.* (2020), o inóculo foi incubado em agitador orbital a 200 rpm e 28°C por 15 h. A redução no tempo de incubação foi uma tentativa de obter um inóculo de Bt em sua fase de crescimento exponencial.

O método de inserção foi simplificado, o selo foi removido e foi adicionada a solução de tiossulfato de sódio, e, após 3 min, foi inserido o meio concentrado, ambos inseridos com ajuda de um funil estéril. Após a inserção, o furo foi selado novamente. Após 10 min, o microrganismo foi inserido de forma similar com ajuda de um segundo funil (figura 24) e ao término o furo foi selado novamente. Toda a operação foi feita com duas fontes de chama cercando a abertura (figura 25).

Figura 24. Inserção do inóculo pelo furo com auxílio de um funil estéril no modelo de reator 5 (Rei Artor).

Fonte: Autoria própria

Figura 25. Estrutura de chama próximo a manipulação do modelo de reator 5 (Rei Artor).

Fonte: Autoria própria

Foram retiradas amostras da água clorada residual e amostras dos tempos 10 min, 24 e 48 h após a inoculação. Os resultados dessa fermentação podem ser observados nas Tabelas 14, 15 e 16.

Tabela 14. Quantificação média de contaminantes da água clorada residual e do inóculo para a fermentação realizada no reator 5 (Rei Artor).

Amostra	PDA	MacConkey	Embrapa Sólido
	UFC/mL média		
Água clorada residual	0	0	-
Inóculo	-	-	$1,5 \cdot 10^{8}$

Tabela 15. Quantificação média de microrganismos esporulados durante os tempos de fermentação no modelo de reator 5 (Rei Artor).

Tempo (h)	PDA	MacConkey	Embrapa Sólido
	UFC/mL média		
0	0	0	$4 . 10^{5}$
24	$<1 . 10^{2}$	$< 1 . 10^{2}$	$9,5 . 10^{6}$
48	0	$< 1 . 10^{3}$	$6,6 . 10^{6}$

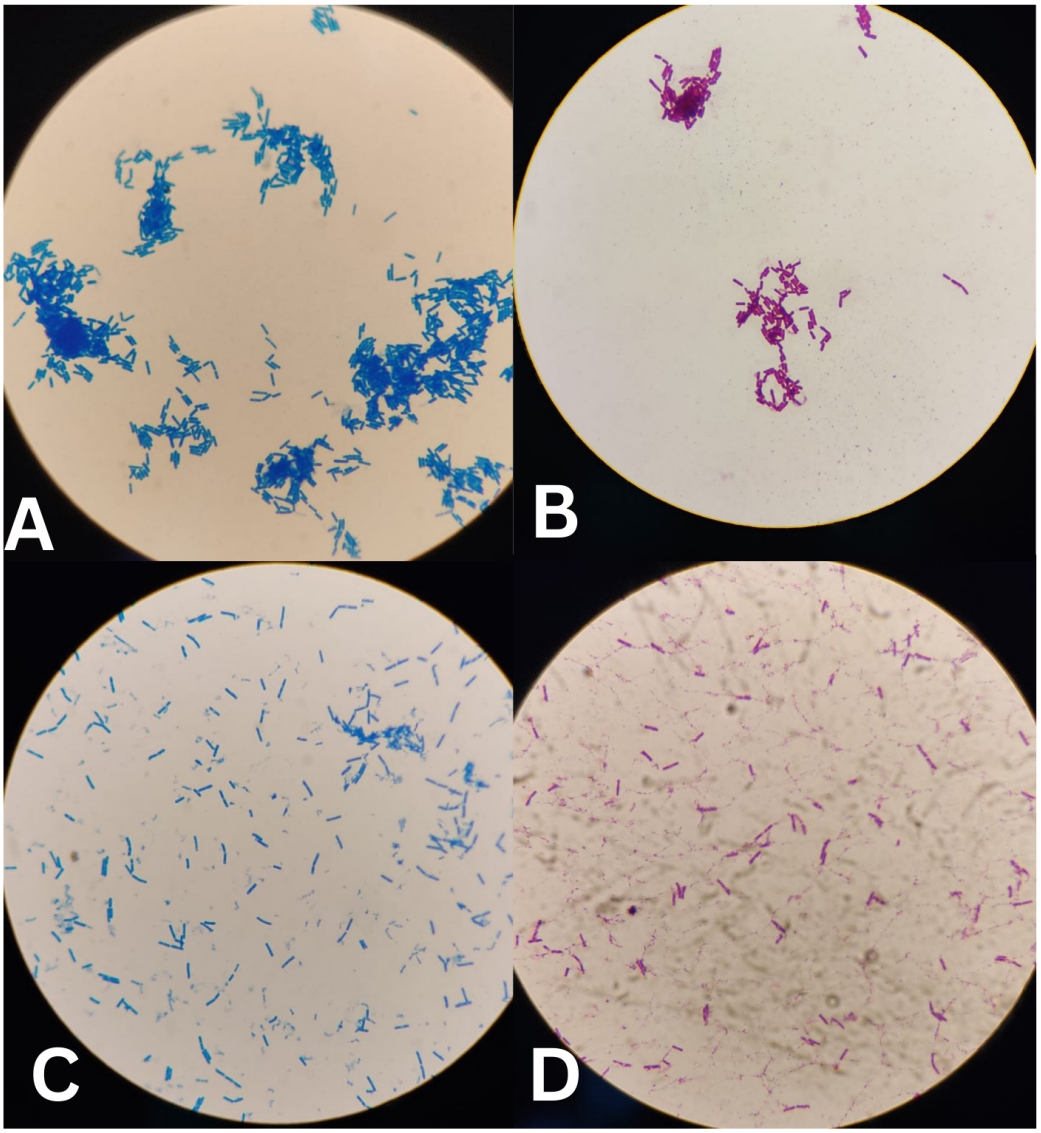
Tabela 16. Teor de sólidos solúveis (°Brix) e pH durante os tempos de fermentação no modelo de reator 5 (Rei Artor).

Tempo (h)	Teor de sólidos solúveis (°Brix)	pH
0	2,9	6,0
24	2,8	6,0
48	2,2	6,0

Nesta fermentação foi possível atingir até 48 h de fermentação com a presença reduzida de contaminantes, porém a concentração do Bt aumentou apenas 24 vezes. O comportamento do teor de sólidos solúveis indicou que houve consumo de açúcares, porém ainda pequeno, o pH se manteve estável em 6,0, provavelmente devido à adição de tiossulfato que acaba acidificando o meio, e o inóculo se mostrou de alta pureza e com concentração satisfatória de inóculo.

O inóculo e todos os tempos de fermentação amostrados foram observados ao microscópio óptico, utilizando tanto de coloração de Gram quanto de esporos, as imagens podem ser observadas na figura 26.

Figura 26. Microscopia óptica das amostras. (A) coloração de esporos do inóculo; (B) coloração de Gram do inóculo; (C) coloração de esporos e (D) coloração de Gram após 48 h de fermentação no modelo de reator 5 (Rei Artor).



Fonte: Autoria própria

Comparando as lâminas do inóculo com as lâminas do tempo 48 h de fermentação, é possível observar homogeneidade nas estruturas observadas, ou seja o microrganismo de interesse estava presente e foi possível observar apenas o crescimento de microrganismos Gram-positivos nas lâminas com coloração de Gram, o que reforça os dados obtidos nas contagens (baixa contaminação e presença de Bt). No entanto, poucos esporos e cristais de Bt foram observados, indicando que é preciso estimular a esporulação.

*5.2.3.6 Cultivo de Bt no modelo 5 (*Rei Artor*) com modificações operacionais*

Como o modelo 5 (Rei Artor) apresentou resultados interessantes e positivos quanto à presença de contaminantes e do microrganismo de interesse, foi realizada uma nova fermentação, sendo apenas reduzido pela metade a quantidade de tiossulfato utilizado na neutralização do cloro, que desta vez foi de 3 g, e aumentando os tempos de contagem da fermentação e alterado o meio do inóculo para o meio Xavier *et al.* (2022). Após a inserção do tiossulfato de sódio, foi medido o nível de cloro com a metodologia descrita no item 5.3.2, sendo que não foi possível observar a presença de cloro residual. Os resultados obtidos podem ser observados nas tabelas 17, 18 e 19.

Tabela 17. Quantificação média de contaminantes da água clorada residual e do inóculo para a segunda fermentação realizada no reator 5 (Rei Artor).

Amostra	**PDA**	**MacConkey**	**Embrapa Sólido**
	UFC/mL média		
Água clorada residual	0	0	-
Inóculo	-	-	$1,4 \cdot 10^{8}$

Tabela 18. Quantificação média de microrganismos esporulados durante os tempos de fermentação para a segunda fermentação realizada no modelo de reator 5 (Rei Artor).

Tempo (h)	PDA	MacConkey	Embrapa Sólido
	UFC/mL média		
0	0	0	$3 . 10^{3}$
24	0	$2,1 . 10^{5}$	$< 1 . 10^{4}$
48	0	$6,3 . 10^{5}$	$1,1 . 10^{4}$
72	0	$8,7 . 10^{5}$	$9,4 . 10^{4}$

Tabela 19. Teor de sólidos solúveis (°Brix) e pH durante os tempos da segunda fermentação no modelo de reator 5 (Rei Artor).

Amostra	Teor de sólidos solúveis (°Brix)	pH
10	2,9	6,0
24	2,8	6,0
48	2,2	6,0

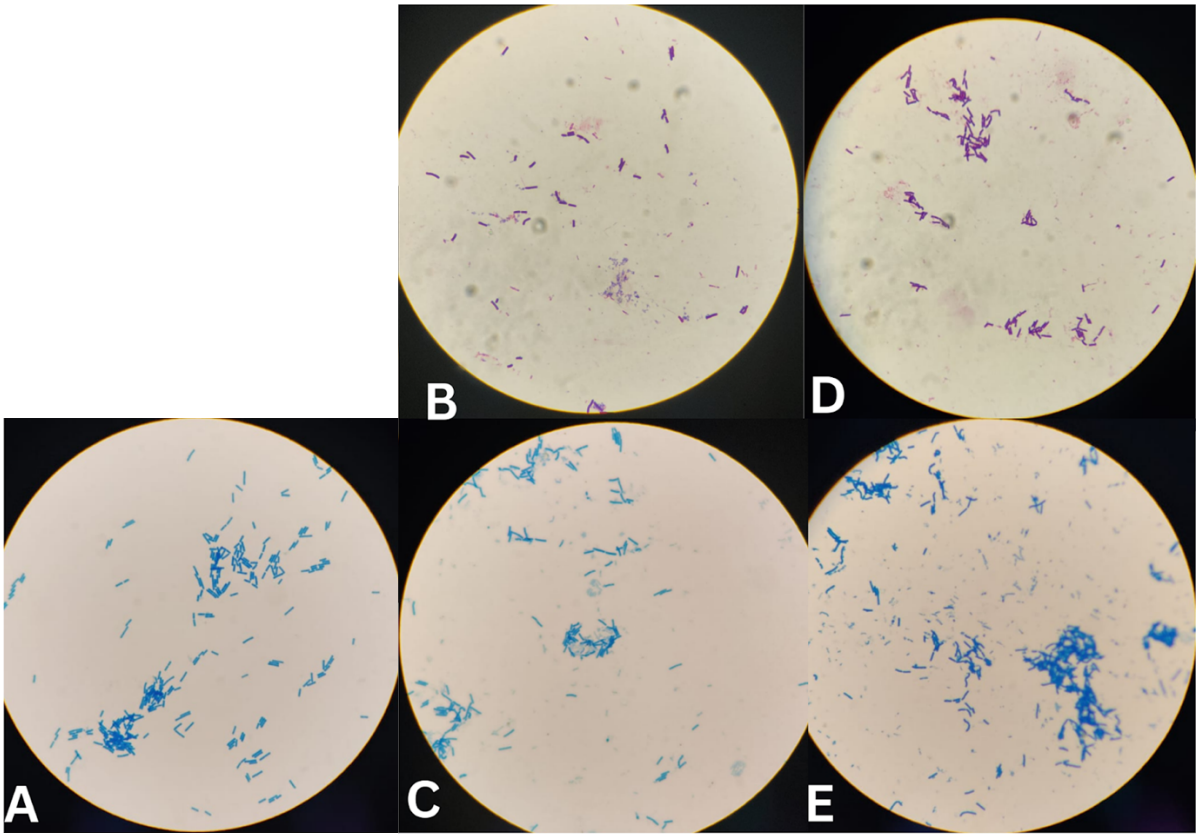
As condições iniciais seguiram o mesmo padrão de todas as fermentações, sem a presença de contaminantes e um inóculo adequado, porém, foi possível observar um resultado bem diferente da fermentação anterior, a concentração de *Bt* se manteve estável enquanto a contagem de contaminação passou a concentração do microrganismo de interesse em apenas 24 h e, também, estagnou nessa concentração.

A principal hipótese levantada para tal resultado é a de que houve entrada de contaminação durante a inoculação, o que demonstraria a fragilidade de uma produção desse tipo, onde qualquer presença de microrganismo contaminante pode alterar significativamente uma fermentação.

Os dados obtidos de sólidos solúveis reforçam que houve consumo dos açúcares do meio, o pH se manteve novamente em 6,0 indicando que é necessário ser feito mais estudos acerca desse impacto sobre a fermentação, uma vez que o padrão para Bt seria o pH diminuir inicialmente para valores próximos a 5,0 e depois, no fim da fase exponencial, subir para 7,0.

O inóculo e todos os tempos de fermentação amostrados foram observados ao microscópio óptico, utilizando tanto de coloração de Gram quanto de esporos, as imagens podem ser observadas na figura 27.

Figura 27. Microscopia óptica das amostras. (A) coloração de esporos do inóculo; (B) coloração de Gram e (C) coloração de esporos para o tempo de 48 h de fermentação; (D) coloração de Gram e (E) coloração de esporos após 72 h de fermentação no modelo de reator 5 (Rei Artor), na segunda fermentação.



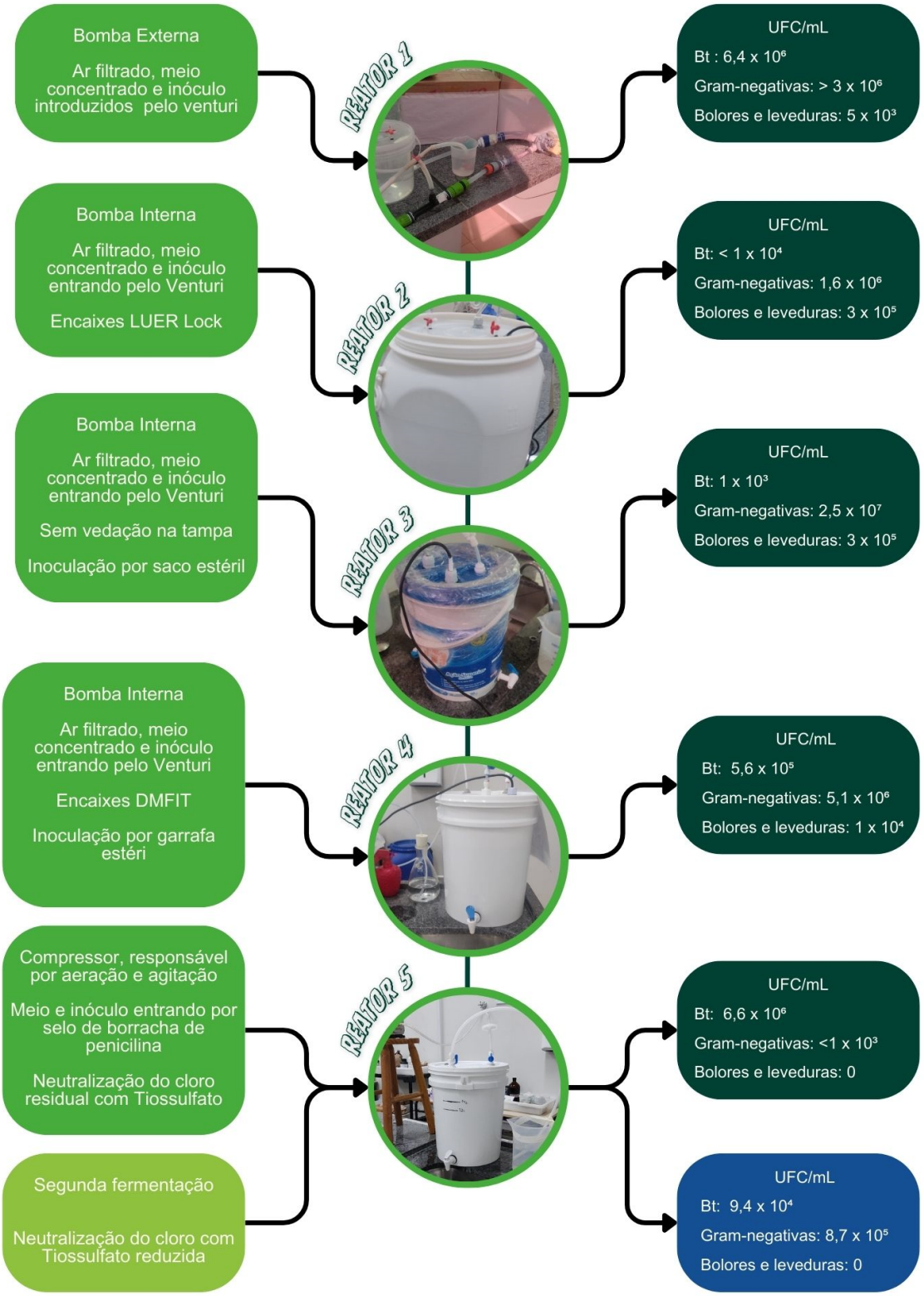
Fonte: Autoria própria

Observando os resultados da microscopia óptica, foi possível observar que há presença de Bt, assim como estruturas de microrganismos contaminantes. Novamente, a esporulação foi baixa e raros cristais foram observados.

5.2.4 Resumo visual dos resultados obtidos no cultivo de *Bacillus thuringiensis* nos sistemas propostos

A figura 28 apresenta os resultados obtidos nos modelos de 1 a 5 compilados em um fluxograma com as características principais de cada modelo e os resultados obtidos.

Figura 28. Fluxograma dos resultados obtidos em cada etapa do desenvolvimento do reator para cultivo de Bt *on farm* por fermentação submersa para pequenos produtores.



Fonte: Autoria própria.

6 CONCLUSÃO

No total foram construídos 5 modelos de reatores, todos passaram por um processo de higienização química e fermentação onde pontos de melhoria foram levantados e soluções foram trabalhadas. O modelo 5, juntamente com o método de operação proposto, apresentou melhores resultados, oferecendo baixa presença de contaminantes, mostrando que é possível obter uma pureza significativa de microrganismos em uma fermentação *on farm* de baixo custo, porém evidenciou o fato de que, mesmo com um bom modelo de reator, seus procedimentos são de fundamental importância, podendo alterar o resultado de uma fermentação. Por fim, o trabalho indica que são necessários mais testes e melhorias para que haja um aumento significativo na concentração de microrganismos, especialmente trabalhando a fase de esporulação do Bt, que pode ser atingida intensificando a aeração, a disponibilidade de glicose no meio e outros sais indutores.

Apesar de uma produção *on farm* não possuir a mesma tecnologia de um produto comercial, com o uso de boas práticas e protocolos padronizados é possível se obter uma produção mais eficiente e segura do que alguns modelos que têm sido propostos e comercializados para produtores de pequeno e médio porte, que se operam em sistema aberto sem controle de contaminantes.

REFERÊNCIAS

ABRUNHOSA, Leticia Santos; **Avaliação da contaminação de meios de cultura utilizados para produção "*on farm*" de bioinseticida**. Trabalho de Conclusão de Curso (graduação em farmácia da Faculdade de Ciências da Saúde) - Universidade de Brasília faculdade de ciências da saúde curso de ciências farmacêuticas, 2019. 40 p.

ANDRIOLA, C.P.; RAMOS, R. O.; LOPES, W.S.; ARAÚJO, M.C.U. Validação de método alternativo para determinação de cloro residual livre. *In:* 4º Congresso nacional de pesquisa e ensino em ciências, CONAPESC, **Anais [...]** do 4º CONAPESC, Campina Grande - PB, 2019.

ALTIERI, Miguel A. **Agroecologia: a dinâmica produtiva da agricultura sustentável**. 1 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 1998.

Associação Brasileira das Empresas de Controle Biológico (ABCBIO). **Quais são os riscos de fazer uma produção *on farm* de biopesticidas e bioestimulantes?** Disponível em:https://www.abcbio.org.br/blog/on-farm/. Acesso em: 15 set. 2022.

BONIOLO, Fabrízio Siqueira; *et al.;* Oxygen supply in *Bacillus thuringiensis* fermentations: bringing new insights on their impact on sporulation and δ-endotoxin production. **Appl Microbiol Biotechnol**., v.94, p. 625- 636, 2012.

Brasil. Decreto nº 10.375, de 26 de maio de 2020. Institui o Programa Nacional de Bioinsumos e o Conselho Estratégico do Programa Nacional de Bioinsumos. **Diário Oficial da União**: Seção 1, Brasília, DF, 2020, Página 105.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **INSTRUÇÃO NORMATIVA CONJUNTA Nº 2, DE 29 DE AGOSTO DE 2018.** ISSN 1677-7042. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-

agricolas/agrotoxicos/produtos-fitossanitarios/6.INCSDA.SMCN2DE29DEAGOSTODE2018.pdf. Acesso em: 22 setembro. 2023.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **O Brasil deve ser destaque mundial no uso de bioinsumos nos próximos anos**. Brasília, DF, 2021. Disponível em:https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/brasil-deve-ser-destaque-mundial-no-uso-de-bioinsumos-nos-proximos-anos. Acesso em: 11 jan. 2022.

Brasil. Ministério da Saúde. **Anvisa divulga número de produtos de base biológica aprovados em 2022 para uso na agricultura**. Em comparação ao ano de 2021, houve um aumento de 70% de produtos avaliados. [Brasília]: Ministério da Saúde, 12 jan. 2023. Disponível em: https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2023/anvisa-divulga-numero-de-produtos-de-base-biologica-aprovados-em-2022-para-uso-na-agricultura. Acesso em: 22 setembro. 2023.

BRAVO, Alejandra.; GILL, Sarjeet. S.; SOBERON, Mario. *Bacillus thuringiensis* mechanisms and use. *In:* BRAVO, Alejandra.; GILL, Sarjeet. S.; SOBERON, Mario. **Insect Control**. 1. ed. New York: Elsevier, 2005. cap. 7, p. 247-278.

BRAVO, Alejandra.; LIKITVIVATANAVONG, Supaporn.; GILL, Sarjeet S.; SOBERÓN, Mario. *Bacillus thuringiensis: A story of a successful bioinsecticide.* **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, n. 7, p. 423-431, 2011.

BUGNO, Adriana; BUZZO, Adriana Aparecida; PEREIRA, Tatiana Caldas. Avaliação da qualidade microbiológica de produtos saneantes destinados à limpeza. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, [s.l.], v. 39, n. 3, p.335-340, set. 2003.

CropLife Brasil. (26 de Setembro de 2023). **Produtos Biológicos Registrados**. Fonte: Crop Life Brasil: https://croplifebrasil.org/publicacoes/produtos-biologicos-registrados/. Acesso em: 2 de nov. de 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: 06 novembro. 2023.

FARIA, Gabriel; LANDGRAF, Lebna. **Pesquisadores expõem riscos da produção on farm de bioinsumos e defendem modernização da legislação.** Embrapa notícias, produção vegetal, 18 de maio de 2022. Disponível em: https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/70837683/pesquisadores-expoem-riscos-da-producao-on-farm-de-bioinsumos-e-defendem-modernizacao-da-legislacao. Acesso em: 2 de nov. de 2023.

FARINAS, Cristiane Sanchez; BUZON, Rosangela Donizete Perpetua; FONSECA, Rafael Frederico; BERTUCCI, Victor Neto; **Desenvolvimento em fermentação em estado sólido para produção de enzimas de interesse agroindustrial**; Embrapa publicações, 2014. Disponível em: https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1031069/desenvolvimentos-em-fermentacao-em-estado-solido-para-producao-de-enzimas-de-interesse-agroindustrial. Acesso em: 2 de nov. de 2023.

FERNANDES, Thábata Alvares; *et al*. **Potencial Multifuncional de Isolados de Bacillus thuringiensis para Controle de Fungos Fitopatogênicos e Promoção de Crescimento Vegetal**. Minas Gerais: Embrapa Milho e Sorgo, 2019. 31 p. (Boletim de pesquisa e desenvolvimento, n. 198)

HOLKER, Udo; JURGEN, Lenz. Solid-state fermentation - are there any biotechnological advantages?. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 301-306, 2005.

KUMAR, Pradeep; *et al*. *Bacillus thuringiensis* as microbial biopesticide: uses and application for sustainable agriculture. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**. v. 31, n. 95, p. 7, 2021.

LANA, Ubiraci Gomes Paula. *et al*. **Avaliação da Qualidade de Biopesticidas à Base de *Bacillus thuringiensis* Produzidos em Sistema "*on farm*"**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2019. 23 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Boletim de pesquisa e desenvolvimento,191).

LANA, Ubiraci Gomes Paula. *et al*. **Avaliação da qualidade de inoculantes à base de Bacillus para promoção de crescimento de plantas produzidos em sistema *on farm***. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2022. 27 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Boletim de pesquisa e desenvolvimento,238).

MADIGAN, M. T. *et al*., **Microbiologia de Brock-14ª Edição**. Porto Alegre: Artmed Editora, 2016. 1032 p.

MARRONE, Pamela G; Pesticidal natural products – status and future potential. **Pest Management Science**. v.75, n.9, p. 2325-2340, 2019.

MATOS, Mateus Fernandes; SILVA, Leandro Israel da; **Produção *on farm* de *Bacillus thuringiensis*: uma alternativa para a agricultura sustentável.** Em: Congresso Nacional de Sustentabilidade On-line, v. 4, n. 1, 2023. Anais eletrônicos [...] São Paulo.

MATTEDI, Alessandro; *et al*. Solid-State Fermentation: Applications and Future Perspectives for Biostimulant and Biopesticides Production. **Microorganisms**, v. 11, n. 1408, p. 22, 2023.

MEYER, Mauricio Conrado; *et al*. **Bioinsumos na cultura da soja**.1 ed. Brasília: Embrapa, 2022, 550 P.

MEYER, Sheila T. O uso de cloro na desinfecção de águas, a formação de trihalometanos e os riscos potenciais à saúde pública. **Cad. Saúde Pública**, v. 10, n.1, p. 99– 110, 1994.

MOHAPATRA, Shyam. **Sterilization and Disinfection**. Em: Essentials of Neuroanesthesia. Março de 2017, capítulo 59, p. 929-944.

MICHEREFF, Sami J. **Fundamentos de fitopatologia.** 1 ed. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2001. 150 p.

MONNERAT, Rose. *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 Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2020. 46 p.

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

NOGUEIRA, A. V; SILVA FILHO, G. N. **Microbiologia**. 1º edição. Florianópolis : Biologia/EaD/UFSC. 2015. 2011 p.

PAN, Xiaohong; *et al.* Effect of Bacillus thuringiensis biomass and insecticidal activity by cultivation with vegetable wastes. **Royal society open science**, v. 8, n. 3, p. 2-8, 2021.

PANDEY, Ashok. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2-3, p. 81-84, 2003.

PAULA JÚNIOR, Trazilbo José. de *et al*. **Regulamentação e uso de produtos à base de agentes biológicos para o controle de doenças de plantas e pragas no Brasil**. Informe Agropecuário. Defesa vegetal e sustentabilidade do agronegócio, Belo Horizonte, v.34, n.276, p.50-57, set./out. 2013.

PEREIRA, Samantha Storer Pesani e LACERDA, Rúbia Aparecida e TURRINI, Ruth Natalia Teresa. Desinfecção com hipoclorito de sódio em superfícies ambientais hospitalares na redução de infecção e contaminação. 2014, **Anais [...]** São Paulo: EEUSP, 2014. Disponível em: http://www.ee.usp.br/ensino/monografia/exibe_detalhe_monografia.asp?VarCodMono=588. Acesso em: 18 dez. 2023.

PINTO, T. J. A.; KANEKO,T. M.; OHARA, M. T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2003. 325 p.

ROBERTS, Peter L. Sterilization and decontamination, bioprocess equipment and biological and products. **Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology**. v. 7, n 1, p. 1-17 2009.

PEREIRA, Saihonara. **MONITORAMENTO DA QUALIDADE DE BIOINSUMOS PRODUZIDOS EM SISTEMA ONFARM.** Tese (Mestrado em Biotecnologia) − Universidade Tecnológica Federal do Paraná, UTFPR, 2022.

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, p.429, 2020.

SCHMIDELL, Willibaldo; LIMA, Urgel de Almeida; AQUARONE, Eugênio; BORZANI, Walter; **Biotecnologia industrial Volume 2**. 1º edição. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. 541 p.

SHARPELL, F.; MANOWITZ, M. Preservation of cosmetics. *In*: BLOCK, S., ed. **Disinfection, sterilization and preservation**, Philadelphia: Lea & Febiger, 1991. cap.51, p.887-900.

SOUZA, Jeanette Beber de e DANIEL, Luiz Antonio. **Comparação entre hipoclorito de sódio e ácido peracético na inativação de E. coli, colifagos e C. perfringens em água com elevada concentração de matéria orgânica. Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 10, n. abr./ju 2005, p. 111-117, 2005Tradução . . Disponível em: https://doi.org/10.1590/S1413-41522005000200004. Acesso em: 25 setembro. 2023.

STANBURY, Peter F; WHITAKER, Allan; HALL, Stephen J; **Principles of fermentation technology**. 2º edição. Grã-Bretanha:Butterworth Heinemann,1995. 367 p.

TIETJEN, Linda; CRONIN, W.; MCINTOSH, Noel. Introduction to infection prevention, *In*: **Infection Prevention Guidelines for Family Planning Service Programs**. v. 1, p. 1–12, 1992.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. **Microbiologia.** 12 ed. Porto Alegre: Editora Artmed. 2017. 964 p.

ALTIERI, Miguel A. **Agroecologia: a dinâmica produtiva da agricultura sustentável**. 1 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 1998.

United States Environmental Protection Agency. **EPA: Biopesticides**, c2023. Bioinseticidas. Disponível em: <https://www.epa.gov/pesticides/biopesticides>. Acesso em: 2 de nov. de 2023.

UNZUE, Argine; *et al.* 2022. Multifunctional Properties of a Bacillus thuringiensis Strain (BST-122): Beyond the Parasporal Crystal. **Toxins**, v. 14, n. 11, p. 768, 2022.

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

VALICENTE, Fernando Hercos. *et al*. **Riscos à produção de biopesticida à base de *Bacillus thuringiensis***. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2018. 20 p.

WAITES, Michael J; MORGAN, Neil L; ROCKEY, John S; HIGTON, Gary. **Industrial Microbiology: An Introduction**. 1º edição. Londres:Blackwell Science, 2001. 302 p.

WEISER, J.; KRIEG, A.; HUGER, A. M. **Impact of *Bacillus thuringiensis* on applied entomology in eas-tern Europe and in Soviet Union.** Berlim: Paul Parey, 1986. p. 37-50.

WHITELEY, H. R.; SCHNEPF, H. E. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Microbiology**, v. 40, p. 549-576, 1986.

WILLER, H.;LERNOUD, J. (Eds.). **The world of organic agriculture: statistics and emerging trends 2018**. Frick: FiBL; Bonn: IFOAM – Organics International, 2018.

XAVIER, Ingrid Lorena Pereira; VIDOTTO, Jessica Carolina Dessibio; BAGAGLI, Marcela Pavan. **Avaliação de um meio de cultura alternativo para obtenção de bioinsumos a base de *Bacillus thuringiensis***. *In*: Congresso de Inovação, Ciência e Tecnologia, 13., 2022, São Paulo. Anais eletrônicos [...] São Paulo.