CONASUST
CONGRESSO NACIONAL DE SUSTENTABILIDADE ON-LINE

PRODUÇÃO *ON FARM* DE *BACILLUS THURINGIENSIS:* UMA ALTERNATIVA PARA A AGRICULTURA SUSTENTÁVEL

MATEUS FERNANDES MATOS; LEANDRO ISRAEL DA SILVA

RESUMO

A agricultura é um dos pilares para a constituição da sociedade, visto que é a atividade responsável por a saciar a fome do crescente número de habitantes do planeta. Contudo, as práticas agrícolas convencionais apresentam uma extrema dependência na utilização de insumos químicos. Os pesticidas, por exemplo, podem acarretar problemas ambientais irreversíveis, como a seleção de pragas resistentes. Desta maneira, métodos sustentáveis e economicamente viáveis se fazem cada vez mais necessários. Recentemente a prospecção de biodefensivos *on farm* constitui uma alternativa muito interessante para os produtores, onde microrganismos como *Bacillus thuringiensis* (produtor da endotoxina Cry) são produzidos a baixo custo e são utilizados como agentes de controle biológico. Neste sentido, o objetivo deste estudo é analisar a qualidade de bioinoculantes a base de *B. thuringiensis* produzidos *on farm* em 21 propriedades, considerando a concentração bacteriana do inóculo multiplicado. Para tanto, foi realizada a análise da batelada de 57 amostras, onde a concentração de unidades formadoras de colônias por mL foi obtida a partir de diluição seriada. Os resultados demonstram que 32 amostras obtiveram valores acima ao padrão comercial (1×10^9), correspondendo a uma taxa de sucesso de 56.14%. Além disso, os inóculos acima do valor padrão chegam a ser 9.13×10^{11} maiores quando comparados aos valores das amostras abaixo do padrão. Este estudo demonstra a capacidade, qualidade e autonomia que os agricultores tem na produção de biodenfensivos *on farm*. Ao mesmo tempo, demonstra a importância da realização de análises de qualidade para validar o produto. Por fim, é necessário cobrar novas leis e a disseminação de informações que beneficiem a produção *on farm* no país, pois a produção de bioinsumos é muito promissora para a diminuição da dependência dos insumos químicos.

Palavras-chave: Bioidefensivos, Controle Biológico, Bt, UFC/ml.

1 INTRODUÇÃO

A produção agrícola é uma atividade indispensável para a sociedade, principalmente mediante ao ascendente aumento da população global (VIANA et al., 2022). O Brasil é um país onde a agricultura é predominantemente responsável pela maior parte da economia, dados do Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (LSPA) apresentados pelo IBGE indicam que a produção agrícola de 2022 (algodão, amendoim, arroz, feijão, milho e soja) foi de 164 280 799 toneladas (t) e para 2023 é estimada uma produção de 194 916 850 t.

Em virtude deste aumento produtivo são necessárias alternativas sustentáveis que estejam em consonância a preservação dos recursos naturais e ao desenvolvimento econômico, visto que estão entre os objetivos do desenvolvimento sustentável a fome zero e agricultura sustentável, saúde e bem estar, o consumo e produção sustentáveis e a valorização da vida terrestre (MURILLO-CUEVAS et al., 2019; IPEA, 2023). Entretanto atualmente é vista uma

DOI: 10.51189/conasust/14331

polarização no uso de defensivos químicos, historicamente esta aplicação é realizada de maneira indiscriminada, devido principalmente ao imediatismo que o produtor deseja na defesa de sua cultura. Entretanto, isto implica em impactos severos nas condições ecossistêmicas, prejudicando a qualidade no solo, água, da biota natural e até para a saúde do trabalhador e consumidor (PIGNATI, 2018).

Mundialmente são aplicados cerca de 2 milhões de toneladas de pesticidas, sendo 47% herbicidas, 29.5% inseticidas, 17.5% fungicidas e 5.5% agindo em outros vetores. (ZHANG, 2018). De acordo com a FAOSTAT (2023) entre 1990 e 2020 o Brasil foi o terceiro país que mais utilizou de pesticidas (231,6 t) atrás da China (262,7 t) e dos Estados Unidos (406,8 t).

Pimentel (2005) estimou os custos desprendidos nos Estados Unidos para arcar com a recuperação dos impactos dos pesticidas na sociedade, considerando diversas vertentes ambientais e socias. Foi visto que foram gastos por ano US$ 9645 milhões dos quais de maneira mais significativa são arcados US$ 2160 milhões nas perdas de pássaros, US$ 2000 milhões relativos à contaminação do solo e água, US$ 1500 milhões para cobrir custos provenientes da resistência de pragas aos pesticidas, US$ 1140 milhões utilizados para cobrir os impactos na saúde pública, US$ 520 milhões arcados devido a perda de inimigos naturais e US$ 334 milhões em perdas de abelhas e outros polinizadores. Além disso, as contaminações com agrodefensivos persistem por muito tempo no ambiente e podem ser bioacumuladas e biomagnificadas nos seres vivos o que acarretam efeitos toxicológicos ainda mais delicados (SRIVASTAVA et al, 2020).

De maneira mais crucial, o uso de pesticidas promove a seleção de pragas no ambiente e existem diversas pesquisas que reportam esses eventos (ZHANG & YANG, 2021; Miller et al., 2022; Wang et al., 2022). Bourguet e Guillemaud, (2016) afirmam que já foram relatados mais de 10000 casos de resistência a 300 tipos diferentes de inseticidas em artrópodes e 300 casos de resistência a 30 fungicidas diferentes por parte de fungos fitopatogênicos. O que impressiona nestes casos é a quantidade de espécies que conseguiram se adaptar e desenvolver resistência, onde nos dois casos mais de 200 espécies sobrevivem a aplicação dos pesticidas.

Mediante a tais fatos, nota-se que a aplicação desenfreada de defensivos agrícolas proporciona prejuízos ecológicos, econômicos e sociais. Sendo assim, é necessária a prospecção de novos métodos, produtos e tecnologias sustentáveis que viabilizem a redução de uma parcela significativa dos agroquímicos.

O decreto nº 10.375, de 26 de maio de 2020 instituiu o Programa Nacional de Bioinsumos e o Conselho Estratégico do Programa Nacional de Bioinsumos os quais foram medidas fundamentais para estimular o desenvolvimento de produtos biológicos. A utilização de parasitóides, entomopatógenos e predadores como agentes de controle biológico tem sido alternativas em contraste aos produtos químicos, e que agem a partir de princípios ecológicos, ou seja, a partir da competição e antagonismo que as espécies exercem naturalmente entre si, desta maneira a especificidade, a baixa contaminação do ambiente e sobretudo o não favorecimento da seleção de organismos resistentes são pontos positivos dos bioinoculantes (GABARDO et al., 2021).

Deste modo, atualmente a produção de microrganismos inoculantes "*on farm*" está sendo bastante difundida no Brasil. Os produtores são suportados pela lei dos orgânicos, decreto nº 6.913, de 2009, que estabelece que "ficam isentos de registro os produtos fitossanitários com uso aprovado para a agricultura orgânica produzidos na fazenda exclusivamente para uso próprio". Além de ser uma tecnologia sustentável e convencional a produção de microrganismos é econômica, onde em comparação aos defensivos químicos geram uma economia de valores em até 90% (SANTOS, 2020).

Dentre os microrganismos prospectados nas fazendas o gênero *Bacillus* é um dos que mais se destaca, especialmente a espécie *Bacillus thuringiensis*. A biotecnologia Bt é muito utilizada no controle de diversos insetos praga com representantes das ordens Lepidoptera,

DOI: 10.51189/conasust/14331

Diptera, Coleoptera, Hymenoptera, além de ácaros, nematoides e protozoários (SCHNEPF et al., 1998). Atualmente ele é o inseticida microbiano com maior êxito na proteção de florestas, grãos e no controle de insetos vetores de doenças (CAPALHO, et al., 2005). Isto ocorre devido as proteínas Cry, δ-endotoxinas que a bactéria libera durante sua esporulação capazes de eliminar larvas de insetos suscetíveis que as ingerem, causando danos ao assoalho intestinal e posteriormente limitando a alimentação, culminando em sua morte (HECKEL, 2020).

Sendo assim, a produção de biodenfesivos *on farm* representa uma alternativa ecologicamente sustentável e economicamente viável, que beneficia principalmente o pequeno/médio produtor. Entretanto a qualidade destes produtos deve ser monitorada evitando a baixa qualidade dos produtos (baixo concentração de inóculo e pH prejudicial a culturas) e principalmente a disseminação de microrganismos contaminantes.

O objetivo deste estudo é analisar a qualidade de bioinoculantes a base de *B. thuringiensis* produzidos *on farm* em diversas propriedades, analisando a concentração bacteriana do inóculo multiplicado. O presente trabalho demonstra a capacidade e autonomia de agricultores na produção de uma tecnologia verde e demonstra a importância do monitoramento de qualidade destes produtos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Triagem do material e preparo das amostras

No total 57 amostras originárias de 21 propriedades diferentes foram examinadas. As análises foram realizadas pelo Labóratorio de Fitossanidade da Coopacer (São Gotardo - MG), sendo a coleta de responsabilidade dos solicitantes da empresa. A qualidade microbiológica das bateladas produzidas *on farm* foi avaliada, sendo submetidas a testes para identificação e contagem de *B. thuringiensis* (os dados de origem serão mantidos em sigilo preservando a descrição e compromisso da Coopacer junto a seus clientes).

2.2 Contagem das Unidades Formadoras de Colônia

Para quantificar a concentração de *B. thuringiensis* as amostras foram transferidas e homogeneizadas em um frasco reagente, onde foram retirados 10 mL do caldo em batelada adicionados a 90 mL de solução salina + Tween 80 (polissorbato 80, monooleato de polioxietileno sorbitano: surfactante não iônico) concentrado autoclavado. Em seguida as amostras foram postas em mesa agitadora por 15 minutos a 50 rpm e após agitadas por mais 15 minutos em aproximadamente 50% (velocidade) após a agitação da amostra levá-la para o banho de ultrassônico por aproximadamente 5 minutos.

Após esse pré-preparo foi realizada a diluição seriada em tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina + Tween 80. Foram plaqueados em meio de cultura ágar nutriente 100 µL de diluições entre 10^{-6} e 10^{-11}. Posteriormente os tubos de ensaio foram postos em banho maria a 80°C por 15 minutos e depois sofrem um choque térmico de 5 minutos em gelo e novamente 100 µL microlitros das diluições 10^{-5}, 10^{-6} e 10^{-8} foram plaqueados (MONNERAT et al., 2020). As placas foram incubadas a 30 ± 2ºC por 72 horas. Foi realizada a contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em placas onde o número de colônias contabilizado estava entre 30 e 300. As colônias foram analisadas microscopicamente a fim de se constatar a presença dos cristais Cry confirmando a presença de *B.thuringiensis*.

Por fim, a concentração dos inóculos contabilizados foi determinada como satisfatória quando os valores foram iguais ou superiores a 1×10^9 UFC/mL esta concentração é considerada padrão em diversos trabalhos e em recomendações de qualidade sugeridas pelas instituições reguladoras (EL-BENDARY, 2006; BRASIL, 2011; MONNERAT et al., 2020).

DOI: 10.51189/conasust/14331

2.2 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram conduzidas no software Rstudio. A normalidade dos resíduos e homogeneidade da variância dos dados foram checados pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene respectivamente. Além disso, foi realizado o teste t de Welch para duas amostras, verificando se as diferenças das médias entre os dados analisados foram significativas. Os gráficos foram plotados no software SigmaPlot 12.0 e no Excel.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Concentração de *B.thuringiensis* nas amostras

Conforme a Figura 1, a contagem das UFC/mL demonstrou que das 57 amostras 32 obtiveram valores acima ao padrão, correspondendo então a uma taxa de sucesso equivalente a 56.14%.

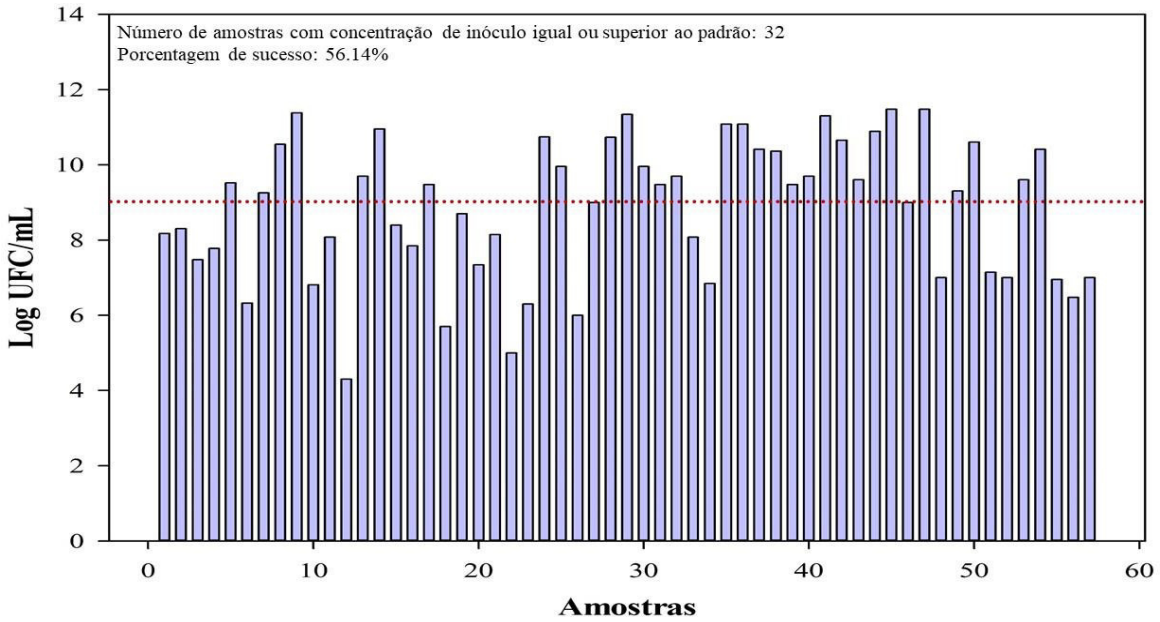

Figura 1: Concentração de *B. thuringiensis* nas amostras analisadas. A linha vermelha demonstra as amostras que foram iguais ou superiores ao padrão (9 Log UFC/mL, 1×10^9 UFC/mL).

A estimulação e o desenvolvimento da autonomia do agricultor na produção de biodefensivos é o primeiro passo para se iniciar uma agricultura sustentável baseada em princípios ecológicos. Os resultados apresentados demonstram que a maior parte das amostras apresentam inoculantes de qualidade, sobretudo com uma grande concentração de inóculo e livres de contaminantes.

Desta maneira, os produtores estão aptos a utilizar seus produtos para o controle de pragas em suas propriedades, o que favorece a redução de insumos químicos ou cria sistemas de defesa mistos com parcelas químicas e biológicas. Bartels e Hutchison (1995) observaram que a combinação de *B. thuringiensis* + permetrina em doses baixas reduziu o uso de inseticidas sintéticos em 66%.

Contudo, a segurança na produção e contaminação dos inoculantes deve ser frequentemente monitorada. Lana et al. (2019), analisaram sistemas de produção de *B. thuringiensis on farm* em propriedades no estado de Goiás. Os autores verificaram com base no

DOI: 10.51189/conasust/14331

gene 16S que 97.5% das amostras estudadas não foram identificadas como o bacilo de interesse. As espécies mais frequentes como contaminantes foram *Enterococcus faecium* e *E. faecalis* as quais tem potencial patogênico para humanos e outros animais. Justamente por isso, os autores alertam dos perigos que o não monitoramento de produtos pode causar.

A média da concentração de inóculos entre as amostras indica que os inóculos acima do valor padrão (S) chegam a ter uma concentração de unidades formadoras de colônias 9.13×10^{11} maiores que as amostras abaixo do padrão (I). Ademais, existe uma diferença significativa entre essas médias, onde também o desvio padrão de S é menor que os observados em I. Tais dados podem ser consultados na Figura 2.

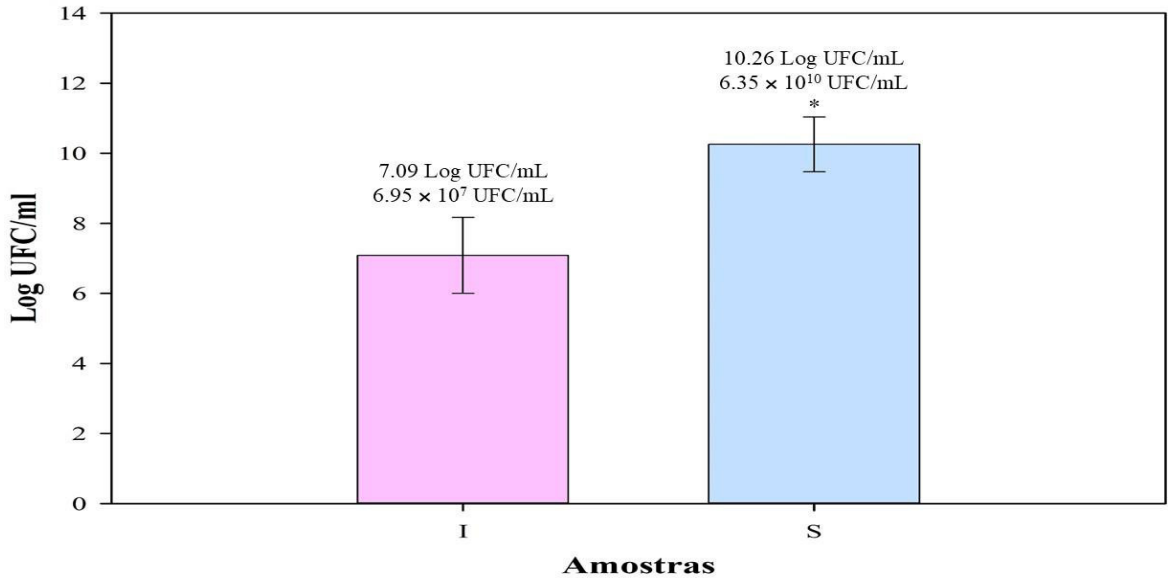

Figura 2: Comparação entre a concentração média de *B. thuringiensis* nas amostras analisadas. I: amostras inferiores ao padrão, S: amostras superiores ao padrão. Padrão: 9 Log UFC/mL, 1×10^9 UFC/mL. O asterisco (*) representa a significância do teste t de Welch para duas amostras ($p \leq 0.01$) para a média dos dados.

A concentração do inóculo é algo muito importante, pois está diretamente relacionada com os princípios de defesa microbianos. Deste modo, quanto maior a quantidade de UFC maior será a produção de proteínas Cry e consequentemente maior será a atividade de controle biológico. Legwaila et al. (2015) verificaram a eficiência de diferentes dosagens de *B. thuringiensi*s (var. kurstaki) no controle de *Plutella xylostella* em repolho. Foram testadas concentrações de bacilos em 0, 2, 4, 6, 8 e 10g/L. Os autores verificaram uma diminuição da severidade dos danos causados as folhas da hortaliça por planta, mediante ao aumento das dosagens, onde a média "buracos" nas folhas foi de 81.3, 46.0, 40.7, 14.3, 12.7 e 3.3 respectivamente as dosagens citadas anteriormente. Além disso, os autores sugerem que quanto maior o tempo de exposição do biodefensivo, maior será o sucesso no controle sendo possível obter controles relativos a 90-100% na mortalidade de ovos e larvas.

4 CONCLUSÃO

Este estudo demonstra como a produção *on farm* é uma alternativa economicamente viável e ecologicamente sustentável que beneficia o produtor e contribui para a redução da dependência de defensivos químicos. Ao mesmo tempo, demonstra como a análise de qualidade é importante para validar a produção, resguardando da propagação de microrganismos

DOI: 10.51189/conasust/14331

contaminantes e de inóculos pouco concentrados.

Nossos resultados apontam que a maior parte das amostras analisadas tem qualidade satisfatória e está livre de contaminação, o que sugere que o produtor tem capacidade e estrutura para produzir seus próprios defensivos agrícolas.

A adoção e popularização da formulação de bioinoculantes *on farm* estimula a cooperação entre os produtores onde eles podem compartilhar formulações, microrganismos, e até mesmo resultados e experiências. Dessa maneira se desenvolve uma rede de conscientização que beneficia tanto aos produtores, quanto o meio ambiente.

Além disso, é necessário sempre reforçar e persistir no monitoramento e elaboração de medidas que beneficiem a produção *on farm*. Desta maneira, podem ser produzidas novas tecnologias, pode haver a divulgação de métodos e palestras, ou até mesmo a elaboração de novos decretos que salvaguardem os produtores além de orientar melhor os padrões adequados de produção principalmente para o Bt.

REFERÊNCIAS

BARTELS, D. W.; HUTCHISON, W. D. On-Farm Efficacy of Aerially Applied *Bacillus thuringiensis* for European Corn Borer (Lepidoptera: Pyralidae) and Corn Earworm (Lepidoptera: Noctuidae) Control in Sweet Corn. Journal of Economic Entomology, v. 88, p. 380–386, 1995.

CAPALHO, D. M. F.; VILAS-BOAS, G. T.; ARANTES, O. M. N.; SUZUKI, M. T. *Bacillus thuringiensis*. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, nº 32, p. 78-86, 2005.

CLÁUDIA, M. V.; DULCE, F.; PATRÍCIA, A.; JORGE, R.; PAULO P. Agricultural land systems importance for supporting food security and sustainable development goals: A systematic review. Science of The Total Environment, v. 806, Part 3, 2022.

EL-BENDARY, M. A. *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* biopesticides production. Journal of Basic Microbiology, v. 46(2), p.158-170, 2006.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAOSTAT. Total Pesticides Use. Fao. Disponível em: < http://www.fao.org/faostat/en/#data/RP/visualize.> Acesso em: 05 de jan. 2023.

HECKEL, D. G. How do toxins from *Bacillus thuringiensis* kill insects? An evolutionary perspective. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, v. 104(2), 2020.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. LSPA. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Disponível em:< https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9201- levantamento-sistematico-da-producao-agricola.html?=&t=resultados. > Acesso em: 05 de jan. 2023.

INSTITUTO DE PESQUISA ECONÔMICA APLICADA. Objetivos de Desenvolvimento Sustentável. Ipea. Disponível em: https://www.ipea.gov.br/ods/index.html. Acesso em: 5 jan. 2023.

LANA, U. G. de P.; TAVARES, A. N. G.; AGUIAR, F. M.; GOMES, E. A.; VALICENTE, F. H. Avaliação da qualidade de biopesticidas à base de *Bacillus thuringiensis* produzidos em sistema "on farm". Embrapa Milho e Sorgo. 2019.

LEGWAILA, M. M.; MUNTHALI, D.C.; KWEREPE, B. C.; OBOPILE, M. Efficacy of *Bacillus thuringiensis* (var. kurstaki) Against Diamondback Moth (*Plutella xylostella* L.) Eggs and Larvae on Cabbage Under Semi-Controlled Greenhouse Conditions. Int J Insect Sci. 2015.

MILLER, S. A.; FERREIRA, J.P.; LEJEUNE, J. T. Antimicrobial Use and Resistance in Plant Agriculture: A One Health Perspective. Agriculture, v. 12, p. 289, 2023.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº. 13, de 24 de março de 2011. Gov. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/fertilizantes/legislacao/in-sda-13-de-24-03-2011-inoculantes.pdf>. Acesso em: 05 de jan. 2023.

MONNERAT, R.; MONTALVÃO, S.; MARTINS, E.; QUEIROZ, P.; SILVA, E.; GARCIA, A.; TAVARES, C. M.; ROCHA, G.; FERREIRA, A.; GOMES, A. Manual de produção e controle de qualidade de produtos biológicos à base de bactérias do gênero Bacillus para uso na agricultura, v. 369, p. 1-46, 2020.

MURILLO-CUEVAS, F. D.; ADAME-GARCÍA, J.; CABRERA-MIRELES, H.; FERNÁNDEZVIVEROS, J. A. Fauna y microflora edáfica asociada a diferentes usos de suelo. Ecosistemas y Recursos Agropecuarios, v. 6, p. 23-33, 2019.

PIGNATI, W. Uso de agrotóxicos no brasil: perspectiva da saúde do trabalhador e ambiental. Rev Bras Med Trab. v. 16(0), p. 37, 2018.

PIMENTEL, D. 'Environmental and Economic Costs of the Application of Pesticides Primarily in the United States'. Environ Dev Sustain, v. 7, p. 229–252, 2005.

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.429-443, 2020.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; RIE, J.V.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D.R.; DEAN, D.H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiology and Molecular Biology Review, Washington, v. 62, p. 775-806, 1998.

SRIVASTAVA, P. K.; SINGH, V. P.; SINGH, A.; TRIPATHI, D. K.; SINGH, S., PRASAD S. M.; CHAUHAN, D. K. Pesticides in Crop Production. Hoboken -NJ John Wiley & Sons, Inc. p. 55-63, 2020.

WANG, Z.; WANG, W.; & LU, Y. Biodegradation of insecticides by gut bacteria isolated from stored grain beetles and its implication in host insecticide resistance. Journal of Stored Products Research, v. 96, 101943. 2022.

ZHANG, J. J.; YANG, H. Metabolism and detoxification of pesticides in plants. Science of The Total Environment, v. 790, 2023.

ZHANG, W. Global pesticide use: profile, trend, cost/ben-efit and more. Proc Int Acad Ecol Environ Sci., v. 8(1), p. 1–27, 2018.