

CIRCULAR TÉCNICA

97

Brasília, DF  
Fevereiro, 2023

# Produção em grande escala de *Bacillus* spp. na instalação fabril da empresa Agrosalgueiro

Rose Gomes Monnerat<sup>1</sup>  
Rogério Mitsunobu Aoyagui<sup>2</sup>  
Laura M. Goergen<sup>3</sup>  
Sandro Coelho Linhares Montalvão<sup>4</sup>  
Marcelo Tavares de Castro<sup>5</sup>



## Introdução

A agricultura brasileira apresenta características distintas dos demais países, pois devido ao clima e ambientes propícios, as plantações podem ocorrer em todos os períodos do ano (Embrapa, 2018). Para que a agricultura brasileira alcance alta produtividade é necessário enfrentar alguns problemas, dentre eles o ataque de diversas pragas. Essas pragas têm sido controladas através do uso de produtos químicos, que além de matá-las, tem causado contaminação ambiental, danos à saúde humana e seleção de insetos resistentes. Existem mais de 500 espécies de insetos e ácaros apresentando resistência a moléculas usualmente empregadas na agricultura (Connor et al., 2011; Khan et al., 2020). Uma das soluções para combater as pragas de forma eficaz e segura é com a utilização de produtos biológicos à base de microrganismos, como bactérias e fungos (Hernández-Rosas et al., 2020).

As bactérias, especialmente as do gênero *Bacillus*, são poderosas aliadas da produção agrícola sustentável, pois além de controlar diversas pragas e patógenos de plantas, também atuam como promotores de crescimento vegetal (Kumar et al., 2011; Borriss, 2015; Sansinenea, 2019). Portanto, o seu uso deve ser estimulado e priorizado. Infelizmente a disponibilidade de produtos biológicos ainda é escassa e por outro lado a legislação brasileira prevê a produção de insumos biológicos pelo agricultor para seu próprio uso. No entanto, não existem regras para esta produção e como consequência alguns microrganismos têm sido produzidos de forma incorreta e sem qualidade, muitas vezes apresentando cultivos contendo contaminantes perigosos (Valicente et al., 2018).

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia tem contribuído para a melhoria de processos de produção de microrganismos e para isso lançou em 2018 e 2020 dois manuais para produção e controle de qualidade de produtos biológicos à base de *Bacillus* spp. onde sugere quatro pontos

---

<sup>1</sup> Bióloga, PhD em Patologia de Invertebrados, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília DF.

<sup>2</sup> Engenheiro agrônomo, pesquisador, Empresa Agrosalgueiro, Brasília, DF.

<sup>3</sup> Engenheira agrônoma, pesquisadora autônoma, Brasília, DF.

<sup>4</sup> Engenheiro agrônomo, doutor em Fitopatologia, pesquisador, Brasília, DF.

<sup>5</sup> Engenheiro florestal, PhD em Agronomia, pesquisador, Brasília, DF.

fundamentais como alicerces para que as empresas produzam seus insumos (Monnerat et al., 2018, 2020). São eles: (1) estrutura de fabricação apropriada onde se controle a temperatura, oxigenação, pH e espuma e que garanta a esterilidade dos insumos, (2) uso de microrganismos com origem e qualidade garantidos, (3) processo de produção bem estabelecido e com rigoroso controle de qualidade e (4) corpo técnico capacitado.

Em 2019 foi iniciada uma colaboração com o Grupo Agrosalgueiro, localizado em Buritis (MG), para que fossem desenvolvidos e implementados processos de produção de bactérias para controle de insetos (*Bacillus thuringiensis kurstaki* e *B. thuringiensis aizawai*), para controle de fungos, bactérias e nematoides (*B. subtilis*), para controle de nematoides (*B. velezensis* e *B. licheniformis*) e para controle de fungos (*B. pumilus*). Portanto, esse trabalho teve como objetivo desenvolver e implementar a produção de microrganismos na propriedade para uso próprio da empresa Agrosalgueiro.

## Metodologia

### Preparo dos microrganismos

As amostras das estirpes foram fornecidas pela empresa Agrosalgueiro, com exceção da estirpe de *B. thuringiensis kurstaki*, que foi adquirida por fazer parte da especificação de referência do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Essas estirpes foram isoladas a partir de amostras de solo coletadas na própria fazenda e selecionadas previamente pelos pesquisadores da empresa. A fazenda do Grupo Agrosalgueiro, está localizada em Buritis (MG) a 155 quilômetros de Brasília (DF). A sede da fazenda está localizada nas coordenadas geográficas S15° 22' 9.28", W46° 50' 28.84" e a área experimental, nas S15° 22' 7.01", W 46° 51' 12.72".

Foram recebidas amostras das seguintes bactérias: *Bacillus thuringiensis kurstaki* e *aizawai*, *B. subtilis*, *B. methylotrophicus*, *B. pumilus* e *B. licheniformis*. Essas amostras foram doadas à Embrapa pela Agrosalgueiro e foram incorporadas a Coleção de Bactérias de Invertebrados da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Foram verificadas a pureza e a viabilidade das amostras, e posteriormente a espécie de cada amostra recebida foi confirmada por meio de análises moleculares. Foi também confeccionado um estoque de cada microrganismo (Monnerat et al., 2020).

## Estabelecimento do processo de produção dos microrganismos de interesse

Para cada microrganismo, foram realizadas 3 etapas para o processo de produção:

### **Etapla 1- Produção em pequena escala na Embrapa**

Cada um dos seis microrganismos foi inicialmente cultivado no fermentador de 100 litros da Embrapa. O meio de cultivo utilizado obedeceu a composição proposta para bactérias do gênero *Bacillus* (Monnerat et al., 2020). As condições de cultivo para todos os microrganismos foram: temperatura: 30 °C, pH: 6,8 a 7,2, oxigenação: acima de 20% e controle de espuma quando necessário. O processo se iniciou inoculando 4 tirinhas de papel contendo as bactérias em 20 mL de meio Embrapa (Monnerat et al., 2020) em erlenmeyers de 100 mL, em incubador rotativo a 200 rpm, 30 °C por 48 horas. Em seguida o cultivo foi inoculado no fermentador de 100 litros. A pureza do inóculo foi avaliada por microscopia de contraste de fases e por plaqueamento em meios seletivos. Após a inoculação do fermentador de 100 litros, o processo foi acompanhado a cada 6 horas, quando foram retiradas amostras. Essas amostras foram observadas em microscopia de contraste de fases, quanto a pureza e estágio de desenvolvimento. Quando foi observado que mais de 95% das células estavam esporuladas o processo foi encerrado. Amostras foram então coletadas e submetidas a testes para averiguação da quantidade de esporos, pureza e ausência de contaminações. Todos os protocolos utilizados estão descritos em Monnerat et al. (2020). Foram realizadas pelo menos 3 fermentações de cada microrganismo.

### **Etapla 2- Produção em grande escala na Agrosalgueiro**

Uma vez determinado o processo no fermentador de 100 litros, cada um dos seis microrganismos foi cultivado no fermentador de 1.000 litros da Agrosalgueiro. O meio de cultivo utilizado foi o mesmo utilizado na Embrapa e as condições de cultivo para todos os microrganismos foram as mesmas. O processo se iniciou inocu-

lando 4 tirinhas de papel contendo as bactérias em 20 mL de meio Embrapa em erlenmeyers de 100 mL, em incubador rotativo a 200 rpm, 30 °C por 48 horas. Em seguida o cultivo foi inoculado em 4 erlenmeyers de 2 litros contendo 500 mL de meio Embrapa, em incubador rotativo a 200 rpm, 30 °C por 10 horas. Em seguida, os cultivos foram inoculados no fermentador de 1.000 litros. A pureza do inóculo foi avaliada por microscopia de contraste de fases e por plaqueamento em meios seletivos.

Após a inoculação do fermentador de 1.000 litros, o processo foi acompanhado a cada 6 horas, quando foram retiradas amostras. Essas amostras foram observadas quanto a pureza e estágio de desenvolvimento. Quando foi observado que mais de 95% das células estavam esporuladas o processo foi encerrado. Amostras foram então coletadas e submetidas a testes para averiguação da quantidade de esporos, pureza e ausência de contaminações. Todos os protocolos utilizados estão descritos em Monnerat et al. (2020). Foram realizadas pelo menos 3 fermentações de cada microrganismo.

### **Etapa 3- Controle de qualidade dos caldos fermentados na Agrosalgueiro e Embrapa**

Uma vez dominado o processo de produção no fermentador de 1.000 litros pelos técnicos da Agrosalgueiro, a produção começou a ser constante e amostras foram enviadas a Embrapa para controle de qualidade (na Agrosalgueiro e Embrapa). Foram enviadas pelo menos 8 amostras de cada cultivo.

## **Resultados e Discussão**

### **Etapa 1- Produção em pequena escala na Embrapa**

Na tabela 1 estão descritos os microrganismos, tempo de fermentação até a esporulação de 95% e rendimento em esporos por mL, em fermentador de 100 litros na Embrapa. Como pode-se observar, o tempo médio que os microrganismos levaram para atingir 95% de esporulação variou entre 45 e 66,3 horas, o que é esperado em processos biológicos (Monnerat et al., 2020). A quantidade média de esporos/mL variou de  $1,2 \times 10^9$  até  $6,26 \times 10^9$ . Não houve nenhuma contaminação com microrganismos nocivos.

**Tabela 1.** Microrganismo, tempo de fermentação até a esporulação de 95% e rendimento em esporos por mL em fermentador de 100 L.

Microrganismo	Tempo, em horas, de fermentação até a esporulação de 95%	Média do tempo, em horas, de fermentação até a esporulação de 95%	Esporos por mL	Média do número de esporos por mL
<i>Bacillus thuringiensis kurstaki</i>	53	51	1,4 x 10 <sup>9</sup>	1,66 x 10 <sup>9</sup>
	46		1,4 x 10 <sup>9</sup>	
	54		2,2 x 10 <sup>9</sup>	
<i>B. thuringiensis aizawai</i>	46	45	1,9 x 10 <sup>9</sup>	1,46 x 10 <sup>9</sup>
	48		1,4 x 10 <sup>9</sup>	
	43		1,1 x 10 <sup>9</sup>	
<i>B. subtilis</i>	50	51,6	1,9 x 10 <sup>9</sup>	4,66 x 10 <sup>9</sup>
	54		4,7 x 10 <sup>9</sup>	
	51		7,4 x 10 <sup>9</sup>	
<i>B. velezensis</i>	51	50,5	1,5 x 10 <sup>9</sup>	1,7 x 10 <sup>9</sup>
	49		1,4 x 10 <sup>9</sup>	
	52		2,3 x 10 <sup>9</sup>	
<i>B. pumilus</i>	68	66,3	6,5 x 10 <sup>9</sup>	6,26 x 10 <sup>9</sup>
	72		6,6 x 10 <sup>9</sup>	
	59		5,7 x 10 <sup>9</sup>	
<i>B. licheniformis</i>	71	59,3	1,28 x 10 <sup>9</sup>	1,2 x 10 <sup>9</sup>
	56		1,25 x 10 <sup>9</sup>	
	51		1,07 x 10 <sup>9</sup>	

## Etapa 2- Produção em grande escala na Agrosalgueiro

Na tabela 2 estão descritos os microrganismos, tempo de fermentação até a esporulação de 95% e rendimento em esporos por mL, em fermentador de 1.000 litros na Agrosalgueiro. Nesse caso, o tempo médio que os microrganismos levaram para atingir 95% de esporulação variou entre 50 e 75 horas, levemente superior ao necessário no fermentador de 100 litros. A quantidade de esporos/mL variou de  $2 \times 10^9$  até  $6,7 \times 10^9$ , superior ao obtido no fermentador de 100 litros para todos os microrganismos. Essa variação obtida na escala maior também é relatada por outras empresas produtoras de bioinseticidas. Todas as amostras foram submetidas ao controle de qualidade e não houve nenhuma contaminação com microrganismos nocivos.

**Tabela 2.** Microrganismos, tempo de fermentação até a esporulação de 95% e rendimento em esporos por mL em fermentador de 1.000 L.

Microrganismo	Tempo, em horas, de fermentação até a esporulação de 95%	Média do tempo, em horas, de fermentação até a esporulação de 95%	Esporos por mL	Média do número de esporos por mL
<i>Bacillus thuringiensis kurstaki</i>	47	50	$1,4 \times 10^9$	$2,36 \times 10^9$
	54		$1,7 \times 10^9$	
	48		$4,0 \times 10^9$	
<i>B. thuringiensis aizawai</i>	57	57	$1,1 \times 10^9$	$2 \times 10^9$
	53		$2,7 \times 10^9$	
	61		$2,4 \times 10^9$	

Continua...

**Tabela 2.** Continuação.

Microrganismo	Tempo, em horas, de fermentação até a esporulação de 95%	Média do tempo, em horas, de fermentação até a esporulação de 95%	Esporos por mL	Média do número de esporos por mL
<i>B. subtilis</i>	54	51	4,7 x 10 <sup>9</sup>	6,7 x 10 <sup>9</sup>
	50		6,8 x 10 <sup>9</sup>	
	49		8,8 x 10 <sup>9</sup>	
<i>B. velezensis</i>	69	59	1,0 x 10 <sup>9</sup>	2,6 x 10 <sup>9</sup>
	60		4,0 x 10 <sup>9</sup>	
	48		3,0 x 10 <sup>9</sup>	
<i>B. pumilus</i>	68	75	6,5 x 10 <sup>9</sup>	6,3 x 10 <sup>9</sup>
	85		5,8 x 10 <sup>9</sup>	
	72		6,6 x 10 <sup>9</sup>	
<i>B. licheniformis</i>	61	53,6	4,6 x 10 <sup>9</sup>	3,2 x 10 <sup>9</sup>
	52		2,6 x 10 <sup>9</sup>	
	48		2,4 x 10 <sup>9</sup>	

### Etapa 3- Controle de qualidade dos caldos fermentados na Agrosalgueiro e Embrapa

Como pode ser visto na Tabela 3, o número de esporos por mL obtidos nas fermentações não diferiu nas análises das fermentações realizadas na

Agrosalgueiro e na Embrapa, indicando que as amostras estão com quantidades desejáveis de esporos, dentro dos valores sugeridos pela especificação de referência (Brasil, 2022) e que a produção foi realizada da forma satisfatória. Além disso, o controle de qualidade referente à presença de contaminantes também apresentou resultados satisfatórios, comprovando que nas amostras não haviam microrganismos patogênicos.

**Tabela 3.** Microrganismo, rendimento na Embrapa e na Agrosalgueiro em esporos por mL e presença de contaminantes

Microrganismo	Esporos por mL		Presença de Contaminantes	
	Agrosalgueiro	Embrapa	Agrosalgueiro	Embrapa
<i>Bacillus thuringiensis kurstaki</i>	1,7 x 10 <sup>9</sup>	1,5 x 10 <sup>9</sup>	negativo	negativo
<i>B. thuringiensis aizawai</i>	2,7 x 10 <sup>9</sup>	3,0 x 10 <sup>9</sup>	negativo	negativo
<i>B. subtilis</i>	6,8 x 10 <sup>9</sup>	6,3 x 10 <sup>9</sup>	negativo	negativo
<i>B. velezensis</i>	4,0 x 10 <sup>9</sup>	4,0 x 10 <sup>9</sup>	negativo	negativo
<i>B. pumilus</i>	6,0 x 10 <sup>9</sup>	6,6 x 10 <sup>9</sup>	negativo	negativo
<i>B. licheniformis</i>	2,4 x 10 <sup>9</sup>	2,8 x 10 <sup>9</sup>	negativo	negativo

## Conclusão

A partir dos resultados obtidos, é possível concluir que a produção na propriedade (“on farm”), quando seguidas as metodologias sugeridas no manual para a produção de bactérias do gênero *Bacillus* publicado pela Embrapa, pode gerar produtos de qualidade, livre de contaminantes e com concentração adequada de esporos.

## Referências

- BORRIS, R. *Bacillus*, plant beneficial bacterium. In: LUGTENBERG, B. (Ed.) **Principles of plant-microbe interactions: microbes for sustainable agriculture**. Berlin: Springer, 2015. p. 379–391.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Especificações de referência, 2022**. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/produtos-fitossanitarios/especificacao-de-referencia>. Acesso em: janeiro de 2023.
- CONNOR, D. J.; LOOMIS, R. S.; CASSMAN, K. G. **Crop ecology: productivity and management in agricultural systems**. 2.ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2011. 576 p.
- EMBRAPA. **Visão 2030: o futuro da agricultura brasileira**. – Brasília, DF: Embrapa, 2018. 212 p.
- HERNÁNDEZ-ROSAS, F.; FIGUEROA-RODRÍGUEZ, K. A.; GARCÍA-PACHECO, L. A.; VELASCO-VELASCO, J.; SANGERMAN-JARQUÍN, D. M. **Microorganisms and biological pest control: an analysis based on a bibliometric review**. *Agronomy*, v. 10, n. 11, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy10111808>.
- KHAN, S.; UDDIN, M. N.; RIZWAN, M.; KHAN, W.; FAROOQ, M.; SHAH, A. B.; SUBHAN, F.; AZIZ, F.; RAHMAN K. U.; KHAN, A.; ALI, S.; MUHAMMAD. **Mechanism of insecticide resistance in insects/pests**. *Polish Journal of Environmental Studies*, v. 29, p. 2023-2030, 2020.
- KUMAR, A.; PRAKASH, A.; JOHRI, B. N. *Bacillus* as PGPR in crop ecosystem. In: **Bacteria in agrobiolgy: crop ecosystems**. Berlin: Springer, 2011. p. 37-59.
- MONNERAT, R.; PRAÇA, L. B.; SILVA, E. Y. Y.; MONTALVÃO, S.; MARTINS, E.; SOARES, C. M.; 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. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 360).
- MONNERAT, R.; MONTALVÃO, S. C. L.; MARTINS, E. S.; QUEIROZ, P. R.; SILVA, E. Y. Y. DA.; GARCIA, A. R. M.; CASTRO, M. T. DE.; ROCHA, G. T.; FERREIRA, A. D. C. DE L.; GOMES, A. C. M. M. **Manual de produção e controle de qualidade de produtos biológicos à base de bactérias do gênero *Bacillus* para uso na agricultura**. Brasília, DF: 2020. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia / Documentos, 369).
- SANSINENEA, E. Applications and patents of *Bacillus* spp. in Agriculture. In: SINGH, H.; KESWANI, C.; SINGH, S. (Eds). **Intellectual property issues in microbiology**. Singapore: Springer, 2019. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-981-13-7466-1\\_8](https://doi.org/10.1007/978-981-13-7466-1_8)
- 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).

Exemplares desta edição  
podem ser adquiridos na:

**Embrapa Recursos Genéticos e  
Biotecnologia**

Parque Estação Biológica – PqEB  
Av. W5 Norte (final)  
CEP: 70770-917 Brasília, DF  
Fone: número(s) de telefones  
Fone: (61) 3448-4700 / 3448-4739  
www.embrapa.br  
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

**1ª edição**

1ª impressão (2023): tiragem



MINISTÉRIO DA  
AGRICULTURA E  
PECUÁRIA



Comitê Local de Publicações  
da Unidade Responsável

Presidente

*Marcelo Lopes da Silva*

Secretário-Executivo

*Ana Flávia do Nascimento Dias*

Membros

*Andrielle Câmara Amaral Lopes; Bruno*

*Machado Teles Walter; Débora Pires Paula*

*Edson Junqueira Leite; Marcos Aparecido*

*Gimenes; Solange Carvalho Barrios Roveri*

*José*

Supervisão editorial

*Ana Flávia N. Dias*

Normalização bibliográfica

*Rosameres Rocha Galvão (1/2122)*

Fotos da capa

*Rose Monnerat*

Projeto gráfico da coleção

*Carlos Eduardo Felice Barbeiro*

Editoração eletrônica

*Paula Cristina Rodrigues Franco*

CGPE 018025