

OBJETIVOS DE  
DESENVOLVIMENTO  
SUSTENTÁVEL

12 CONSUMO E  
PRODUÇÃO  
RESPONSÁVEIS



Foto: Zayame Vegette Pinto

COMUNICADO  
TÉCNICO

59

Jaguariúna, SP  
Agosto, 2022

**Embrapa**

## Controle de qualidade e conformidade de produtos e fermentados à base de *Bacillus* spp.: proposta metodológica

Wagner Bettiol  
Marcelo Augusto Boechat Morandi  
Zayame Vegette Pinto  
Cleusa Maria Mantovanello Lucon

# Controle de qualidade e conformidade de produtos e fermentados à base de *Bacillus* spp.: proposta metodológica<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Wagner Bettiol, Engenheiro-agrônomo, doutor em Fitopatologia, pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP.

Marcelo Augusto Boechat Morandi, Engenheiro-agrônomo, doutor em Fitopatologia, pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP.

Zayame Vegette Pinto, Engenheira-agrônoma, doutora em Proteção de Plantas, pesquisadora da Ballagro Agro Tecnologia, Bom Jesus dos Perdões, SP.

Cleusa Maria M Lucon, Bióloga, doutora em Microbiologia, pesquisadora do Instituto Biológico de São Paulo, São Paulo, SP.

\* Este trabalho é uma versão atualizada e ajustada, para ampliação do acesso ao público de interesse, da apostila do Curso Teórico-Prático para Quantificação e Identificação de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*, disponível de forma limitada em: [https://www.cnpma.embrapa.br/down\\_site/forum/2012/bacillus/ApostilaCursoBacillus2012.pdf](https://www.cnpma.embrapa.br/down_site/forum/2012/bacillus/ApostilaCursoBacillus2012.pdf)

## Introdução

O conceito de controle biológico de doenças de plantas mais aceito pela comunidade é de Cook e Baker (1983), para os quais o “controle biológico é a redução da soma de inóculo ou das atividades determinantes da doença, provocada por um patógeno, realizada por um ou mais organismos que não o homem”. Nesta publicação, o termo controle biológico será utilizado como o controle de um organismo por meio de outro organismo, ou ainda o controle de um agente causal de uma doença de planta por meio de um microrganismo antagonista. Os produtos para este fim são chamados de biopesticidas, biofungicidas, bionematicidas ou bioprotetores. Biopesticidas são organismos vivos (fungos, bactérias, protozoários, straminipila e vírus),

animais microscópicos (nematóides) e macrorganismos (predadores e parasitoides, insetos e ácaros) ou produtos naturais derivados desses organismos que são usados na proteção das plantas contra problemas fitossanitários (Bettiol, 2011). Considerando este conceito, os termos bionematicidas e biofungicidas indicam os organismos agentes de biocontrole utilizados para controlar nematóides e fungos fitopatogênicos, respectivamente. Por outro lado, o termo bioprotetores engloba todos os produtos biológicos utilizados na proteção de plantas (Bettiol et al., 2021).

Uma ampla expansão de uso dos bioprotetores ou biopesticidas, contendo agentes de controle biológico, está ocorrendo em todo o mundo. O mercado global de biopesticidas foi avaliado em US\$ 5.085 milhões em 2020, e

está projetado para atingir US\$ 11.438 milhões até 2026, com a previsão de uma taxa anual de crescimento de 14,5% no período de 2021 a 2026 (Research and Markets, 2022). No Brasil, de acordo com Bueno et al. (2020), a área sob controle biológico de pragas e doenças com inimigos naturais e antagonistas foi superior a 30 milhões de hectares, considerando as informações de 2017. Esse número coloca o Brasil como o país com a maior área sob controle biológico no mundo. Contudo, este número deve ter ultrapassado a área de 50 milhões de hectares em 2021.

A importância do controle biológico, no Brasil, pode ser avaliada considerando-se a progressão do número de produtos biológicos registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa), que em agosto de 2011 era de 27, passando para 137 em meados de 2018, subindo para 200 em março de 2019 (Agrofit, 2021). Em dezembro de 2021, o número de produtos biológicos registrados foi superior a 400, que dobrou em um curto espaço de tempo. Esses dados indicam a importância crescente dos biopesticidas no agronegócio brasileiro. De acordo com a indústria nacional de produção de agentes de controle biológico, em 2018 ocorreu um dos maiores crescimentos de vendas de sua recente história. Estas informações indicam a tendência de adoção crescente desta tecnologia mais sustentável pelos agricultores.

Os produtos formulados com bactérias do gênero *Bacillus*, bem como

os obtidos via fermentação “on farm” ou caseira, são os mais utilizados no controle de doenças de plantas no Brasil. Atualmente, as espécies utilizadas nos produtos comerciais registrados no Mapa à base de *Bacillus* são: *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus methylophilicus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus velezensis*. Ao analisar a distribuição dessas espécies nos 79 biofungicidas e bionematicidas à base de *Bacillus*, registrados até março de 2022 no Mapa, observa-se que 44,3% dos produtos são à base de *Bacillus amyloliquefaciens*; 31,6% à base de *Bacillus subtilis*; 7,6% à base de *Bacillus velezensis*; 7,6% à base de *Bacillus licheniformis*; 6,3% à base de *Bacillus pumilus*; e 2,6% à base de *Bacillus methylophilicus* (Agrofit, 2021). Além do Brasil, essas espécies são comercializadas em muitos outros países (Bettiol et al., 2012; Cawoy et al., 2012). Contudo, com o enorme interesse das empresas e dos agricultores, novas espécies de *Bacillus* deverão ser comercializadas brevemente. Há, também, necessidade de se considerar que existe um grande número de produtos registrados no Mapa (Agrofit, 2021) à base de *Bacillus thuringiensis* para o controle de pragas.

Os *Bacilli* são caracterizados por apresentarem forma de bastonete entre 4 a 10  $\mu\text{m}$  de comprimento e 0,15 a 1  $\mu\text{m}$  de diâmetro com flagelos que permitem sua movimentação e forma endósporo (estrutura de resistência) (Earl et al., 2008; Madigan et al., 2016).

Os bioprotetores (biofungicidas e bionematicidas) formulados à base de *Bacillus* são utilizados no Brasil, principalmente nas culturas da soja, algodão, milho, feijão, morango, citros, cana-de-açúcar, café, tabaco, hortaliças, ornamentais, frutíferas e espécies florestais. Além do uso como agentes de biocontrole, os produtos à base de *Bacillus* são utilizados, além do mais, como promotores de crescimento de plantas, tecnologia que vem ganhando importância, especialmente visando a redução do uso de fertilizantes minerais.

Além dos produtos registrados no MAPA é fundamental considerar o avanço do controle biológico de doenças realizado com base nos agentes de biocontrole multiplicados pelo próprio usuário, tecnologia que vem sendo chamada de fermentação “on farm” ou caseira. Diversas espécies de *Bacillus* são produzidas dessa forma; portanto, a área de uso desses agentes de controle biológico pode ser maior do que se aponta nos registros oficiais.

A fermentação líquida é a mais utilizada para a multiplicação de bactérias do gênero *Bacillus*, tanto nas empresas de controle biológico, como nas propriedades privadas que fazem a produção caseira ou “on farm”. Esse fato se deve às características da técnica, bem como pela versatilidade desse grupo de organismos. Outro motivo está relacionado com a maior facilidade de se implementar essa metodologia de multiplicação desses organismos, que é mais simples e mais rápida do que a

produção de fungos antagonistas que são multiplicados, principalmente em grãos de cereais, que demanda mais espaço e mão-de-obra.

A multiplicação “on farm” ou caseira está contemplada no Decreto 10.833 de 08 de outubro de 2021 em seu parágrafo 8: “Ficam isentos de registro os produtos fitossanitários com uso aprovado para a agricultura orgânica e convencional produzidos exclusivamente para uso próprio”.

Um dos gargalos do controle biológico de doenças e pragas no Brasil é o controle de qualidade dos bioprodutos, tanto comerciais disponíveis, como de fermentação “on farm” ou caseira, sendo indispensável a padronização de metodologias para a avaliação da qualidade e conformidade de produtos contendo agentes de biocontrole.

Considerando que as bactérias do gênero *Bacillus* estão entre os organismos mais empregados na agricultura brasileira, tanto nos produtos comerciais registrados, como de produção caseira, é fundamental o estabelecimento e disponibilização de metodologias de análise da qualidade desses produtos, protegendo a saúde dos produtores e dos consumidores.

Nesse sentido, prevendo o crescimento do mercado de produtos biológicos no Brasil, bem como a inexistência de metodologias padronizadas no país, foi delineado um projeto de pesquisa, iniciado em 2008, denominado “Projeto Qualibio:

Desenvolvimento de metodologia analítica e amostral para avaliação de conformidade e da inocuidade de produtos comerciais formulados à base de agentes microbianos”. Este projeto foi financiado pelo edital MCT/CNPq/Mapa/DAS n° 64/2008, com a coordenação da Embrapa Meio Ambiente e participação da Embrapa Arroz e Feijão, Instituto Biológico de São Paulo, Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Universidade Federal de Pelotas e Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (Ceplac/Cepec). O projeto focou no desenvolvimento de metodologias para análise da qualidade de produtos formulados com bactérias do gênero *Bacillus* e com fungos do gênero *Trichoderma*, que são os principais agentes de controle biológico de doenças de plantas no Brasil. Embora as metodologias desenvolvidas tenham sido focadas nesses dois agentes de biocontrole, também podem ser utilizadas para outros microrganismos agentes de biocontrole.

As metodologias desenvolvidas foram transferidas diretamente para as empresas e usuários de controle biológico por meio de treinamentos realizados na Embrapa Meio Ambiente, bem como em outras instituições, entre os anos de 2009 e 2012. Entretanto, devido ao expressivo crescimento do volume de produção e utilização de agentes de biocontrole, bem como ao aumento no número de empresas que comercializam esses produtos, há a necessidade de disponibilizar a metodologia desenvolvida para um

maior número de usuários, sendo esse o principal objetivo desta publicação.

Na presente obra é apresentado um método para análise da qualidade de produtos à base de *Bacillus*, tanto para os produtos registrados junto ao Mapa, como para obtidos via fermentação caseira ou “on farm”, ou ainda para o controle de qualidade de novos produtos que estão sendo desenvolvidos em instituições públicas e instituições privadas. Essa metodologia de controle de qualidade pode ser utilizada em todas as etapas da cadeia de produção de *Bacillus*. A sua adoção contribuirá para que as empresas e os produtores privados mantenham a qualidade dos produtos à base de *Bacillus* produzidos no país, e conseqüentemente que os agricultores mantenham a confiança na eficácia dos produtos à base de *Bacillus* produzidos no país. Desta forma, também contribuirá para ampliar o mercado e a adoção de agentes de biocontrole no Brasil.

## Proposta metodológica

A proposta metodológica desenvolvida e validada no âmbito do projeto Qualibio é apresentada, a seguir, em detalhes, proporcionando a possibilidade de ser reproduzida em laboratórios de microbiologia com estrutura mínima necessária sob a condução de técnicos treinados.

## Aplicação

A metodologia é aplicável a todos os produtos e fermentados que possuem em sua composição espécies de *Bacillus*.

## Princípio

O resultado deste método quantitativo é expresso em unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL), por meio da técnica de diluição seriada. A capacidade dessas bactérias produzirem estruturas de resistência tolerantes ao calor (endósporos) é fundamental para a correta quantificação da sua população no meio que as separa de contaminantes. As amostras são homogeneizadas com um diluente e, a partir disto, uma nova diluição é preparada para que cada amostra seja tratada termicamente a  $80 \pm 2$  °C por 12 minutos. Diluições decimais são preparadas a partir das amostras tratadas termicamente, que se espalham nas placas sobre o meio de cultivo e incubadas a  $30 \pm 2$  °C no escuro para posterior contagem do número de colônias formadas por *Bacillus*.

## Amostragem

A qualidade da amostra e sua correta preservação até o momento da análise é fundamental para o sucesso da técnica. As amostras devem ser obtidas de acordo com os princípios das Boas Práticas de Laboratório para que sejam representativas do produto, ou dos produtos, ou dos materiais a serem analisados (United States, 2005; Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2021).

É necessário que a amostra de produto comercial encaminhada para análise esteja com a embalagem comercial lacrada, contendo o nome do produto, o titular do registro, o número de registro no Mapa, o ingrediente ativo e sua concentração, a formulação, o número do lote, as datas de fabricação e de validade, o volume, a forma de armazenamento, e o nome do responsável técnico.

A amostra de produtos em fase de pesquisa e/ou desenvolvimento deverá estar em embalagem lacrada, e conter o nome do produto e/ou projeto, o número do registro especial temporário (RET), se necessário, a empresa ou instituição responsável, o ingrediente ativo, a concentração desejada/esperada, a formulação, datas de fabricação e, se possível, validade, volume, além da forma de armazenamento, e o nome do responsável pela amostra.

A amostra de fermentado obtido da fermentação caseira ou “on farm” encaminhada para análise deverá estar em recipiente autoclavado e fechado, contendo as seguintes informações: microrganismo, identificação do isolado, projeto e/ou ordem de produção, data e hora do início da fermentação, data da coleta do material, responsável pela amostra, e forma de armazenamento.

No laboratório, as amostras deverão ser armazenadas conforme a especificação e, após a sua abertura, registrar a data e o nome do técnico que realizou a ação. Todos os princípios microbiológicos estabelecidos devem

ser seguidos durante os trabalhos e armazenamento das amostras. Desta forma, as amostras serão representativas do produto ou do processo a ser analisado.

### Materiais, Equipamentos e Vidrarias

A metodologia proposta demanda equipamentos e vidrarias básicas utilizadas em laboratórios de avaliação

microbiológica, conforme listadas na Tabela 1.

### Soluções

São necessárias uma das duas soluções a seguir para preparo e diluição seriada das amostras: a) solução salina com Tween 80 e, b) água peptonada. O preparo destas soluções é apresentado na Tabela 2.

**Tabela 1.** Materiais, equipamentos e vidrarias necessárias para a realização do controle de qualidade de produtos de controle biológico à base de *Bacillus* spp.

Materiais	Equipamentos	Vidrarias
Alça de Drigalski esterilizada	Agitador de tubo de ensaio	Tubos de ensaio com capacidade de 25 mL*
Barra magnética esterilizada*	Agitador magnético com aquecimento	Placas de Petri descartáveis esterilizadas (ou de vidro)
Etanol 70%	Autoclave calibrada	Frasco com capacidade para 250 mL (Erlenmeyer com tampão e/ou frasco tipo Schott)*
Fósforo e/ou isqueiro	Balança semi-analítica com faixa mínima de 0,5 a 2.000 g	Lâmina e lamínula de microscopia
Hipoclorito de sódio 2% de ingrediente ativo	Banho de ultrassom com frequência de 40 kHz	Tampa para tubo de ensaio*
Óleo de imersão para microscopia (opcional)	Banho-maria operando a 80 ± 2 °C	
Papel toalha	Câmara de fluxo laminar	
Ponteiras estéreis para micropipeta de 10 mL, 100 µL e 1.000 µL (de preferência com filtro)	Incubadora tipo BOD ajustada para 30 ± 2 °C	
Estante para tubos de ensaio	Mesa agitadora para frasco ou agitador orbital	
Bico de Bunsen ou lamparina	Micropipeta para 10 mL, 100 µL e 1.000 µL	
	Microscópio óptico de contraste de fase (opcional)	
	pH-metro calibrado	

\*Devem ser esterilizadas em autoclave antes de serem utilizadas.

**Tabela 2.** Preparo das soluções diluentes.

Solução diluente	Ingredientes	Preparo*
Solução salina com Tween 80	<ul style="list-style-type: none"> <li>- NaCl P.A.: 9,0 g</li> <li>- Água destilada: 1.000 mL</li> <li>- Tween 80: 1 mL.</li> </ul>	Em frasco Erlenmeyer, suspender o NaCl em 1.000 mL de água destilada e acrescentar Tween 80 (0,1%). Misturar bem e autoclavar o diluente a 121 °C e 1 atm por 20 minutos. O diluente mantém as características por seis meses se armazenado adequadamente.
Água peptonada	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Peptona de caseína: 15,0 g (pode ser substituído por 15,0 g de Tryptone)</li> <li>- NaCl: 9,0 g</li> <li>- Água destilada: 1.000 mL</li> </ul>	Em frasco Erlenmeyer, suspender os ingredientes (NaCl e a peptona de caseína) em 1.000 mL de água destilada. Misturar completamente em agitador magnético com aquecimento. Autoclavar o diluente a 121 °C, 1 atm por 15 minutos. Antes do processo de autoclavagem, acertar o pH para 7,0 ± 0,2, com ácido clorídrico (HCl) ou hidróxido de sódio (NaOH), quando necessário. O diluente mantém as características por seis meses se mantido sob refrigeração (2 – 8 °C).

\*Todas as soluções devem ser esterilizadas em autoclave antes de serem utilizadas.

## Meios de Cultura

Os meios de cultura para as análises de produtos biológicos à base de *Bacillus* spp., tais como o Nutriente Agar (NA) ou o Luria Bertani (LB), podem ser utilizados e normalmente encontrados em fórmulas comerciais. A preparação dos meios deve se dar seguindo a recomendação do fabricante, e estes devem ser autoclavados a 121 °C a 1 atm por 20 minutos.

O meio de cultura, após preparado, deve ser vertido em placas de Petri esterilizadas, aproximadamente 20 mL do meio por placa. Após a solidificação do meio, as placas devem ser invertidas

e incubadas a  $37 \pm 2$  °C por uma noite para secar e para avaliar a condição de esterilidade do meio. As placas preparadas com meio podem ser estocadas em local escuro e sob refrigeração (2 - 8 °C) por sete dias.

## Procedimentos de Análise

Para que se tenha resultados confiáveis e reprodutíveis, é fundamental que o procedimento seja seguido corretamente por um técnico treinado e qualificado para a realização da análise. É importante ter no laboratório esta sequência de ações disponibilizada para cada lote de análise



em forma de um check-list, Tabela 3, para que possa ser seguido, passo-a-passo, e seja passível de verificação.

Antes de realizar os procedimentos e após o seu término, a câmara de fluxo laminar (ou o local onde foi realizado

o procedimento) deverá ser limpa com papel toalha embebida em álcool 70%. Em seguida, deverá ligar a luz UV por 15 minutos. Ademais, pode-se utilizar hipoclorito de sódio a 2% ou lysoforme e/ou água com detergente para complementar a limpeza.

**Tabela 3.** Protocolo de realização de análise de qualidade de bioprodutos à base de *Bacillus* spp., em formato de check-list, com identificação de amostras e/ou lotes.

<b>Lote ou amostra:</b>	
<b>Data de produção:</b>	<b>Data de recebimento:</b>
<b>Nome do responsável:</b>	
<b>Contato do responsável:</b>	
<b>Data do início da avaliação:</b>	
✓ <b>marcar a realização de cada etapa no passo correspondente [ ]</b>	
[ ] Passo 1 Colocar as amostras a serem testadas sob temperatura ambiente por 30 a 40 minutos antes do início da análise.	
[ ] Passo 2 Fazer uma placa controle, espalhando 100 µL do diluente em placa previamente preparada com o meio de cultura, com alça de Drigalski esterilizada;	
[ ] Passo 3 Pesar 10,0 g do produto a ser testado em frasco Erlenmeyer ou Schott de 250 mL e completar com 90 g do diluente (corresponde à diluição 10 <sup>-1</sup> ). Realizar duas pesagens para cada amostra e duas séries de diluições para cada pesagem (Passo 10).	
[ ] Passo 4 Colocar o Erlenmeyer ou Schott com a suspensão em agitador orbital ou mesa agitadora por 60 minutos a 200 rpm.	
[ ] Passo 5 Colocar o frasco com a suspensão em banho de ultrassom, sem aquecimento, por 5 minutos. O nível de água do banho de ultrassom deve ultrapassar o volume da suspensão contida no frasco.	
[ ] Passo 6 Colocar uma barra magnética e agitar a suspensão formada na intensidade 7 do agitador magnético por 1 minuto.	
[ ] Passo 7 Utilizar uma micropipeta esterilizada para transferir 1,0 mL da diluição 10 <sup>-1</sup> para cada um dos dois tubos com 9,0 mL de diluente (será obtida a diluição 10 <sup>-2</sup> ).	

Continua.

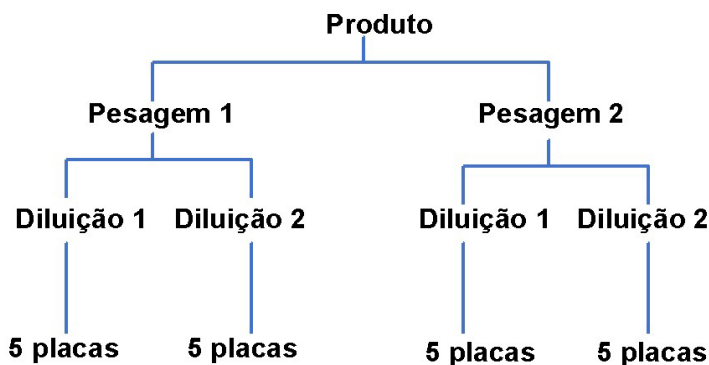
**Tabela 3.** Continuação.

<input type="checkbox"/> Passo 8 Misturar o conteúdo do frasco em agitador de tubo de ensaio, colocando e tirando três vezes do aparelho. O tubo deve ser retirado quando observar o turbilhonamento da suspensão.
<input type="checkbox"/> Passo 9 Tratar termicamente os tubos em banho-maria a $80 \pm 2$ °C por 12 minutos.
<input type="checkbox"/> Passo 10 Resfriar os tubos em banho gelado (água + gelo) por 10 segundos.
<input type="checkbox"/> Passo 11 Preparar diluições decimais de cada um dos tubos tratados termicamente. Transferir 1,0 mL do conteúdo para outro tubo com 9,0 mL de diluente (será obtida a diluição $10^{-3}$ ). Descartar a ponteira em seguida.
<input type="checkbox"/> Passo 12 Homogeneizar o conteúdo em agitador de tubo de ensaio, colocando e tirando três vezes do aparelho até ser observado o turbilhonamento da suspensão em cada uma das passagens.
<input type="checkbox"/> Passo 13 Repetir os passos 10 e 11 utilizando a última diluição preparada, até alcançar a diluição apropriada. A diluição apropriada para produtos com $10^{10}$ UFC/mL ou g é $10^{-6}$ ; para $10^9$ é $10^{-7}$ e assim por diante. Para cada diluição, trocar a ponteira da pipeta. Se não souber a concentração da amostra, a sugestão é utilizar as diluições de $10^{-4}$ , $10^{-5}$ , $10^{-6}$ e $10^{-7}$ .
<input type="checkbox"/> Passo 14 Transferir de cada diluição apropriada, com uma micropipeta esterilizada, 100 µL para a superfície de cinco placas de Petri com meio de cultura. Atenção: as placas e o meio não podem estar com água condensada, devem estar com a superfície seca.
<input type="checkbox"/> Passo 15 O volume transferido da diluição deve ser uniformizado sobre a superfície do meio com uma alça de Drigalski esterilizada, imediatamente após a transferência. Para cada grupo de cinco placas utilizar uma alça de Drigalski esterilizada.
<input type="checkbox"/> Passo 16 Deixar a amostra ser absorvida pelo meio por 2 minutos antes de inverter as placas e incubar a $37 \pm 2$ °C por 17-20 horas.
<input type="checkbox"/> Passo 17 Incubar as culturas a $30 \pm 2$ °C até a formação da colônia.
<input type="checkbox"/> Passo 18 Contar o número de colônias crescidas e verificar se as colônias formadas são realmente de <i>Bacillus</i> spp., por meio da visualização da colônia na placa*.
<input type="checkbox"/> Passo 19 (Opcional) Se possível, visualizar em microscópio ótico as células e esporos bacterianos colocando um pouco do crescimento bacteriano em lâmina de microscopia (preparação padrão de lâminas para visualizar bactérias). Observar em microscópio em aumento entre 400 a 1.000X (com óleo de imersão).

\*As colônias típicas de *Bacillus* podem ser visualizadas na Figura 2.

Como observado no Passo 3, devem ser preparadas duas pesagens de cada amostra. De cada pesagem devem ser realizadas duas séries de diluição

(Passo 12) que serão semeadas em cinco repetições (placas) por pesagem e por diluição (Figura 1).

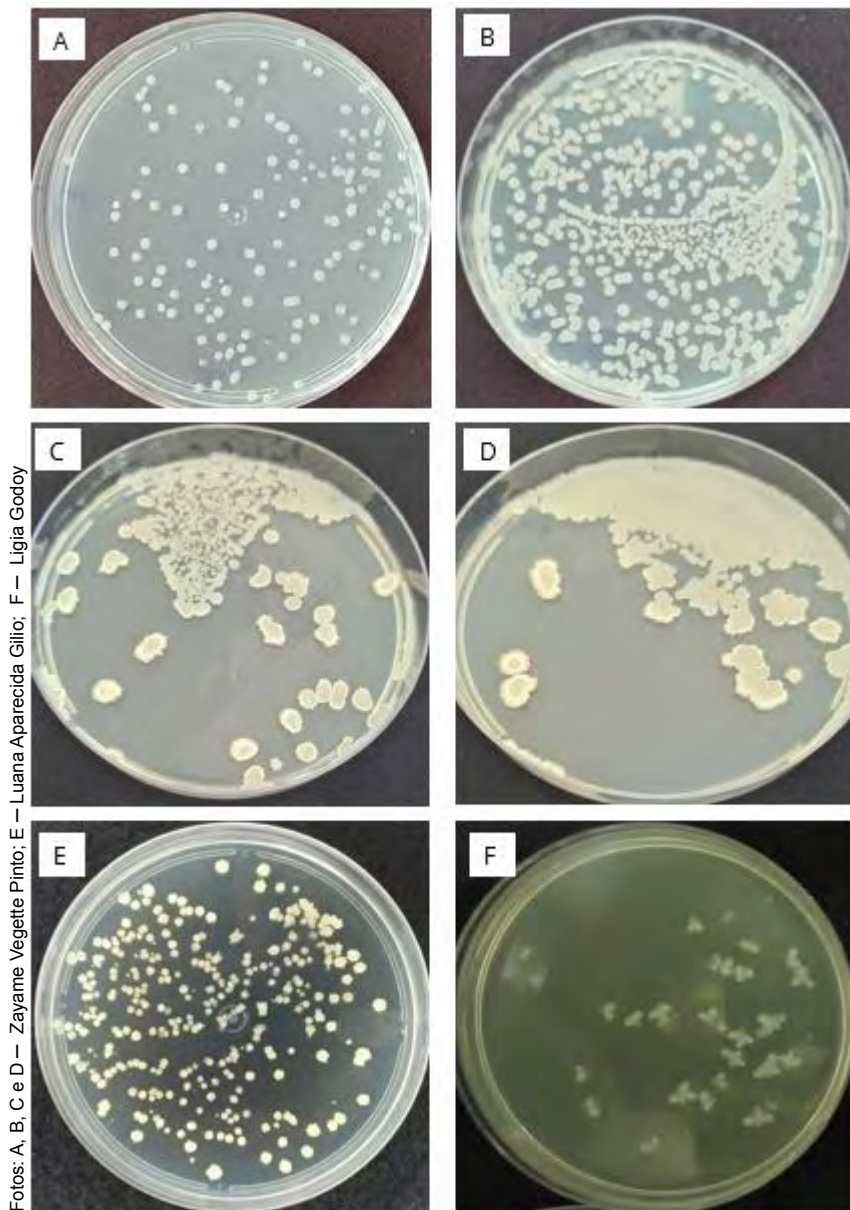


**Figura 1.** Esquema das diluições e das repetições utilizadas na metodologia para análise da qualidade de produtos à base de *Bacillus*. Criado por: Zayame Vegette Pinto

Após as análises, as amostras deverão ser armazenadas seguindo as orientações do fabricante ou do produtor até a data de validade, caso haja necessidade de repetição dos procedimentos. Após este período, ou se não houver mais interesse na amostra, estas deverão ser autoclavadas a 120 °C, 1 atm, por 20 minutos e descartadas em lixo orgânico.

### **Contagem de Colônias e Cálculo de UFC**

A contagem de colônias crescidas nas placas incubadas (Passo 18) deve ser realizada entre 20 e 48 horas após o início da incubação. Para a contagem, as colônias devem estar individualizadas e deve ser selecionada a diluição em que as placas contenham entre 30 a 300 colônias, Figura 2.



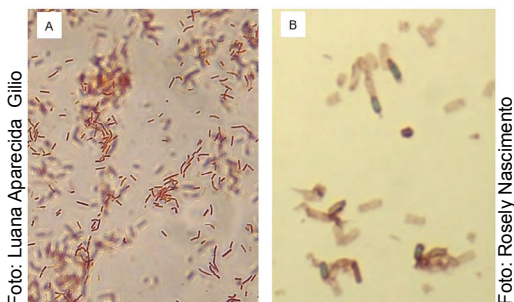
**Figura 2.** A – Colônias de *Bacillus subtilis* bem distribuídas e com número representativo na placa. B, C e D – Placa com excesso de água e colônias mal distribuídas. E – Colônias de *Bacillus velezensis*. F – Colônias de *Bacillus licheniformis*.

Para calcular o número de Unidades Formadoras de Colônias por mL (UFC/mL), deve-se utilizar a fórmula:

$\text{UFC/mL} = \text{número médio de colônias nas cinco placas} \times \text{diluição da amostra} \times 10$

(Nota: a multiplicação por 10 representa o fator de correção para transformar os cálculos para mL, uma vez que as alíquotas semeadas foram de 100  $\mu\text{L}$  de suspensão).

Para o passo 19 [Se possível, visualizar em microscópio ótico as células e esporos bacterianos colocando um pouco do crescimento bacteriano em lâmina de microscopia (preparação padrão de lâminas para visualizar bactérias). Observar em microscópio em aumento entre 400 a 1.000X (com óleo de imersão)], que é opcional, verificar o formato das células e dos endósporos na Figura 3.



**Figura 3.** A – Células na forma de bastonete de *Bacillus velezensis* em aumento de 400x, sendo células típicas do gênero. B – Endosporos de *Bacillus velezensis* em aumento de 1000x, com coloração verde.

### Considerações sobre os resultados obtidos

É fundamental o uso adequado dos resultados. Assim, para produtos registrados no Mapa, portanto, com garantia mínima, os resultados precisam expressar o número de unidades formadoras de colônias/mL (UFC/mL) que consta do rótulo. Se os valores obtidos na análise forem inferiores aos do rótulo há indicação de que o produto está fora do padrão e, portanto, sujeito aos procedimentos de fiscalização. Para o agricultor significa que o produto não atingirá o nível de controle indicado. Logicamente há necessidade de verificar se o lote está dentro do prazo de validade, bem como se foi armazenado adequadamente. Seria importante informar à empresa e ao Mapa sobre a ocorrência. Se o produto estiver na fase de desenvolvimento, os valores obtidos nortearão as empresas a fazer todos os acertos necessários nas fases de produção, bem como nos processos de registros. Por outro lado, na fase de pesquisa, os resultados, independentemente dos valores obtidos, indicarão à empresa os caminhos para obter uma quantidade superior de UFC/mL, ou mesmo estabelecer a concentração que será utilizada no produto comercial. Esses números serão fundamentais para as recomendações de rótulo.

Os resultados obtidos nas pesquisas nas instituições públicas precisam considerar, da mesma forma, os valores obtidos para que as publicações reflitam exatamente o que contém o produto.

Em relação à fermentação “on farm” ou caseira, que não são comercializadas e, portanto, não necessitam atingir um determinado número de UFC/mL, os resultados serão fundamentais para os agricultores decidirem os volumes do produto obtido que serão aplicados na respectiva área considerando a sua finalidade e frequência de aplicação.

## Agradecimentos

Ao MCT/CNPq/Mapa/DAS edital 64/2008. A metodologia foi, também, avaliada no âmbito no projeto por: Dr. Murillo Lobo Júnior da Embrapa Arroz e Feijão, Dr. Trazilbo José de Paula Júnior da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Dra. Andrea Bittencourt Moura da Universidade Federal de Pelotas, Dr. José Luiz Bezerra e Dr. João de Cassia B. Costa da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (Ceplac/Cepec). Agradecimentos às sugestões da bióloga Ligia Godoi da Chr. Hansen Indústria e Comércio Ltda.

## Referências

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução da Diretoria Colegiada (RDC nº 512, de 27 de maio de 2021)**. Dispõe sobre as Boas Práticas para Laboratórios de Controle de Qualidade. Diário Oficial da União, nº 101, 31 de maio de 2021. Disponível em: <[http://antigo.nvisa.gov.br/documents/10181/6278771/RDC\\_512\\_2021\\_.pdf/5650229b-218e-467a-83dd-e292581c20fe](http://antigo.nvisa.gov.br/documents/10181/6278771/RDC_512_2021_.pdf/5650229b-218e-467a-83dd-e292581c20fe)>. Acesso em: 23 jun. 2022.

AGROFIT. Disponível em: <[https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 15 ago. 2021.

BETTIOL, W. Biopesticide use and reserch in Brazil. **Outlooks on Pest Management**, v. 22, n. 6, p. 280-283, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1564/22dec10>.

BETTIOL, W.; MEDEIROS, F. H. V.; BARROS, J.; MENDES, R. Advances in screening approaches for the development of microbial bioprotectants for control of plant diseases. In: KÖHL, J.; RAVENSBERG, W. **Microbial bioprotectants for plant disease management**. Burleigh Dodds Science Publishing, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1201/9781003180777>.

BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B.; PINTO, Z. V.; PAULA JÚNIOR, T. J. de; CORRÊA, É. B.; MOURA, A. B.; LUCON, C. M. M.; COSTA, J. de C. do B.; BEZERRA, J. L. **Produtos comerciais à base de agentes de biocontrole de doenças de plantas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2012. 155 p. (Embrapa Meio Ambiente. Documentos, 88).

BUENO, V. H. P.; PARRA, J. R. P.; BETTIOL, W.; VAN LENTEREN, J. C. Biological control in Brazil. In: VAN LENTEREN, J. C.; BUENO, V. H. P., LUNA, M. G.; COLMENAREZ, Y. C. (ed.). **Biological control in Latin America and the Caribbean: its rich history and bright future**. CABI, p. 1-20, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1079/9781789242430.0000>.

CAWOY, H.; BETTIOL, W.; FICKERS, P.; ONGERA, M. Bacillus-based biological control of plant diseases. In: STOYTCHIEVA, M. (ed.). **Pesticides in the modern world: pesticides use and management**. Rijeka: InTech. p. 273-302, 2012.

COOK, R. J.; BAKER, K. F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. St. Paul, American Phytopathological Society, 1983. p. 539.

EARL, A. M.; LOSICK, R.; KOLTER, R. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. **Trends in Microbiology**, v. 16, n. 6, p. 269–275, 2008.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. **Microbiologia de Brock**. 14 ed. Porto Alegre: Artmed, 2016. 1160 p.

RESEARCH AND MARKETS. Biopesticides market: growth, trends, Covid-19 impact, and forecasts (2022-2027). Disponível em: <[https://www.researchandmarkets.com/reports/5165415/biopesticides-market-growth-trends-covid-19?utm\\_source=MC&utm\\_medium=Email&utm\\_code=mzrsvl929&utm\\_ss=24&utm\\_campaign=1554826+-+Biopesticides+Market+-+Growth%2c+Trends%2c+COVID-19+Impact%2c+and+Forecasts+\(2021+-+2026\)&utm\\_exec=adke277mtd](https://www.researchandmarkets.com/reports/5165415/biopesticides-market-growth-trends-covid-19?utm_source=MC&utm_medium=Email&utm_code=mzrsvl929&utm_ss=24&utm_campaign=1554826+-+Biopesticides+Market+-+Growth%2c+Trends%2c+COVID-19+Impact%2c+and+Forecasts+(2021+-+2026)&utm_exec=adke277mtd)>. Acesso em: 01 jul. 2022.

UNITED STATES. Food and Drug Administration. Good laboratory practices for conducting nonclinical laboratory studies. 2005. 21CFR58. Disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=58&showFR=1>>. Acesso em: 3 jul. 2022.

**Embrapa Meio Ambiente**  
Rodovia SP-340, km 127,5  
Tanquinho Velho  
Caixa Postal 69, CEP: 13918-110  
Jaguariúna, SP  
Fone: +55 (19) 3311-2610  
Fax: +55 (19) 3311-2640  
[www.embrapa.br/meio-ambiente](http://www.embrapa.br/meio-ambiente)  
[www.embrapa.br/fale-conosco/sac](http://www.embrapa.br/fale-conosco/sac)

1ª edição  
Versão digital (2022)



Ministério da Agricultura,  
Pecuária e Abastecimento



Comitê Local de Publicações  
da Embrapa Meio Ambiente

Presidente  
*Janaina Paula Marques Tanure*

Secretária-Executiva  
*Cristina Tiemi Shoyama*

Membros  
*Cristiano Menezes, Victor P. M. Simão, Eliana de Souza Lima, Rafaela C. R. M. Duarte, Fagoni F. Calegario, Geraldo Stachetti Rodrigues, Vera Lucia Ferracini, Ana Lucia Penteado*

Revisão de texto  
*Eliana de Souza Lima*

Normalização bibliográfica  
*Maria de Cléofas Faggion Alencar, CRB-8/1658*

Tratamento das ilustrações  
*Silvana Cristina Teixeira*

Projeto gráfico  
*Carlos Eduardo Felice Barbeiro*

Editoração eletrônica  
*Silvana Cristina Teixeira*

Foto da capa  
*Zayame Vegette Pinto*