



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Milho e Sorgo  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

**BOLETIM DE PESQUISA  
E DESENVOLVIMENTO  
191**

**Avaliação da Qualidade de Biopesticidas  
à Base de *Bacillus thuringiensis*  
Produzidos em Sistema “on farm”**

Ubiraci Gomes de Paula Lana  
Amanda Naye Guimarães Tavares  
Frederick Mendes Aguiar  
Eliane Aparecida Gomes  
Fernando Hercos Valicente

*Embrapa Milho e Sorgo  
Sete Lagoas, MG  
2019*

**Esta publicação está disponível no endereço:**  
<https://www.embrapa.br/milho-e-sorgo/publicacoes>

**Embrapa Milho e Sorgo**  
Rod. MG 424 Km 45  
Caixa Postal 151  
CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG  
Fone: (31) 3027-1100  
Fax: (31) 3027-1188  
[www.embrapa.br/fale-conosco/sa](http://www.embrapa.br/fale-conosco/sa)

Comitê Local de Publicações  
da Unidade Responsável

Presidente  
*Sidney Netto Parentoni*

Secretário-Executivo  
*Elena Charlotte Landau*

Membros  
*Antonio Claudio da Silva Barros, Cynthia Maria Borges Damasceno, Maria Lúcia Ferreira Simeone, Roberto dos Santos Trindade e Rosângela Lacerda de Castro*

Revisão de texto  
*Antonio Claudio da Silva Barros*

Normalização bibliográfica  
*Rosângela Lacerda de Castro (CRB 6/2749)*

Tratamento das ilustrações  
*Tânia Mara Assunção Barbosa*

Projeto gráfico da coleção  
*Carlos Eduardo Felice Barbeiro*

Editoração eletrônica  
*Tânia Mara Assunção Barbosa*

Foto da capa (montagem)  
Ubiraci Gomes de Paula Lana

**1ª edição**  
*Publicação digitalizada (2019)*

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Nome da unidade catalogadora

---

Avaliação da qualidade de biopesticidas à base de *Bacillus thuringiensis* produzidos em sistema "on farm" / Ubiraci Gomes de Paula Lana ... [et al.]. – Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2019.

21 p. : il. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1679-0154; 191).

1. Contaminação bacteriana. 2. Bactéria. 3. Bioinseticida. 4. Controle biológico. I. Lana, Ubiraci Gomes de Paula. II. Tavares, Amanda Naye Guimarães. III. Aguiar, Frederick Mendes. IV. Gomes, Eliane Aparecida. V. Valicente, Fernando Hercos. IV. Série.

CDD 632.96 (21. ed.)

## Sumário

---

Resumo .....	04
Abstract .....	06
Introdução.....	07
Material e Métodos .....	08
Resultados e Discussão .....	10
Conclusão.....	18
Referências .....	18

## Avaliação da Qualidade de Biopesticidas à Base de *Bacillus thuringiensis* Produzidos em Sistema “on farm”

Ubiraci Gomes de Paula Lana<sup>1</sup>

Amanda Naye Guimarães Tavares<sup>2</sup>

Frederick Mendes Aguiar<sup>3</sup>

Eliane Aparecida Gomes<sup>4</sup>

Fernando Hercos Valicente<sup>5</sup>

**Resumo** – Entre os produtos biológicos registrados para o controle de insetos no Brasil, destacam-se formulações contendo a bactéria *Bacillus thuringiensis*, caracterizada por produzir cristais proteicos com capacidade inseticida específica. Esta bactéria pode ser cultivada em meio sólido, líquido e semissólido, sendo possível sua produção em meios de cultura alternativos, utilizando resíduos da indústria e materiais de baixo custo. Para isso, o laboratório e o sistema de fermentação devem ser esterilizados, e o processo deve ser realizado sob condições controladas, permitindo a produção de bioinseticidas de qualidade que podem ser utilizados por diferentes extratos de produtores rurais. Nos últimos anos, diversos produtores rurais têm fabricado em suas fazendas biopesticidas à base de *B. thuringiensis* para aplicação direta nas lavouras, prática conhecida como produção “on farm” ou “Bt caseiro”. O objetivo deste trabalho foi avaliar as características e o nível de contaminação de biopesticidas à base de *B. thuringiensis* produzidos em sistema “on farm” no Estado de Goiás. Amostras de biopesticidas foram avaliadas quanto às características visuais e plaqueadas em meio de cultura sólido, sendo as colônias analisadas por microscopia de contraste de fase e as espécies identificadas pelo sequenciamento da região 16S rDNA. As amostras de biopesticidas produzidas em sistema “on farm” variaram de

---

<sup>1</sup> Químico, DSc. em Genética com ênfase em Biotecnologia, Genômica e Bioinformática, Embrapa Milho e Sorgo.

<sup>2</sup> Bolsista DTI C (CNPq) na Embrapa Milho e Sorgo.

<sup>3</sup> Eng.-Agrôn., Fitossanidade, DSc. em Fitopatologia, bolsista de pós-doutorado e colaborador do Laboratório de Controle Biológico do Núcleo de Biologia Aplicada da Embrapa Milho e Sorgo

<sup>4</sup> Bióloga, Dsc. em Genética e Melhoramento, pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo.

<sup>5</sup> Eng.-Agrôn., DSc. em Entomologia/Genética Molecular, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo.

coloração levemente parda e transparente contendo material insolúvel no fundo, até amostras de coloração marrom escura e turva, indicando ausência de qualquer tipo de controle e padronização na fabricação dos bioprodutos. O plaqueamento das amostras em meio de cultura sólido mostrou a presença de vários tipos de colônias com diferentes tamanhos, a maioria sem qualquer semelhança com a morfologia das colônias de *B. thuringiensis*, indicando a presença de microrganismos contaminantes. Quase todas as colônias analisadas (97,5%) não foram identificadas como *B. thuringiensis*, indicando que os contaminantes foram mais agressivos no crescimento nas condições de cultivo utilizadas pelos produtores rurais. As espécies *Enterococcus faecium* e *E. faecalis* foram as mais prevalentes e têm sido frequentemente relatadas como resistentes a múltiplos antibióticos e causadoras de infecções como bacteremia, septicemia, infecções do trato urinário, infecções de feridas, meningites e endocardites em humanos. Assim, as amostras de biopesticida à base de *B. thuringiensis* produzidas em sistema “on farm” em propriedades rurais de Goiás apresentam elevado índice de contaminação por diferentes espécies de bactérias patogênicas. O produto mostra-se inadequado para uso como biopesticida, com potencial risco para humanos e animais.

**Termos para indexação:** Bioinseticida, *B. thuringiensis*, Bt caseiro, contaminação

## Quality evaluation of *Bacillus thuringiensis*-Based Biopesticides Produced on Farm System

**Abstract** – Formulations containing *Bacillus thuringiensis*, bacteria characterized by producing protein crystal with specific insecticidal capacity, are among the most widely used biological products registered for insect control in Brazil. This bacterium can be cultivated in solid, liquid and semi-solid medium, and its production in alternative culture media is possible using industry waste and low cost materials. To do this, the fermentation system must be sterilized, and the process must be carried out under controlled conditions, allowing the production of good quality bioinsecticides that can be used by different extracts from farmers. In recent years, farmers in Brazil have been producing *B. thuringiensis*-based biopesticide for direct crop application, a practice known as on farm or homemade *Bt* production. The objective of this work was to evaluate the characteristics and the level of contamination of *B. thuringiensis*-based biopesticides produced on farm system in the state of Goiás, Brazil. Biopesticide samples were evaluated for visual characteristics, and they were plated in solid culture medium. The colonies were analyzed by phase-contrast microscopy and the species identified by 16S rDNA region sequencing. Biopesticide samples produced on farm system ranged from slightly brown and transparent containing insoluble material at the bottom to dark brown and cloudy staining, indicating the absence of any control and standardization in the manufacture of bioproducts. Plating of the samples in solid culture medium showed the presence of various colony types with different sizes and general aspects different from *B. thuringiensis* colonies, indicating the presence of contaminating microorganisms. Approximately 97.5% of the analyzed colonies were not identified as *B. thuringiensis*, indicating that the contaminants were more aggressive in the growing conditions used by farmers. *Enterococcus faecium* and *E. faecalis* were the most prevalent species and they have often been reported as resistant to multiple antibiotics and causing infections such as bacteremia, septicemia, urinary tract infections, wound infections, meningitis and endocarditis in humans. Thus, *B. thuringiensis*-based biopesticide samples produced on farm system in rural properties in Goiás showed a high rate of contamination by different pathogenic bacteria species. The product proves to be unsuitable for use as a biopesticide, with potential risk to humans and animals health.

**Index Terms:** Bioinsecticide, *B. thuringiensis*, homemade *Bt*, contamination

## Introdução

---

O mercado de bioprodutos no Brasil tem aumentado de maneira exponencial nos últimos 10 anos. Enquanto em 2008 apenas um produto foi registrado, somente em 2018 foram registrados 52 defensivos de baixa toxicidade, incluindo organismos biológicos, microbiológicos, bioquímicos, semioquímicos ou extratos vegetais, que podem até mesmo ser utilizados na agricultura orgânica (Brasil, 2019a). Nesse contexto, o mercado de produtos biológicos para controle de pragas e doenças agrícolas cresceu mais de 70% no último ano, movimentando cerca de R\$ 464 milhões em 2018. O resultado brasileiro é considerado o mais expressivo da história do setor e supera o percentual apresentado pelo mercado internacional (Brasil, 2019b).

Entre os produtos biológicos registrados para o controle de insetos, destacam-se formulações contendo a bactéria *Bacillus thuringiensis* como princípio ativo. O *B. thuringiensis* é uma bactéria Gram-positiva, ubíqua, que pode ser caracterizada pela capacidade de formar cristais proteicos (Cry) durante a fase estacionária e/ou de esporulação com capacidade inseticida específica. O modo de ação das proteínas Cry em lepidópteros ocorre quando larvas suscetíveis ingerem os cristais que são solubilizados por proteases no pH alcalino do intestino médio do inseto. Estas proteínas se inserem em membranas, causando o vazamento de íons e a lise celular, com consequente morte do inseto por septicemia (Bravo et al., 2007).

Atualmente, mais de 20 produtos comerciais contendo *B. thuringiensis* em sua formulação estão registrados no País. Essa bactéria pode ser cultivada em meio sólido, líquido e semissólido, sendo possível sua produção em meios de cultura alternativos, utilizando resíduos da indústria e materiais de baixo custo. Para isso, todo o laboratório e o sistema de fermentação devem ser esterilizados e o processo deve ser realizado sob condições controladas, permitindo a produção de bioinseticidas de qualidade que podem ser utilizados por pequenos, médios e grandes produtores rurais (Valicente; Morão, 2008).

Nos últimos anos diversos produtores têm fabricado em suas fazendas biopesticidas à base de *B. thuringiensis* para aplicação direta nas lavouras, prática conhecida como produção “on farm” ou “Bt caseiro”. Entretanto, essa fabricação apresenta riscos, sendo o maior deles a contaminação do produto com patógenos humanos e animais. Poucos trabalhos têm avaliado a qualidade

dos produtos à base de *B. thuringiensis* em sistema “on farm” (Boaventura et al., 2015; Monnerat et al., 2018; Valicente et al., 2018), principalmente pelo receio dos produtores rurais no fornecimento das amostras, dificultando assim análises mais robustas. Recentemente, diferentes espécies de patógenos humanos e de animais foram encontradas em três amostras coletadas em propriedades rurais no Estado do Mato Grosso, indicando que a produção dos bioprodutos tem sido realizada de modo inadequado, sem as mínimas condições de assepsia (Valicente et al., 2018).

Nesse trabalho, um grupo de dez amostras pertencentes a diferentes produtores rurais de Goiás foram analisadas com o objetivo de avaliar as características e o nível de contaminação de biopesticidas à base de *B. thuringiensis* produzidos em sistema “on farm”.

## Material e Métodos

---

### Coleta e caracterização das amostras

Um total de 10 amostras de biopesticida à base de *B. thuringiensis* produzidas em sistema “on farm” por diferentes produtores rurais de Jataí GO foram coletadas em recipientes plásticos e congeladas até o processamento. Em condições assépticas, as amostras foram homogeneizadas, distribuídas em copos plásticos de 50 mL e fotografadas para comparação de suas características visuais com uma amostra do biopesticida comercial à base de *B. thuringiensis* registrado como Dipel WP® (Abbott Laboratories, EUA), na concentração recomendada pelo fabricante.

### Identificação Molecular de Microrganismos

#### Crescimento Bacteriano e Extração de DNA

As amostras de biopesticidas “on farm” e uma amostra do biopesticida comercial Dipel WP® (controle) foram diluídas entre 10 e 1.000X em água ultrapura estéril, plaqueadas em meio de cultura Luria Bertani (LB) contendo 1,5% (m/v) de ágar e cultivadas a 28 °C por 24 h. As placas foram fotografadas, e

quatro colônias isoladas de cada amostra foram aleatoriamente selecionadas para identificação molecular dos microrganismos. Para a extração de DNA, as colônias foram inoculadas em 2 mL de meio de cultura LB distribuídos em tubos cônicos de 15 mL. As amostras foram crescidas a 28 °C por 24 h sob agitação de 150 rpm, centrifugadas a 16.000 rpm e o sobrenadante foi descartado. A extração de DNA genômico das células bacterianas foi realizada com o kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. A quantificação do DNA foi realizada em espectrofotômetro ND-1000 UV/VIS (NanoDrop Technologies, EUA) e as amostras foram diluídas para concentração de 10 ng/μL.

### **Amplificação Parcial do Gene 16S rRNA**

As reações de PCR foram preparadas com os primers 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3') (Turner et al., 1999) para amplificação parcial da região 16S rDNA. A amplificação do DNA foi realizada num volume final de 20 μL, contendo 30 ng de DNA; tampão de reação 1X (Kapa Biosystems, EUA); dNTPs 125 μM; dimetilsulfóxido (DMSO) 4% (v/v); primers a 0,5 μM cada e 1U de Taq DNA Polimerase (Kapa Biosystems, EUA). A amplificação foi realizada em termociclador Veriti (Applied Biosystems, EUA) com uma desnaturação inicial a 95 °C por 2 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 57 °C por 30 segundos, extensão a 72 °C por 1 minuto e 30 segundos e uma extensão final de 10 minutos a 72 °C. O produto de PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) por uma hora a 100 V em tampão TAE 1X (Tris-base 40 mM; ácido acético 40 mM; EDTA 1 mM). O gel foi corado com solução de Gel Red (Biotium, EUA), visualizado sob luz UV e fotografado no equipamento L-PIX Molecular Imaging (Loccus Biotecnologia, Brasil).

### **Sequenciamento de DNA**

Para a purificação dos fragmentos de DNA amplificados foram adicionados 4 μL da enzima Exo-Sap (GE HealthCare, EUA) em 15 μL produto da reação de PCR. Em seguida, as amostras foram incubadas a 37 °C por 30 minutos e 80 °C por 15 minutos. As reações de sequenciamento foram elaboradas com 4 μL do produto de PCR purificado, 1 μL de primers 515 F

(5'- GTGCCAGCMGCCGCGGTAA -3') ou (5'- GGTTACCTTGTTACGACTT - 3') (Turner et al., 1999) a 10 µM, 0,5 µL Big Dye V3.1 (Applied Biosystems, EUA), 1,75 µL do tampão de sequenciamento (Applied Biosystems, EUA) e 2,75 µL de água ultrapura. Em seguida, as amostras foram incubadas em termociclador a 96 °C por 1 minuto, 96 °C por 20 segundos, 50 °C por 15 segundos, 60 °C por 4 minutos, repetidos por 30 vezes. Após o término da reação, foram adicionados 60 µL de etanol absoluto mais 5 µL de EDTA (125 mM). Os microtubos foram homogeneizados e incubados no escuro em temperatura ambiente por 15 minutos. As amostras foram centrifugadas a 4.000 rpm por 45 minutos, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 100 µL de etanol 70% (v/v). As amostras foram centrifugadas a 4.000 rpm por 10 minutos e o etanol foi descartado. Posteriormente, as amostras foram incubadas a 65 °C por 5 minutos, ressuspensas com 10 µL de formamida HI-DI (Applied Biosystems, EUA) e desnaturadas a 95 °C por 5 minutos. As amostras de DNA bacteriano foram analisadas no sequenciador de DNA modelo ABI PRISM 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystem, EUA) e as sequências alinhadas utilizando o programa Sequencher 4.1 (Gene Codes Corporation, EUA). Os microrganismos presentes nas amostras foram identificados por comparação de sequências contra o banco de dados público de sequências de DNA do Centro Nacional de Informação Biotecnológica (NCBI) com o programa BLASTN<sup>1</sup>.

## Microscopia de Contraste de Fase

Duas das colônias de cada amostra também foram analisadas por microscopia em contraste de fase com aumento de 400X para avaliação das características morfológicas dos microrganismos presentes. Como controle, foram incluídas e analisadas quatro colônias obtidas do biopesticida comercial utilizado anteriormente.

## Resultados e Discussão

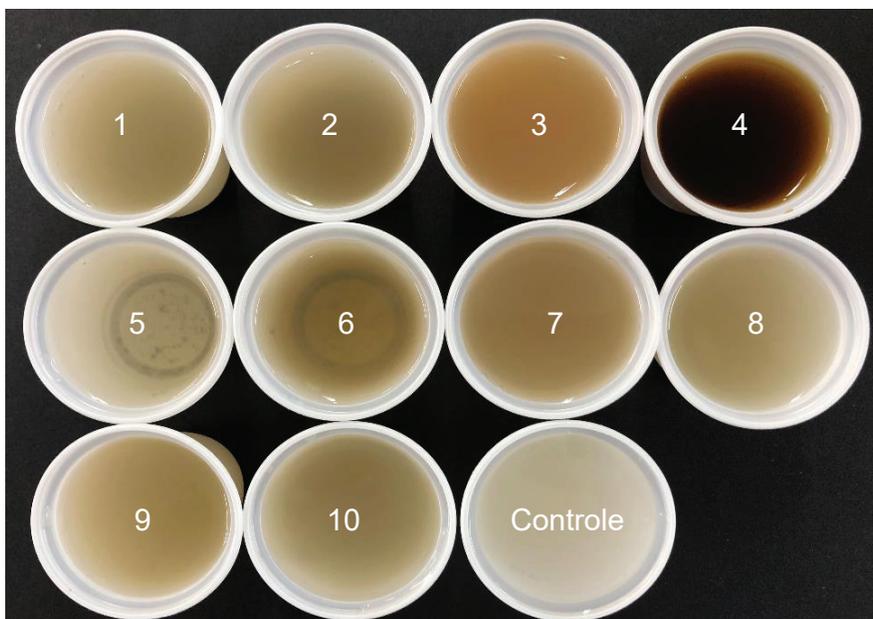
---

Dez amostras de biopesticida à base de *B. thuringiensis* produzidas em sistema "on farm" no Estado de Goiás foram avaliadas quanto às suas

---

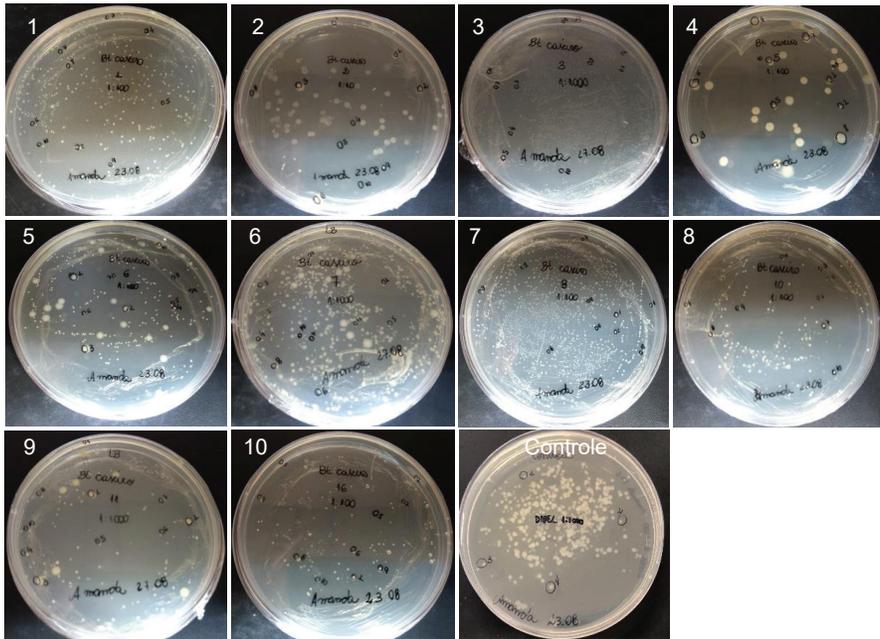
<sup>1</sup> <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>

características e níveis de contaminação. Em relação ao aspecto visual, as amostras variaram de coloração levemente parda e transparente contendo material insolúvel no fundo (5), até amostras de coloração marrom escura e turva (4) (Figura 1), indicando ausência de qualquer tipo de controle e padronização na fabricação dos bioprodutos. O controle de qualidade dos bioinseticidas deve uma etapa fundamental do processo de produção, buscando avaliar as características do bioinseticida sob diferentes aspectos, de forma a garantir a sua qualidade, segurança e eficácia. Em geral, a produção dos biopesticidas em sistema “on farm” tem sido realizada sem as condições mínimas de assepsia, favorecendo a contaminação com diferentes microrganismos presentes no ambiente (Valicente et al., 2018).



**Figura 1.** Aspecto visual de 10 amostras de biopesticida à base de *Bacillus thuringiensis* produzidas em sistema “on farm” em propriedades rurais no município de Jataí-GO. A amostra controle refere-se ao biopesticida comercial Dipel WP® (Abbott Laboratories, EUA).

Nesse trabalho, o plaqueamento das amostras em meio de cultura sólido mostrou a presença de vários tipos de colônias com diferentes tamanhos, a maioria sem qualquer semelhança com a morfologia das colônias de *B. thuringiensis* (controle), indicando a presença de microrganismos contaminantes (Figura 2). Em geral, os produtos comerciais à base de *B. thuringiensis* são compostos por uma mistura de cristais, esporos, poucas células vegetativas e ingredientes relacionados à formulação dos biopesticidas (Capalbo et al., 2004), garantindo assim sua eficácia no controle de insetos-praga.



**Figura 2.** Aspecto das colônias bacterianas presentes em 10 amostras de biopesticida à base de *Bacillus thuringiensis* produzidas em sistema “on farm” em propriedades rurais no município de Jataí-GO. A amostra controle refere-se ao biopesticida comercial Dipel WP® (Abbott Laboratories, EUA).

Com o objetivo de identificar as espécies de microrganismos contaminantes predominantes nas amostras, algumas colônias foram aleatoriamente selecionadas para análises moleculares. A identificação molecular dos microrganismos presentes no produto comercial (controle) indicou apenas a presença de *B. thuringiensis* (Tabela 1). Das quarenta cepas avaliadas (quatro colônias de cada amostra de biopesticida), apenas a amostra 2.1 foi confirmada como pertencente à espécie *B. thuringiensis*, indicando que os contaminantes foram mais agressivos no crescimento nas condições de cultivo utilizadas pelos produtores rurais.

Entre os diversos contaminantes identificados, podemos destacar algumas espécies com potencial risco para humanos e animais. Com exceção da amostra 2, todas as demais mostraram-se contaminadas com diferentes espécies de *Enterococcus* (Tabela 1), que estão frequentemente presentes na microbiota intestinal de seres humanos e animais, e amplamente distribuídas no ambiente (Biavasco et al., 2007; Campos et al., 2013). Quase a totalidade das amostras de biopesticidas analisadas neste trabalho apresentaram contaminação com as espécies *E. faecium* e *E. faecalis*, que têm sido relatadas como as mais prevalentes do gênero, caracterizadas pela resistência a múltiplos antibióticos e infecções como bacteremia, septicemia, infecções do trato urinário, infecções de feridas, meningites e endocardites em humanos (Cauwerts et al., 2007; Kense; Landman, 2011).

**Tabela 1.** Identificação molecular e caracterização de microrganismos presentes em dez amostras de biopesticida à base de *Bacillus thuringiensis* produzidas no sistema “on farm” em propriedades rurais em Jataí-GO.

Amostra	Fragmento DNA (pb)	Espécie	Cobertura (%)	E-value	Identidade (%)	Acesso GenBank	Presença de cristal	Efeito em mamíferos	Referência (Toxicidade)
1.1*	557	<i>Enterococcus faecalis</i>	100	0.0	99	NR_115765.1	-	Sim	Poulsen et al. (2012)
1.2	641	<i>E. canintestini</i>	100	0.0	99	NR_042386.1	-	Sim	Tan et al. (2010)
1.3	330	<i>E. saigonensis</i>	99	e-166	100	NR_152049.1	-	Desconhecido	Harada et al. (2016)
1.4	573	<i>Lactococcus lactis</i>	99	0.0	98	NR_116443.1	-	Não	Song et al. (2017)
2.1	312	<i>Bacillus thuringiensis</i>	100	e-163	99	NR_114581.1	+	Não	Bravo et al. (2011)
2.2	596	<i>Bacillus</i> sp.	100	0.0	100	NR_102783.2	-	Depende da espécie	Økstad e Kolstø (2011)
2.3	866	<i>Bacillus</i> sp.	99	0.0	98	NR_151897.1	-	Depende da espécie	Økstad e Kolstø (2011)
2.4	527	<i>Bacillus</i> sp.	100	0.0	99	NR_157609.1	-	Desconhecido	Sukontasing et al. (2007)
3.1	665	<i>E. camelliae</i>	100	0.0	99	NR_044121.1	-	Desconhecido	Sukontasing et al. (2007)
3.2	811	<i>E. camelliae</i>	100	0.0	99	NR_044121.1	-	Desconhecido	Sukontasing et al. (2007)
3.3	846	<i>E. canintestini</i>	100	0.0	98	NR_042386.1	-	Desconhecido	Sukontasing et al. (2007)
3.4	873	<i>E. canintestini</i>	100	0.0	99	NR_042386.1	-	Sim	Tan et al. (2010)
3.5	861	<i>E. canintestini</i>	100	0.0	99	NR_042386.1	-	Desconhecido	Takebe et al. (2012)
4.1	885	<i>Brevibacillus nitrificans</i>	100	0.0	99	NR_112926.1	-	Desconhecido	Takebe et al. (2012)
4.2	531	<i>E. faecium</i>	100	0.0	98	NR_115764.1	-	Sim	Cauwerts et al. (2007)
4.3	322	<i>Paenibacillus cookii</i>	100	e-154	98	NR_025372.1	-	Desconhecido	Logan et al. (2004)
4.4	883	<i>P. cookii</i>	100	0.0	99	NR_025372.1	-	Desconhecido	Logan et al. (2004)
5.1	869	<i>Acinetobacter baumannii</i>	100	0.0	98	NR_026206.1	-	Sim	McConnell et al. (2013)
5.2	294	<i>E. massiliensis</i>	100	e-135	97	NR_144723.2	-	Desconhecido	Le Page et al. (2016)
5.3	867	<i>E. faecium</i>	100	0.0	99	NR_115764.1	-	Sim	Cauwerts et al. (2007)
5.4	628	<i>Morganella morganii</i>	100	0.0	99	NR_028938.1	-	Sim	Liu et al. (2016)
6.1	810	<i>Comamonas thiooxydans</i>	100	0.0	99	NR_115741.1	-	Desconhecido	Pandey et al. (2009)
6.2	632	<i>E. faecium</i>	100	0.0	99	NR_115764.1	-	Desconhecido	Pandey et al. (2009)
6.3	665	<i>E. faecium</i>	100	0.0	99	NR_115764.1	-	Sim	Cauwerts et al. (2007)
6.4	799	<i>E. faecium</i>	100	0.0	99	NR_115764.1	-	Desconhecido	Økstad e Kolstø (2011)
6.5	868	<i>Bacillus</i> sp.	100	0.0	100	NR_148244.1	-	Depende da espécie	Økstad e Kolstø (2011)

**Tabela 1 cont.** Identificação molecular e caracterização de microrganismos presentes em dez amostras de biopesticida à base de *Bacillus thuringiensis* produzidas no sistema “on farm” em propriedades rurais em Jataí-GO.

Amostra	Fragmento DNA (pb)	Espécie	Cobertura (%)	E-value	Identidade (%)	Acesso GenBank	Presença de cristal	Efeito em mamíferos	Referência (Toxicidade)
7.1	566	<i>E. faecalis</i>	100	0.0	99	NR_115765.1	-		
7.2	873	<i>E. faecalis</i>	100	0.0	99	NR_115765.1	-		
7.3	872	<i>E. faecalis</i>	100	0.0	99	NR_115765.1	-		
7.4	470	<i>E. faecalis</i>	100	0.0	99	NR_115765.1	-	Sim	Poulsen et al. (2012)
7.5	872	<i>E. faecalis</i>	100	0.0	99	NR_115765.1	-		
8.1	848	<i>E. massiliensis</i>	100	0.0	99	NR_144723.2	-	Desconhecido	Le Page et al. (2016)
8.4	404	<i>E. massiliensis</i>	99	e-178	96	NR_144723.2	-		
8.2	642	<i>E. faecalis</i>	100	0.0	99	NR_115765.1	-		
8.3	865	<i>E. faecalis</i>	99	0.0	99	NR_115765.1	-	Sim	Poulsen et al. (2012)
8.5	868	<i>E. faecalis</i>	100	0.0	100	NR_115765.1	-		
9.1	227	<i>E. faecalis</i>	100	e-90	94	NR_115765.1	-		
9.2	251	<i>E. faecalis</i>	98	e-105	95	NR_115765.1	-		
9.3	555	<i>E. faecium</i>	100	0.0	96	NR_115764.1	-	Sim	Poulsen et al. (2012)
9.4	296	<i>E. faecalis</i>	100	e-144	99	NR_115765.1	-		
10.1	870	<i>Bacillus</i> sp.	100	0.0	98	NR_157609.1	-		
10.2	627	<i>Bacillus</i> sp.	99	0.0	97	NR_157609.1	-	Depende da espécie	Økstad e Kolstø (2011)
10.3	872	<i>Bacillus</i> sp.	100	0.0	98	NR_157609.1	-		
10.4	651	<i>E. faecium</i>	100	0.0	98	NR_115764.1	-	Sim	Cauwerts et al. (2007)
D.1**	875	<i>B. thuringiensis</i>	100	0.0	99	NR_114581.1	+		
D.2	878	<i>B. thuringiensis</i>	100	0.0	99	NR_114581.1	+		
D.3	875	<i>B. thuringiensis</i>	100	0.0	99	NR_114581.1	+	Não	Bravo et al.(2011)
D.4	870	<i>B. thuringiensis</i>	100	0.0	99	NR_114581.1	+		
D.5	873	<i>B. thuringiensis</i>	100	0.0	99	NR_114581.1	+		

\* O primeiro número refere-se à identificação da amostra e o número após o ponto indica a colônia avaliada.

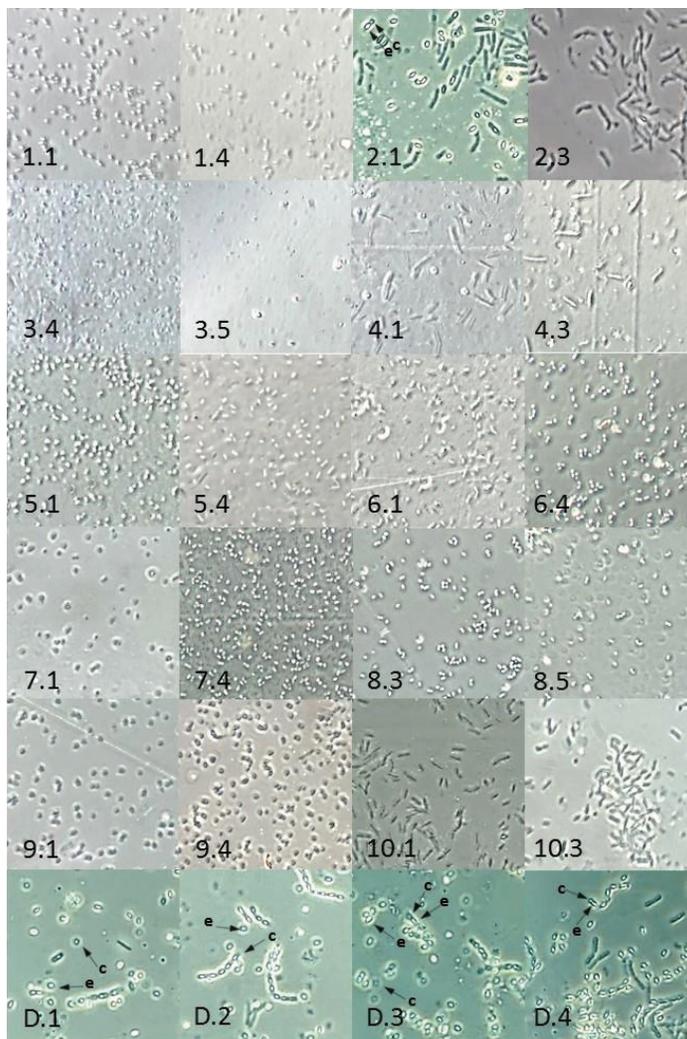
\*\* D: produto comercial à base de *Bacillus thuringiensis* utilizado como controle positivo.

A espécie *Enterococcus canintestini* foi detectada nas amostras 1 e 3, sendo também isolada de fezes caninas (Naser et al., 2005), podendo causar bacteremia e morte em humanos (Tan et al., 2010). A espécie *Enterococcus saigonensis* presente na amostra 1 foi também isolada e relatada pela primeira vez em frangos e possui resistência ao antibiótico vancomicina (Harada et al., 2016). A espécie *Enterococcus camelliae* isolada da amostra 3 foi também isolada e relatada pela primeira vez em material vegetal fermentado (Sukontasing et al., 2007), enquanto a espécie *Enterococcus massiliensis* foi isolada e relatada pela primeira em fezes humanas (Le Page et al., 2016). A espécie *Morganella morganii*, detectada na amostra 5 (Tabela 1), também tem sido relatada como resistente a múltiplos antibióticos, podendo causar várias infecções, como sepse, abscesso, síndrome da urina roxa, celulite e corioamnionite (inflamação das membranas fetais) em humanos. A contaminação com essa bactéria geralmente resulta numa alta taxa de mortalidade em pacientes com alguma infecção (Liu et al., 2016).

Adicionalmente, as cepas foram analisadas por microscopia de contraste de fase para avaliação das características morfológicas das células bacterianas, principalmente em relação às cepas identificadas molecularmente como *Bacillus* sp., sem atribuição da espécie. Apenas as cepas provenientes do produto comercial à base de *B. thuringiensis* (controle) e a amostra 2.1 mostraram a presença de esporos e cristais típicos da espécie, indicando que todas as demais cepas identificadas como *Bacillus* sp. nas amostras dos biopesticidas 2, 6 e 10 são também contaminantes ao processo de fermentação (Tabela 1, Figura 3). O gênero *Bacillus* compreende mais de 260 espécies e 7 subespécies, incluindo várias espécies também patogênicas para humanos e animais (Reino Unido, 2018).

Os níveis de contaminação identificados neste trabalho (97,5%) foram superiores em relação às amostras de biopesticidas coletadas em Mato Grosso (Valicente et al., 2018), sugerindo que os produtos não devem ter qualquer efeito no controle de pragas. Além disso, a detecção de espécies bacterianas presentes nos bioprodutos “on farm” que também têm sido reportadas como resistentes a múltiplos antibióticos podem gerar sérios problemas de Saúde Pública, uma vez que esses microrganismos podem ter a capacidade de transmitir genes de resistência antimicrobiana para outros microrganismos presentes na microbiota intestinal de humanos e animais, podendo inviabilizar o uso de diversos antibióticos para tratamentos clínicos.

Em função destes riscos, as amostras de biopesticidas produzidas “on farm” coletadas em Goiás não foram testadas quanto à eficiência no controle de pragas agrícolas.



**Figura 3.** Microscopia de contraste de fase com aumento de 400 X de bactérias isoladas de dez amostras de biopesticida à base de *Bacillus thuringiensis* produzidas no sistema “on farm” em propriedades rurais em Jataí-GO. O primeiro número refere-se à identificação da amostra, e o número após o ponto indica a colônia avaliada. D: Bioinseticida comercial à base de *B. thuringiensis* (controle positivo). As setas indicam o cristal (c) e o esporo (e) presentes em cepas de *B. thuringiensis*.

## Conclusão

---

As amostras de biopesticida à base de *Bacillus thuringiensis* produzidas em sistema “on farm” em propriedades rurais de Goiás apresentam elevado índice de contaminação por diferentes espécies de bactérias patogênicas. O produto mostra-se inadequado para uso como biopesticida, com potencial risco para humanos e animais.

## Referências

---

BIAVASCO, F.; FOGLIA, G.; PAOLETTI, C.; ZANDRI, G.; MAGI, G.; GUAGLIANONE, E.; SUNDS-FJORD, A.; PRUZZO, C.; DONELLI, G.; FACINELLI, B. VanA-type enterococci from humans, animals, and food: species distribution, population structure, Tn1546 typing and location, and virulence determinants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 10, p. 3307-3319, 2007.

BOAVENTURA, H. A.; QUINTELA, E. D.; NORONHA JÚNIOR, N. C.; PONTES, R. G. M. S. Avaliação da eficiência do “Bt caseiro” no controle de lagartas de *Helicoverpa armigera*. In: SEMINÁRIO JOVENS TALENTOS, 9, 2015, Santo Antônio de Goiás. **Coletânea dos resumos apresentados**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2015. p. 17.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Cresce número de registros de produtos biológicos para uso agrícola**. Brasília, 2019a. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/noticias/cresce-numero-de-registros-de-produtos-biologicos-para-uso-agricola>>. Acesso em: 2 maio 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Mercado de biodefensivos cresce mais de 70% no Brasil em um ano**. Brasília, DF, 2019b. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/noticias/feffmercado-de-biodefensivos-cresce-em-mais-de-50-no-brasil>>. Acesso em: 9 maio. 2019.

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

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, v. 49, n. 4, p. 423-435, 2007.

CAMPOS, A. C. F. B.; SOUZA, N. R.; SILVA, P. H. C. da; SANTANA, A. P. Resistência antimicrobiana em *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* isolados de carcaças de frango. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 5, p. 575-580, 2013.

CAPALBO, D. M. F.; VILAS-BÔAS, G. T.; ARANTES, O. M. N. *Bacillus thuringiensis*: formulações e plantas transgênicas. In: BORÉM, A. (Ed.). **Biotecnologia e meio ambiente**. Viçosa, MG: Folha de Viçosa, 2004. p. 309-350.

CAUWERTS, K.; DECOSTERE, A.; GRAEF, E. M. de; HAESEBROUCK, F.; PASMANS, F. High prevalence of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from broilers carrying the *erm(B)* gene. **Avian Pathology**, v. 36, n. 5, p. 395-399, 2007.

HARADA, T.; DANG, V. C.; NGUYEN, D. P.; NGUYEN, T. A.; SAKAMOTO, M.; OHKUMA, M.; MOTOOKA, D.; NAKAMURA, S.; UCHIDA, K.; JINNAI, M.; YONOGLI, S.; KAWAHARA, R.; KANKI, M.; KAWAI, T.; KUMEDA, Y.; YAMAMOTO, Y. *Enterococcus saigonensis* sp. nov., isolated from retail chicken meat and liver. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 10, p. 3779-3785, 2016.

KENSE, M. J.; LANDMAN, W. J. M. *Enterococcus cecorum* infections in broiler breeders and their offspring: molecular epidemiology. **Avian Pathology**, v. 40, n. 6, p. 603-612, 2011.

LE PAGE, S.; CIMMINO, T.; MILLION, M.; MICHELLE, C.; KHELAIFIA, S.; LAGIER, J. C.; RAOULT, D.; ROLAIN, J. M. Noncontiguous finished genome sequence and description of *Enterococcus massiliensis* sp. nov. **New Microbes and New Infections**, v. 12, p. 90-95, 2016.

LIU, H.; ZHU, J.; HU, Q.; RAO, X. *Morganella morganii*, a non-negligent opportunistic pathogen. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 50, p.10-17, 2016.

LOGAN, N. A.; CLERCK, E. L.; VERHELST, A.; JOHAN GORIS, J.; ALFRED FORSYTH, G. A.; RODRÍGUEZ-DIAZ, M.; HEYNDRIX, M.; VOS, P.

*Paenibacillus cineris* sp. nov. and *Paenibacillus cookii* sp. nov., from Antarctic volcanic soils and a gelatin-processing plant. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 4, p. 1071-1076, 2004.

MCCONNELL, M. J.; ACTIS, L.; PACHÓN, J. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 2, p. 130-155, 2013.

MONNERAT, R.; PRAÇA, L. B.; SILVA, E. S. da; MONTALVÃO, S. C. L.; MARTINS, E. S.; SOARES, C. M. S.; QUEIROZ, P. R. **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. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 360).

NASER, S. M.; VANCANNEYT, M.; DE GRAEF, E.; DEVRIESE, L. A.; SNAUWAERT, C.; LEFEBVRE, K.; HOSTE, B.; ŠVEC, P.; DECOSTERE, A.; HAESEBROUCK, F.; SWINGS, J. *Enterococcus canintestini* sp. nov., from faecal samples of healthy dogs. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 5, p. 2177-2182, 2005.

ØKSTAD, O. A.; KOLSTØ, A. B. Genomics of bacillus species. In: WIEDMANN, M.; ZHANG, W. (Ed.). **Genomics of foodborne bacterial pathogens**. New York: Springer, 2011. p. 29-53. (Food Microbiology and Food Safety).

PANDEY, S. K.; NARAYAN, K. D.; BANDYOPADHYAY, S.; NAYAK, K. C.; DAS, S. K. Thiosulfate oxidation by *Comamonas* sp. S23 isolated from a sulfur spring. **Current Microbiology**, v. 58, n. 5, p. 516-521, 2009.

POULSEN, L. L.; BISGAARD, M.; SON, N. T.; TRUNG, N. V.; AN, H. M.; DALSGAARD, A. *Enterococcus faecalis* clones in poultry and in humans with urinary tract infections, Vietnam. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 7, p. 1096-1100, 2012.

REINO UNIDO. Public Health England. **UK Standards for Microbiology Investigations: identification of Bacillus species**. London, 2018. 27 p. (Bacteriology, ID 9, n. 3.1). Disponível em: <[https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/697260/ID\\_9i3.1.pdf](https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/697260/ID_9i3.1.pdf)>. Acesso em: 13 ago. 2019.

SONG, A. A.; IN, L. L. A.; LIM, S. H. E.; RAHIM, R. A. A review on *Lactococcus lactis*: from food to factory. **Microbial Cell Factories**, v. 16, article 55, p. 1-15, 2017.

SUKONTASING, S.; TANASUPAWAT, S.; MOONMANGMEE, S.; LEE, J. S.; SUZUKI, K. *Enterococcus camelliae* sp. nov., isolated from fermented tea leaves in Thailand. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 9, p. 2151-2154, 2007.

TAKEBE, F.; HIROTA, K.; NODASAKA, Y.; YUMOTO I. *Brevibacillus nitrificans* sp. nov., a nitrifying bacterium isolated from a microbiological agent for enhancing microbial digestion in sewage treatment tanks. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, n. 9, p. 2121-2126, 2012.

TAN, C. K.; LAI, C. C.; WANG, J. Y.; LIN, S. H.; LIAO, C. H.; HUANG, Y. T.; WANG, C. Y.; LIN, H. I.; HSUEH, P. R. Bacteremia caused by non-faecalis and non-faecium *Enterococcus* species at a Medical center in Taiwan, 2000 to 2008. **Journal of Infection**, v. 61, n. 1, p. 34-43, 2010.

TURNER, S.; PRYER, K. M.; MIAO, V. P. W.; PALMER, J. D. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 46, n. 4, p. 327-338, 1999.

VALICENTE, F. H.; LANA, U. G. de P.; PEREIRA, A. C. P.; MARTINS, J. L. A.; TAVARES, A. N. G. **Riscos à produção de biopesticida à base de *Bacillus thuringiensis***. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2018. 20 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 239).

VALICENTE, F. H.; MOURÃO, A. H. C. Use of by-products rich in carbon and nitrogen as a nutrient source to produce *Bacillus thuringiensis* (Berliner) -based biopesticide. **Neotropical Entomology**, v. 37, n. 6, p. 702-708, 2008.

**Embrapa**

---

**Milho e Sorgo**



MINISTÉRIO DA  
AGRICULTURA, PECUÁRIA  
E ABASTECIMENTO



PÁTRIA AMADA  
**BRASIL**  
GOVERNO FEDERAL

