

ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DE BIONSUMOS MULTIPLICADOS A PARTIR DE BACILLUS E TRICHODERMA EM BIOFÁBRICAS NA REGIÃO DE CURITIBANOS – SC

MICROBIOLOGICAL ANALYSES OF BIO-INPUTS PROPAGATED FROM BACILLUS AND TRICHODERMA IN BIOFABRICS AT THE REGION OF CURITIBANOS – SC

Estela Kovalski¹
Emerson Gabriel Cardoso dos Passos²
Julia dos Santos Ganen³
Marco Antonio Nogueira⁴
Mariangela Hungria da Cunha⁵
Sonia Purin da Cruz⁶

RESUMO

O desenvolvimento do agronegócio brasileiro tem sido cada vez mais pautado no uso de microrganismos na agricultura. Com a crescente demanda por produtos biológicos, muitos agricultores passaram a multiplicar bactérias e fungos em suas propriedades em biofábricas, em um sistema conhecido como *on farm*. Entretanto, essas instalações são comumente desprovidas de qualquer controle sanitário e isso resulta em baixíssima multiplicação do microrganismo alvo e predominância de contaminantes. Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi analisar a qualidade de produtos multiplicados a partir de produtos à base de *Bacillus* e *Trichoderma* na região de Curitiba – SC. As análises compreenderam aspectos de pH, coloração e quantificação de microrganismos multiplicados, tanto os provenientes do produto original como os contaminantes, com base em características morfológicas das colônias. A maior parte das amostras não apresentava o microrganismo que os produtores desejavam propagar, e todas as amostras analisadas apresentavam microrganismos contaminantes. Os dados revelam que a multiplicação a partir das

¹Acadêmica do curso de Agronomia. Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Curitiba – Departamento de Ciências Naturais e Sociais. Curitiba, Santa Catarina. Brasil. E-mail: estelakovalski123@gmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-6080-3646>

²Acadêmico do curso de Agronomia. Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Curitiba – Departamento de Ciências Naturais e Sociais. Curitiba, Santa Catarina. Brasil. E-mail: emersongabrielcardoso2002@gmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0009-0008-1414-1636>

³Acadêmica do curso de Agronomia. Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Curitiba – Departamento de Ciências Naturais e Sociais. Curitiba, Santa Catarina. Brasil. E-mail: julia.ganen@gmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-7697-8155>

⁴Doutorado em Agronomia (Solos e Nutrição de Plantas). EMBRAPA Soja. Londrina, Paraná. Brasil. E-mail: marco.nogueira@embrapa.br. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7747-9839>

⁵Doutorado em Agronomia (Ciência do Solo). EMBRAPA Soja – Londrina. Paraná. Brasil. E-mail: mariangela.hungria@embrapa.br. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5132-8685>

⁶Ph.D. em Ciência do Solo. Professora de Microbiologia. Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Curitiba – Departamento de Ciências Naturais e Sociais. Curitiba, Santa Catarina. Brasil. E-mail: s.purin@ufsc.br. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7805-2789>

biofábricas não foi eficiente para gerar bioinsumos com qualidade e concentração adequada. Esses microrganismos multiplicados, se utilizados em áreas agrícolas, contaminarão o solo, plantas e, possivelmente, recursos hídricos, e representam um considerável risco para a saúde ambiental, bem como humana.

Palavras-chave: inoculantes; sistema on farm; controle biológico.

ABSTRACT

The development of Brazilian agribusiness has increasingly relied on the use of microorganisms in agriculture. With the growing demand for biologic products, many farmers began to multiply bacteria and fungi on their properties in biofactories, in a system known as *on farm*. However, these facilities lack of any sanitary control and this results in very low multiplication of the target microorganism and predominance of contaminants. In this context, the goal of the present work was to analyze the quality of products multiplied from *Bacillus* and *Trichoderma*-based products in the region of Curitiba – SC. The analyses included aspects of pH, coloring and quantification of multiplied microorganisms, both those originating from the original product and contaminants, based on morphological characteristics of the colonies. Most of the samples did not present the microorganism that the producers wanted to propagate, and all samples analyzed presented contaminating microorganisms. Data reveal that multiplication from biofactories was not efficient in generating bioinputs with adequate quality and concentration. Those multiplied microorganisms, if used in agricultural areas, will contaminate soil, plants and possibly water resources, and pose a considerable risk to environmental as well as human health.

Key words: inoculants; on-farm system; biological control.

Artigo recebido em: 22/12/2023

Artigo aprovado em: 10/09/2024

Artigo publicado em: 21/10/2024

Doi: <https://doi.org/10.24302/sma.v.13.5135>

INTRODUÇÃO

Na agricultura, o uso de produtos à base de microrganismos cresceu exponencialmente em todo o mundo nas últimas décadas, e no Brasil o crescimento é ainda mais significativo¹. O país é referência mundial no uso de microrganismos fixadores de nitrogênio do gênero *Bradyrhizobium*, que substituem completamente o uso de fertilizantes nitrogenados na produção da soja, o representa uma redução drástica no custo da produção e também evita problemas ambientais como eutrofização e produção de gases de efeito estufa¹⁻³. O uso de *Azospirillum* brasileiro no cultivo do milho também se expandiu em todo o Brasil, permitindo a redução da adubação nitrogenada em 25%⁴⁻⁶.

Paralelamente ao sucesso do uso de microrganismos promotores de crescimento vegetal, houve o crescente uso de bactérias e fungos do gênero *Bacillus* e *Trichoderma*, que podem ser usados para melhorar a nutrição das plantas e também ser aplicados como agentes de controle biológico⁷⁻¹⁰. Esse último aspecto tem sido bastante valorizado pelos produtores, visto que o uso de microrganismos diminui significativamente ou até mesmo elimina o uso de agrotóxicos, que causam inúmeros prejuízos para a qualidade do solo, água, e, acima de tudo, para a saúde humana e animal¹¹⁻¹³.

A legislação brasileira determina que o cultivo e a comercialização de produtos microbiológicos sejam feitos por empresas devidamente registradas e regulamentadas perante o Ministério da Agricultura¹⁴⁻¹⁵. Porém, ao longo dos últimos anos observa-se uma tendência de uso de um sistema de multiplicação conhecido como *on farm*, em biofábricas¹⁶. A base do sistema é que os produtores adquirem produtos comerciais e os utilizem como fonte de inóculo para propagação de microrganismos, o que é proibido por lei. O processo de multiplicação é feito em caixas d'água, baldes e tanques sem qualquer condição de higiene ou assepsia, na grande maioria dos casos¹⁷.

Esse sistema tem se difundido pelo Brasil, como uma facilidade para os produtores rurais que alegam ter autonomia na produção de seu próprio bioinsumo. Entretanto, gravíssimos problemas, principalmente de concentração, pureza e inclusive questões sanitárias, foram relatadas em trabalhos já publicados onde foram identificados patógenos resistentes a antibióticos^{16, 18-20}. Esses aspectos podem colocar em risco tanto a saúde de quem está manipulando esses microrganismos como do consumidor final.

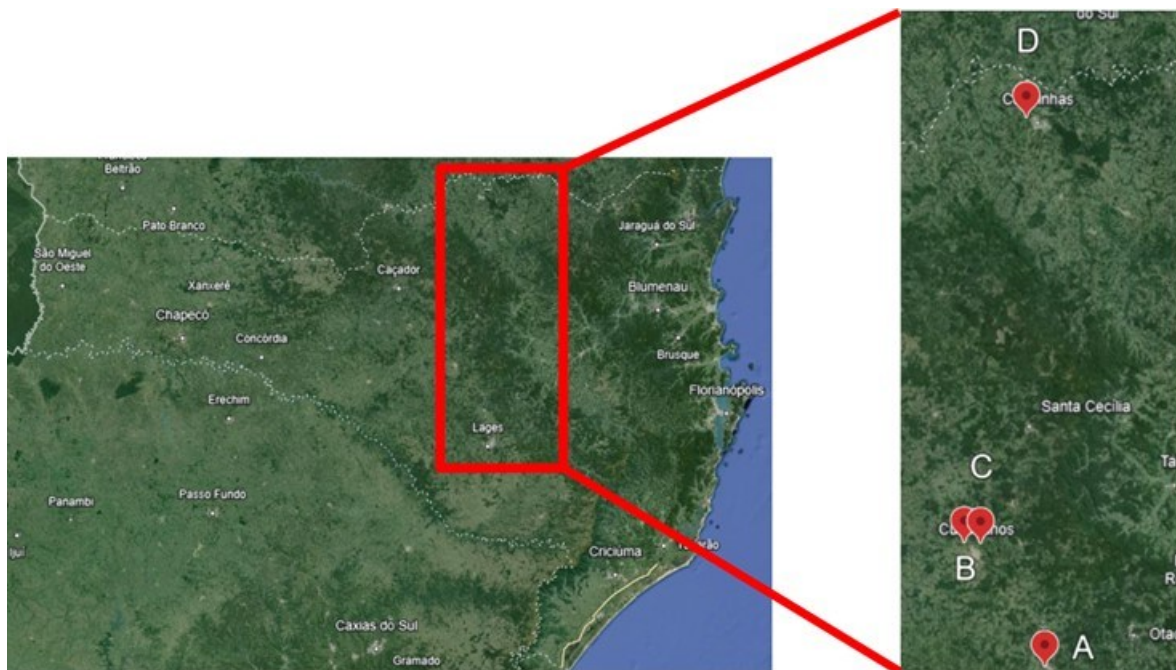
Em várias todas as regiões do Brasil até hoje estudadas, os microrganismos alvos não são multiplicados, ou quando presentes estão em baixíssimas quantidades, e os produtos são predominantemente compostos por contaminantes¹⁶⁻²⁰, que não possuirão o efeito desejado pelo agricultor quando utilizar esse produto. Além disso, a introdução de contaminantes, patógenos e bactérias resistentes a antibióticos no solo e, posteriormente para ambientes aquáticos, representa um risco gravíssimo para a saúde ambiental, humana e animal²¹⁻²⁵. Nesse contexto, o presente trabalho analisou inoculantes à base de *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis* e *Trichoderma harzianum* produzidos em biofábricas de sistemas *on farm* na região de Curitiba, em Santa Catarina.

METODOLOGIA

O trabalho foi desenvolvido em propriedades rurais da região centro-oeste do estado de Santa Catarina e também em laboratório, nas dependências da UFSC – Campus Curitiba. Primeiramente, entrou-se em contato com produtores que realizam as multiplicações de inoculantes *on farm*. Quando o produtor demonstrou interesse em fazer análises para controle de qualidade, realizou-se a coleta do material nas dependências da propriedade.

Foram coletados materiais para análise de quatro propriedades do estado de Santa Catarina: uma no município de Coreia Pinto, duas em Curitibaanos e uma em Canoinhas (Figura 1).

Figura 1 – Localização das biofábricas instaladas em propriedades rurais em Santa Catarina. A) Propriedade no município de Correia Pinto; B e C) Propriedades no município de Curitibaanos; D) Propriedade em Canoinhas.



Coletaram-se amostras tanto do bioinsumo comercializado como do bioinsumo produzido na biofábrica. No momento de coleta das amostras, foi solicitado ao produtor a ligação do equipamento de multiplicação. Após a homogeneização, utilizou-se uma pipeta de Pasteur para retirar a alíquota de necessária para completar um tubo Eppendorf esterilizado de 50 mL. Após o procedimento de coleta, realizou-se a identificação do material e posteriormente foram coletadas informações como tempo de multiplicação, produtos usados para a multiplicação e espécie de bactéria ou fungo que foi utilizada como fonte de inóculo. As amostras foram mantidas sob refrigeração e transportadas imediatamente para o laboratório, onde foram realizadas as análises.

Como primeiro procedimento laboratorial, realizou-se a medição de pH das amostras, e as mesmas foram fotografadas para registro de cor e aspecto.

Para as análises microbiológicas, foram estabelecidas três repetições para os produtos multiplicados, mas os produtos comerciais que serviram como fonte de inóculo foram analisados como amostra simples. Iniciou-se a preparação dos meios de cultura e da solução salina 0,85 % para a diluição seriada. Foram utilizados os meios de cultura LB e BDA para *Bacillus* sp. e *Trichoderma* sp., respectivamente. O primeiro passo da análise foi a diluição seriada, onde foi pipetada a alíquota de 1 mL da amostra, seja ela o produto original ou o produto multiplicado. Pipetou-se essa alíquota no primeiro tubo de cultura, e misturou-se o conteúdo por 2 minutos. Retirou-se a alíquota de 1 mL do primeiro tubo de cultura e colocou-se no segundo tubo de

cultura, a assim sucessivamente até chegar na diluição de 10-10. A cada troca de tubo de cultura, realizou-se a troca da ponteira da pipeta a fins de evitar contaminação.

Após a diluição seriada, realizou-se o plaqueamento das amostras na placa de Petri, pipetando-se a alíquota de 0,1 mL em cada placa. Para o plaqueamento foram utilizados os tubos de cultura com as diluições 10-6, 10-7, 10-8 e 10-9. Realizou-se o espalhamento da alíquota na placa de Petri com uma alça de Drigalski esterilizada. Em seguida, as placas foram armazenadas na B.O.D. com a temperatura e tempo de incubação ideais para o crescimento de cada espécie. Materiais à base de espécies de *Bacillus* permaneceram dentro da B.O.D. durante 24 horas com temperatura controlada de 25°C. Materiais à base de espécies de *Trichoderma* permaneceram dentro da B.O.D. durante 48 horas com temperatura controlada de 25°C. Depois do tempo de incubação, realizou-se a contagem das colônias de microrganismos de interesse e de contaminantes que foram distinguidos entre si por análise morfológica da colônia. Os dados foram expressos em Unidades Formadoras de Colônias (U.F.C.) mL⁻¹ de produto.

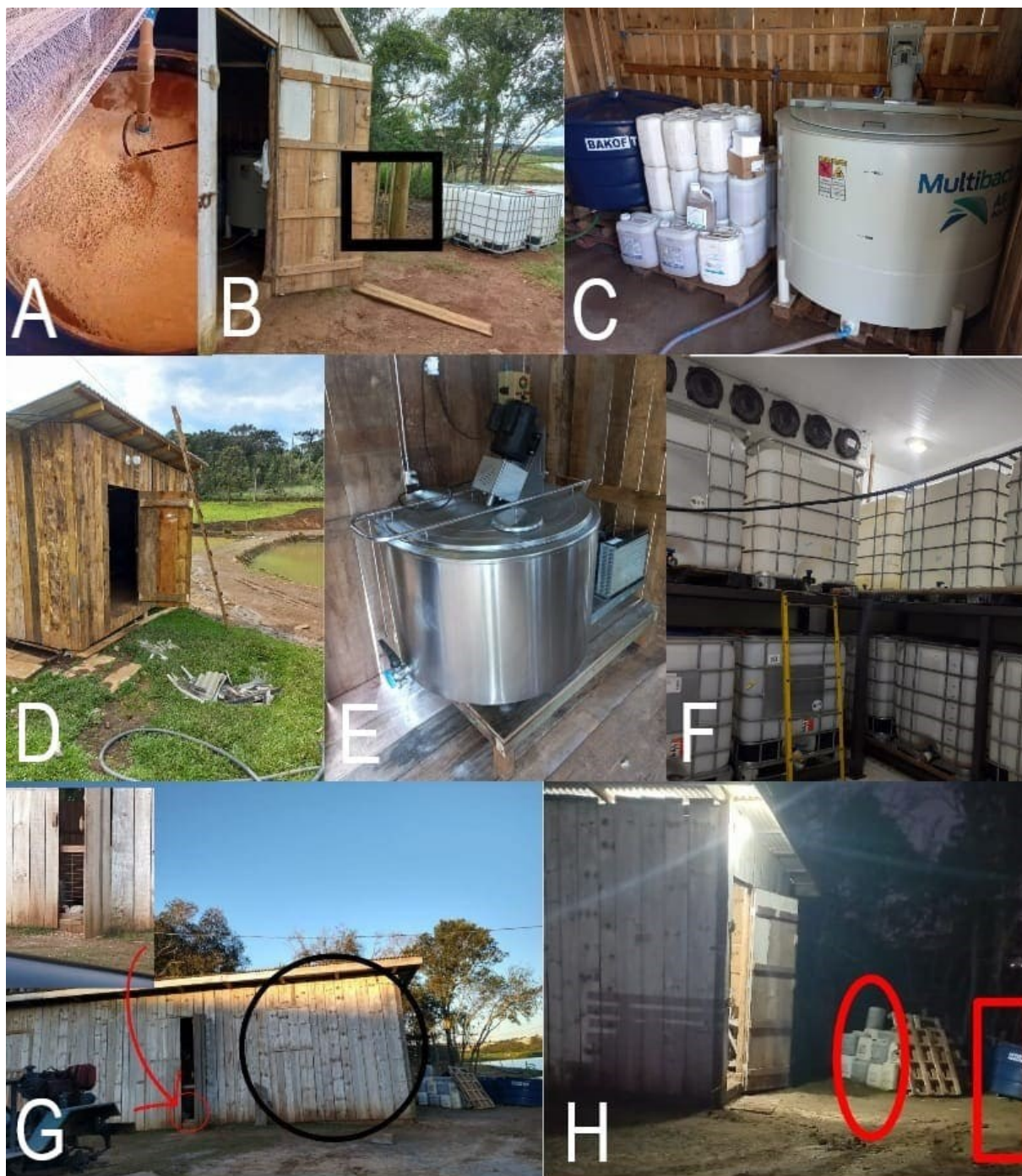
Realizou-se também a medição de pH das amostras, e as mesmas foram fotografadas para registro de cor, aspecto, viscosidade e impurezas das amostras originais e multiplicadas. Todos os dados coletados foram tabulados em uma planilha do Excel para controle e armazenamento de dados, e as fotos foram agrupadas para registro visual e comparação da morfologia de colônias bacterianas e fúngicas.

RESULTADOS

A figura 2 representa os aspectos das biofábricas onde foram coletadas as amostras analisadas. Todas as biofábricas estão instaladas em propriedades rurais, e a multiplicação é feita em instalações sem qualquer rigor de higienização ou cuidado para evitar contaminação. Nenhuma instalação conta com ambientes adequados para multiplicação de microrganismos, ou seja, assépticos.

Figura 2 - Biofábricas instaladas em propriedades rurais na região centro-oeste de Santa Catarina. A) Caixa d'água utilizada como tanque de multiplicação em Correia Pinto - SC, onde foram coletadas as amostras 01 e 02. O sistema conta com aerador de aquário e uma tela fina disposta sobre a parte superior da caixa d'água. B) Propriedade em Curitibaanos - SC, onde foram coletadas as amostras 03, 04, 05 e 06. Galpão onde ficam armazenados os tanques de multiplicação, em um pátio aberto, ao fundo observam-se reservatórios IBC, galinhas cercadas no fundo do galpão (em destaque no quadro preto) e um açude utilizado para criação de peixes. C) Biorreator e caixa d'água com tampa utilizados como biofábrica para as multiplicações. O biorreator continha o produto da amostra 06 e na caixa d'água estava o produto da amostra 04. Observam-se diversas embalagens de agrotóxicos no mesmo ambiente, e maior parte encontrava-se vazia para posteriormente ser utilizada no envasamento do produto. D) Propriedade em Curitibaanos - SC, onde foram coletadas as amostras 07, 08, 09 e 10. O galpão é construído ao lado de dois açudes, em uma área com livre circulação de galinhas, gansos e ovinos. Destaca-se a falta de organização e limpeza com o ambiente ao redor. E) Resfriador de leite que passou por uma adaptação para ser utilizado como biofábrica na propriedade apresentada na Figura 4. F) Biofábrica na propriedade em Canoinhas, onde foi coletada a amostra 11. G) Propriedade em Curitibaanos-SC onde foram coletadas as amostras 12, 13 e 14. O local destacado pelo círculo preto é a parte do galpão destinada a sala de multiplicação e logo ao lado no círculo vermelho observa-se a porta de um galinheiro. O galpão é usado para múltiplas atividades. H)

Propriedade onde foram multiplicadas as amostras 12 e 14. Circuladas em vermelho observa-se diversas embalagens de agrotóxicos que posteriormente eram utilizadas para armazenar o produto multiplicado. O retângulo vermelho destaca caixas d'água utilizadas como componentes das biofábricas.



As tabelas 1 e 2 apresentam as informações obtidas com os produtores como o nome científico do microrganismo, o tipo de biofábrica utilizado para a produção, e a natureza do produto que foi utilizado como inóculo. Destaca-se que 100% dos produtos usados como fonte de inóculo eram produtos comerciais.

Foram coletadas informações das condições em que os produtos foram multiplicados, e também o propósito de uso na cultura em questão informada pelo produtor. Os valores de pH foram avaliados em laboratório com o auxílio de um pHmetro.

Tabela 1 - Identificação das amostras coletadas com nome científico do microrganismo de interesse, município onde a amostra foi coletada, tipo de biofábrica utilizada para a multiplicação e valores de pH das amostras.

Amostra	Microrganismo de interesse	Município	Tipo de biofábrica	pH
01	<i>Trichoderma harzianum</i>	Correia Pinto	Não se aplica – produto original	5,90
02	<i>Trichoderma harzianum</i>	Correia Pinto	Caixa d'água	5,87
03	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Curitibanos	Não se aplica – produto original	5,03
04	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Curitibanos	Caixa d'água	8,03
05	<i>Bacillus subtilis</i>	Curitibanos	Não se aplica – produto original	5,18
06	<i>Bacillus subtilis</i>	Curitibanos	Biorreator	7,1
07	<i>Trichoderma harzianum</i>	Curitibanos	Não se aplica – produto original	Não apresentado no produto
08	<i>Trichoderma harzianum</i>	Curitibanos	Resfriador adaptado	5,07
09	<i>Trichoderma harzianum</i>	Curitibanos	Não se aplica – produto original	Não apresentado no produto
10	<i>Trichoderma harzianum</i>	Curitibanos	Resfriador adaptado	3,62
11	<i>Bacillus subtilis</i>	Canoinhas	Tonel inox	3,81
12	<i>Trichoderma harzianum</i>	Curitibanos	Tanque inox	4,13
13	<i>Trichoderma harzianum</i>	Curitibanos	Não se aplica – produto original	Não apresentado no produto
14	<i>Trichoderma harzianum</i>	Curitibanos	Tanque inox	3,85

Tabela 2 - Natureza do produto comercial utilizado como fonte de inóculo e do produto multiplicado, cultura na qual foi utilizado o produto multiplicado, bem como propósito de uso e condições de multiplicação informados pelo produtor.

Amostra	Produto	Cultura	Propósito de uso	Temperatura e tempo de multiplicação
01	Trichodermil	Framboesa, Physalis, Mirtilo	Promotor de crescimento	Não se aplica – produto de fábrica
02	Multiplicado	Framboesa, Physalis, Mirtilo	Promotor de crescimento	96h, temperatura controlada a 32°C
03	VectoBac 12AS	Pastagem	Controle de moscas	Não se aplica – produto de fábrica
04	Multiplicado	Pastagem	Controle de moscas	48h, temperatura controlada entre 35°C e 38,5°C
05	Serenade	Soja	Controle fitopatológico	Não se aplica – produto de fábrica
06	Multiplicado	Soja	Controle fitopatológico	24h, temperatura controlada entre 35°C e 38,5°C
07	NatuControl	Trigo	Controle biológico	Não se aplica – produto de fábrica
08	Multiplicado	Trigo	Controle biológico	96h, temperatura controlada a 35°C
09	NatuControl	Trigo	Controle biológico	Não se aplica – produto de fábrica
10	Multiplicado	Trigo	Controle biológico	96h, temperatura controlada a 35°C
11	Multiplicado	Trigo	Controle de nematóides e patógenos	24h, temperatura inicial 16°C e final 34°C
12	Multiplicado	Trigo	Controle biológico	Tanque fechado inox de 1000 litros, 48h de cultivo.
13	NatuControl	Trigo	Controle biológico	Não se aplica – produto de fábrica
14	Multiplicado	Trigo	Controle biológico	Tanque fechado inox de 1000 litros, 72h de cultivo

As figuras 3 e 4 representam a coloração e o aspecto dos produtos comerciais utilizados como fonte de inóculo e do produto multiplicado. As imagens estão organizadas lado a lado para melhor visualização e comparação dos produtos.

Figura 3 - Coloração e aspecto dos produtos comerciais à base de *Bacillus subtilis* e do produto multiplicado. A) Amostra 03: produto comercial VectoBac 12AS utilizado como fonte de inóculo. B) Amostra 04: produto multiplicado a partir do produto comercial da figura 09. C) Amostra 05: produto comercial Serenade utilizado como fonte de inóculo. D) Amostra 06: produto multiplicado a partir do produto comercial da figura 11. E) Amostra 11: produto multiplicado a partir do produto comercial Bio Raiz Pró.

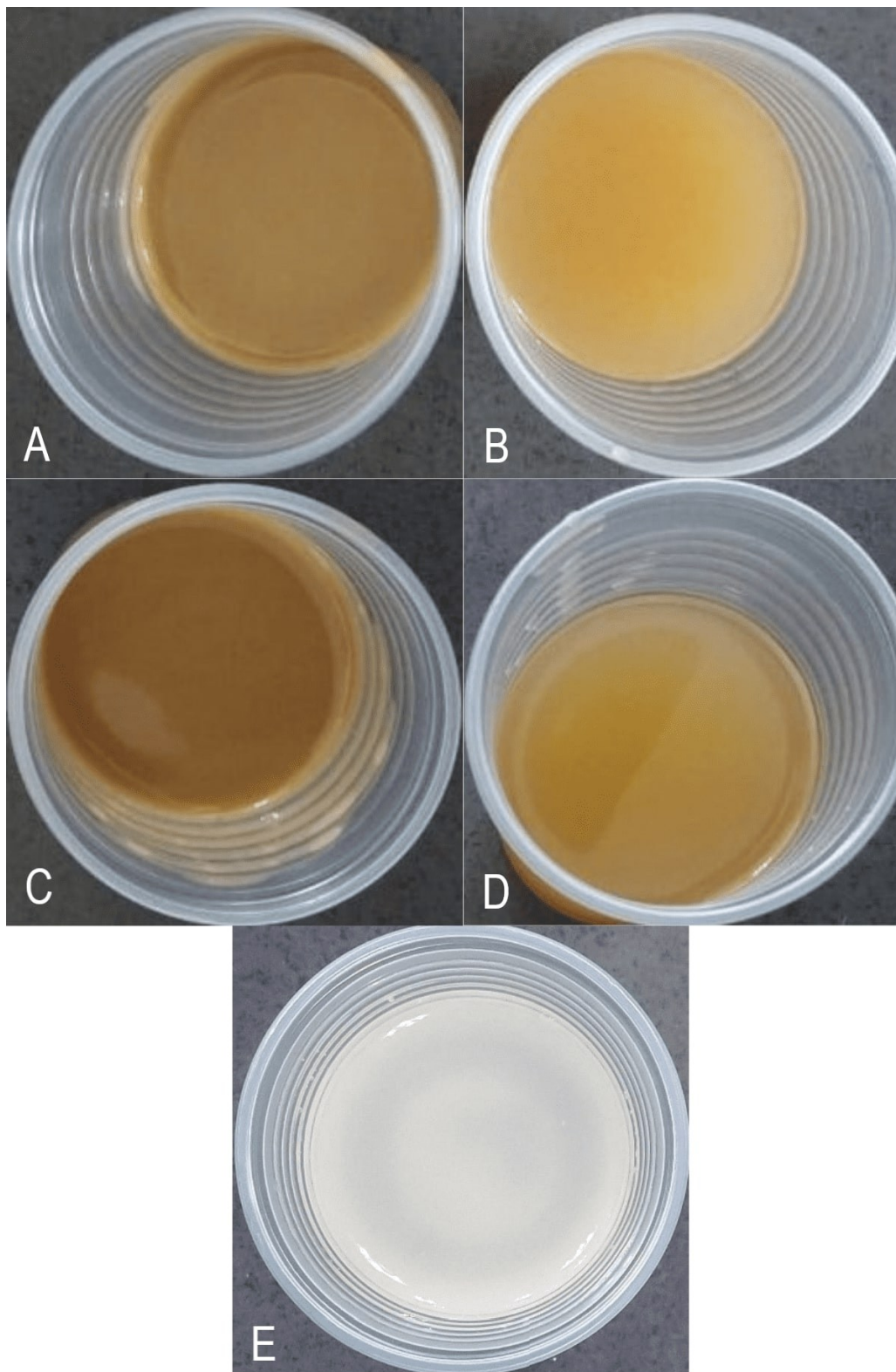
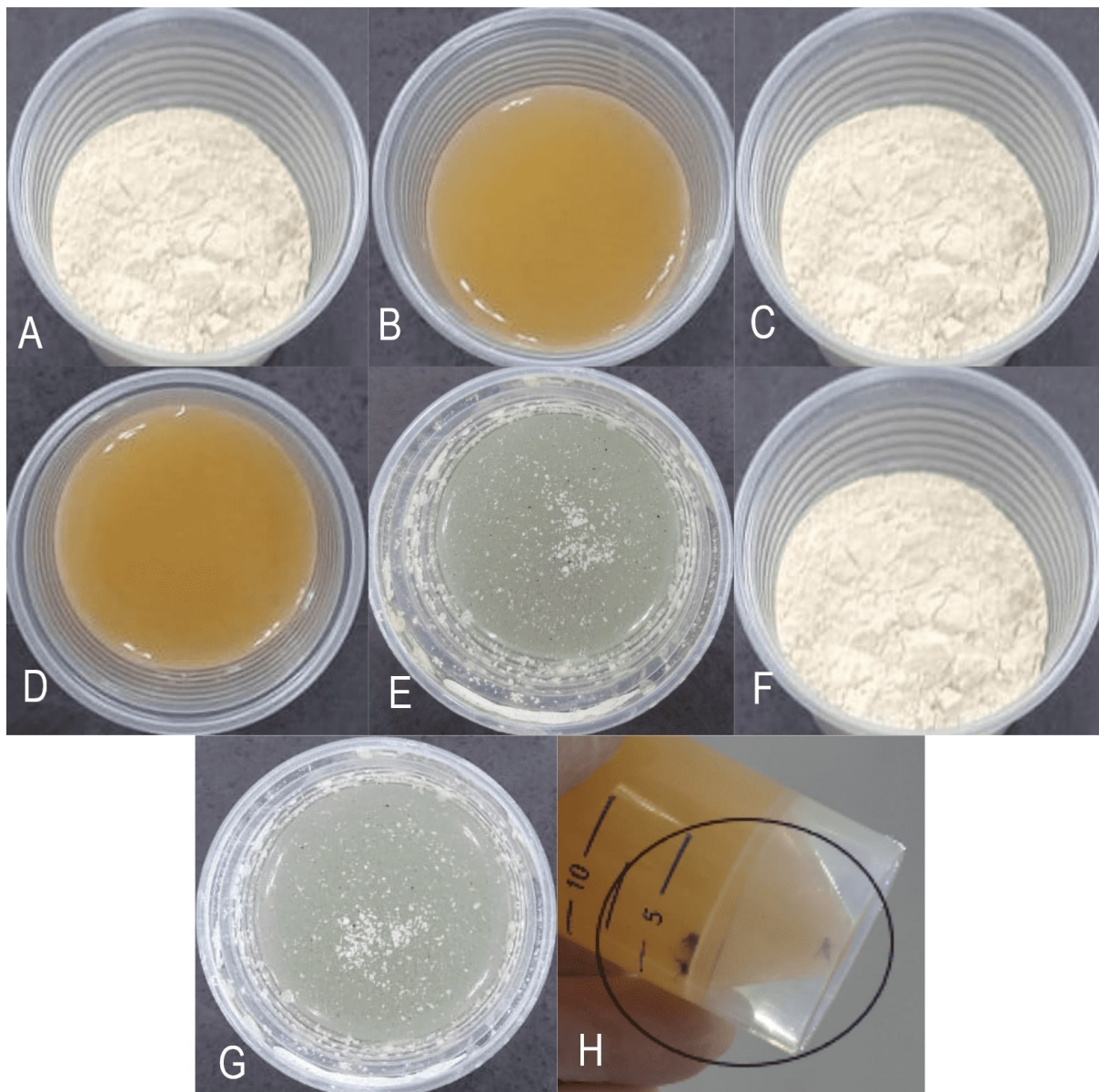


Figura 4. Coloração e aspecto dos produtos comerciais à base de *Trichoderma harzianum* e produtos multiplicados. A) Amostra 07: produto comercial NatuControl utilizado como fonte de inóculo. B) Amostra 08: produto multiplicado a partir do produto comercial da figura 13. C) Amostra 09: produto comercial NatuControl utilizado como fonte de inóculo. D) Amostra 10: produto multiplicado a partir do produto comercial da figura 15. E) Amostra 12: produto multiplicado por 48h a partir do produto comercial NatuControl. F) Amostra 13: produto comercial NatuControl, utilizado como fonte de inóculo. G) Amostra 14: produto multiplicado por 72h a partir do produto comercial NatuControl. H) Presença de moscas na amostra 08 coletada em Curitiba –SC.



Na tabela 3 são apresentadas as concentrações de microrganismos de interesse e concentrações de contaminantes nos produtos comerciais e multiplicados, com valores expressos em UFC mL⁻¹. Dentre as 11 amostras, apenas quatro delas apresentaram o microrganismo de interesse (três produtos comerciais e um multiplicado). Todas as demais amostras não continham o microrganismo de interesse e apresentaram apenas contaminantes.

Tabela 3 - Concentração do microrganismo de interesse e concentração de contaminantes, expressas em UFC mL⁻¹, de amostras coletadas em biofábricas do estado de Santa Catarina, 2022-2023.

Amostra	Concentração do microrganismo de interesse (UFC mL ⁻¹)	Concentração de contaminantes (UFC mL ⁻¹)
01	5x10 ⁶	Ausência
02	Ausência	3x10 ⁸
03	52x10 ⁹	Ausência
04	2x10 ⁹	5,7x10 ⁹
05	5x10 ⁹	Ausência
06	Ausência	6,7x10 ¹⁰
07	Ausência	Ausência
08	Ausência	54x10 ⁷
09	Ausência	1x10 ⁷
10	Ausência	1,6x10 ⁸
11	Ausência	1,16x10 ⁹
12	Ausência	7,8x10 ⁷
13	Ausência	1x10 ⁷
14	Ausência	4,3x10 ⁸

As figuras 5 e 6 apresentam as colônias produzidas pelos produtos multiplicados em comparação com as colônias características dos microrganismos *Trichoderma harzianum* (Figura 5A), *Bacillus thuringiensis* (Figura 6A) e *Bacillus subtilis* (Figura 6C).

Figura 5 - Colônias observadas após plaqueamento e incubação em meio BDA. A) *Trichoderma harzianum*; B) Amostra 02; C) Amostra 08; D) Amostra 10; E) Amostra 12; F) Amostra 14.

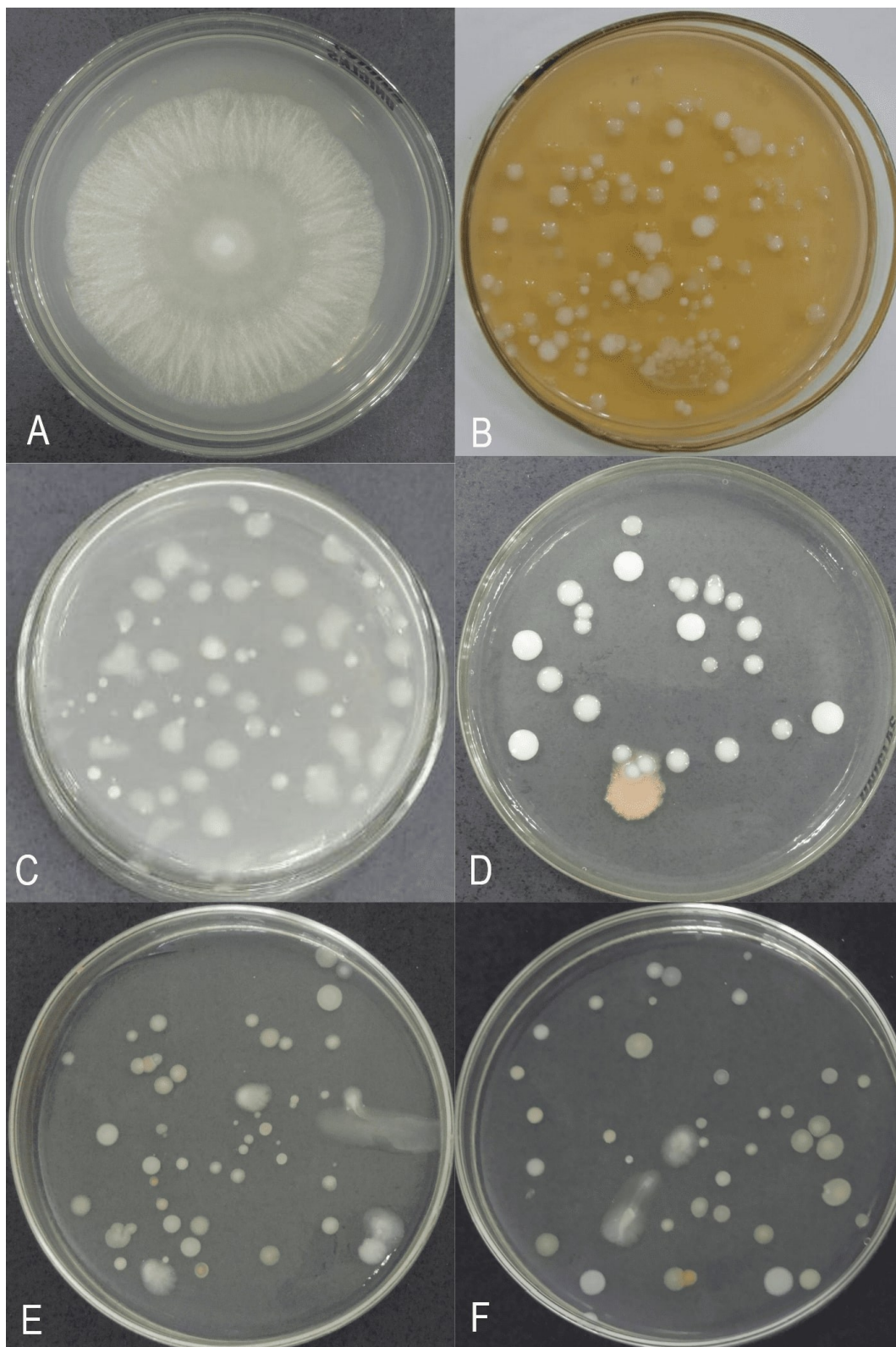
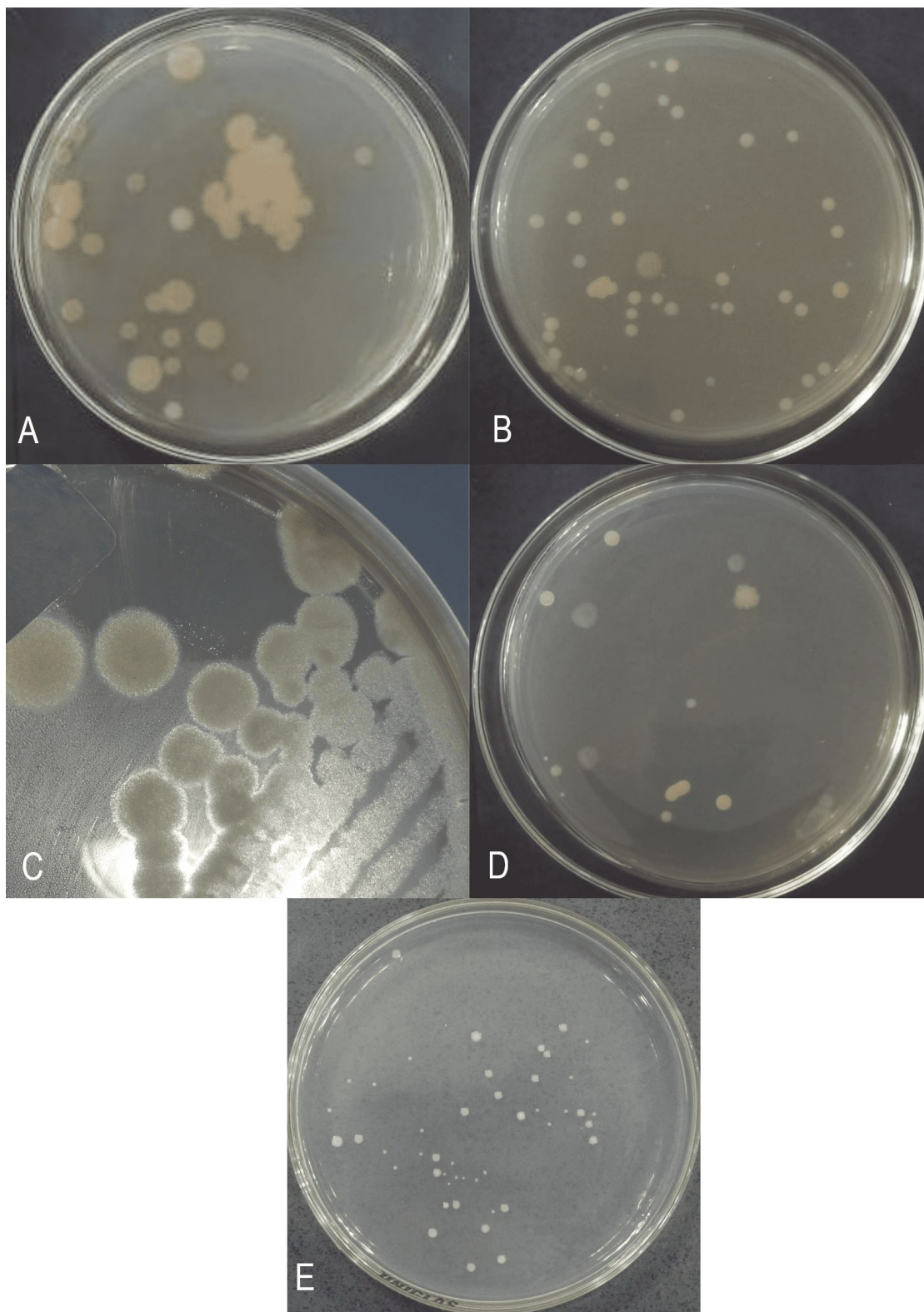


Figura 6 – Colônias observadas após plaqueamento e incubação em meio LB. A) *Bacillus thuringiensis*; B) Amostra 04; C) *Bacillus subtilis*; D) Amostra 06; E) Amostra 11.



DISCUSSÃO

O presente trabalho é o primeiro a abordar aspectos da qualidade de bionsumos no Estado de Santa Catarina. A produção agrícola da região é oriunda, em sua maioria, de pequenos produtores, que muitas vezes optam por processos e produtos em pequena escala, e até mesmo de uso local ou doméstico, visando a redução de custos. Porém, a produção de insumos biológicos em sistemas de biofábricas envolve manipulação de instalações e meios de cultura onde há frequente incidência de contaminantes e patógenos. Isso representa um risco de saúde pública e ameaça o ambiente agrícola, além de não oferecer a eficiência esperada de um produto comercial. Os dados gerados no presente estudo são uma ferramenta essencial para conscientização dos agricultores sobre o risco das biofábricas.

Com base nas informações dos produtores, observa-se que os inóculos utilizados eram produtos comerciais, o que é ilegal e consiste em biopirataria. A legislação brasileira não contempla o uso de produtos comerciais como fonte de inóculo para multiplicação em propriedades particulares, mesmo que seja para uso próprio.

Outro ponto que chama atenção são as condições em que os produtos originais utilizados como inóculo foram encontrados: produtos previamente abertos e produtos vencidos. Os produtores utilizavam produtos que se encontravam abertos por um longo período e, conseqüentemente quando estão abertos ficam suscetíveis à contaminação. Posteriormente, esses produtos passavam do prazo de validade e mesmo assim eram utilizados.

Nas biofábricas foram encontrados os mais diversos cenários possíveis. Em uma propriedade, a multiplicação era feita em uma caixa d'água coberta com uma tela de mosquiteiro. Essa proteção não é suficiente para eliminar contaminação, ela apenas restringe o acesso de insetos. Telas permitem a passagem de micropartículas do ar que carregam bactérias contaminantes. Esporos de fungos também são disseminados pelo ar, e a tela não impede sua entrada na caixa d'água.

Já em outras biofábricas, os tanques de multiplicação eram resfriadores de leite que foram adaptados para aquecer e também biorreatores. As condições de higiene sequer existiam, quando comparadas a fábricas de inoculantes, onde o controle sanitário é extremamente rigoroso e o processo de fabricação segue padrões altíssimos de higiene e assepsia em um ambiente controlado.

Em todas as propriedades a higiene era precária. A limpeza do tanque era feita apenas com água corrente e antes de iniciar a nova multiplicação eram adicionadas pastilhas de cloro para “tratar” a água que seria utilizada na multiplicação. Entretanto, caso haja cloro residual na água, esse elemento terá ação de controle de crescimento microbiano, comprometendo a multiplicação das bactérias nas biofábricas. De acordo com relatos, não há controle da quantidade de cloro residual na água utilizada no processo de multiplicação.

A qualidade da água utilizada não é confiável, pois o município de Curitiba – SC está localizado na região serrana de SC e o relevo é caracterizado por altos morros. As fontes de água encontram-se na sua maioria nas áreas baixas. Por essa

característica do relevo, com o volume de água pluvial, há grande transporte de dejetos de animais que ficam no entorno dessas fontes. Como os produtores não realizam uma análise periódica da água utilizada, possivelmente a água utilizada seja uma das portas de entrada de contaminantes.

Outra divergência encontrada foi a diferença de composições de produtos comerciais e multiplicado. No caso das amostras de *Trichoderma harzianum*, o produto original era em pó, enquanto o multiplicado era líquido. Isso altera drasticamente as condições em que o fungo deve se desenvolver, o que ajuda a explicar a ausência do microrganismo em todas as amostras de *Trichoderma harzianum*. É importante ressaltar que *Trichoderma* não é um fungo aquático, e sua multiplicação em veículo líquido não ocorrerá com sucesso, devido a restrições metabólicas.

Relacionando os presentes dados com os artigos já publicados, observa-se que a contaminação das amostras multiplicadas é um aspecto frequente. Nos cinco artigos publicados no Brasil sobre o tema, também se observou que as colorações das amostras, a viscosidade e o pH divergiram dos produtos comerciais utilizados como inóculo¹⁶⁻²⁰.

No presente trabalho realizado no estado de Santa Catarina foram analisadas oito amostras de produtos multiplicados, sendo três delas pertencentes ao gênero *Bacillus*, e observou-se que 100% dessas amostras apresentaram contaminação. Quanto à presença do microrganismo de interesse, em duas amostras analisadas não houve presença do microrganismo. Na amostra 04, onde o microrganismo de interesse era o *Bacillus thuringiensis*, observou-se apenas duas colônias do microrganismo de interesse na placa em questão, junto dos contaminantes.

Comparando os dados obtidos no presente trabalho com os demais artigos já publicados, é possível afirmar que o sistema *on farm* não possui eficiência de multiplicação de *Bacillus*, a exemplo do já registrado em outros trabalhos. Valicente *et al.*¹⁶ analisaram 50 colônias das amostras de *Bacillus thuringiensis* coletadas no estado de Mato Grosso. Dessas, 47 colônias eram contaminantes, e apenas três colônias pertenciam à espécie *Bacillus thuringiensis*. Lana *et al.*¹⁸ analisaram 10 amostras de *Bacillus thuringiensis* multiplicado, coletadas no município de Jataí – GO. Os autores observaram que 100% das amostras apresentaram contaminação e apenas em uma amostra observou-se uma colônia do microrganismo de interesse. Em 90% das amostras o microrganismo de interesse encontrava-se ausente. Santos *et al.*¹⁷ coletaram no Vale do São Francisco doze amostras de multiplicados *on farm*, sendo cinco amostras onde o microrganismo de interesse pertencia ao gênero *Bacillus*. Nenhuma amostra apresentou presença do microrganismo de interesse e todas estavam contaminadas. Lana *et al.*²⁰ coletaram quatro amostras no estado de São Paulo produzidas em sistema *on farm*. Em duas amostras, *Priestia megaterium* e *Bacillus subtilis* eram os microrganismos de interesse. *B. subtilis* não foi observado em nenhuma amostra e *P. megaterium* foi observado em uma amostra. As outras duas amostras tinham o microrganismo *Priestia arayabattai* como interesse, mas em nenhuma amostra foi observado o microrganismo. Além disso, 100% das amostras estavam contaminadas.

Cinco amostras do presente trabalho tinham como alvo de multiplicação a espécie *Trichoderma harzianum*. Em 100% das amostras observou-se apenas contaminação e ausência do microrganismo de interesse. Até o presente momento não há trabalhos realizados a partir da multiplicação de *Trichoderma harzianum*, sendo esse o primeiro trabalho desenvolvido e, com isso, não é possível realizar comparações com outras fontes bibliográficas.

Em todos os trabalhos já publicados, percebe-se que as estruturas das salas de multiplicação são precárias, instaladas em locais abertos, com acesso de animais, sem higiene, sem controle sanitário. Os tanques de multiplicação são em sua maioria caixas d'água com canos de PVC e em alguns casos as caixas são abertas. Assim, percebe-se que essas características são comuns em todas as partes do Brasil onde as análises são feitas.

Um dos principais problemas é que os contaminantes que tomam conta do processo de multiplicação são potenciais patógenos que trazem inúmeros riscos à saúde de humanos, animais e plantas^{16, 18-20}. Assim, o produto multiplicado torna-se perigoso para quem o manipula, e também para quem consome o produto final.

Há um risco eminente ao qual trabalhadores e ambiente são expostos, visto que inúmeras bactérias multiplicadas nesse sistema são potenciais patógenos para humanos e animais. O perigo da aplicação desses produtos em plantas e no solo é alarmante. Visto que com todos os patógenos identificados pelos trabalhos que realizaram sequenciamento genético, seja possível afirmar que não há controle durante nenhum processo da multiplicação, provavelmente inúmeros patógenos estão sendo multiplicados nessas propriedades e posteriormente sendo aplicados nos solos.

Em um caso relatado por um produtor que realizava a multiplicação, na cidade de Correia Pinto, ele afirmou que produzia frutas em sistema orgânico que recebiam aplicação de multiplicados *on farm* diretamente nos frutos. Eles são vendidos *in natura* em grandes mercados da região, o que representa um risco para a saúde do consumidor.

A aplicação de bactérias patogênicas em culturas agrícolas não atinge apenas a planta ou o solo. Os microrganismos multiplicados, quando aplicados, podem ser transportados para rios e conseqüentemente em reservatórios de água para consumo humano. Após instalarem-se no ambiente, elas podem ser transportadas, por ação da chuva ou da erosão, para corpos d'água como poços, rios, e até mesmo nascentes. Como resultado, há aumento da contaminação microbiológica dos recursos hídricos. Animais e pessoas que venham a fazer uso dessa água podem ingerir esses microrganismos e desenvolver diversos problemas de saúde.

É importante também ressaltar que até o presente momento não há nenhum trabalho realizado para testar a eficiência agrônômica dos produtos multiplicados em plantas, o que deveria ser abordado em futuros projetos de pesquisa. Relatos de produtores para entidades como UFSC e EMBRAPA sobre prejuízos no crescimento das plantas, e até mesmo comprometimento da produtividade de lavouras, são cada vez mais frequentes. Assim, seria possível esclarecer o conceito de que “os

multiplicados *on farm* são tão bons, ou melhores, que os produtos comerciais”, um aspecto tão errôneo, mas amplamente difundido na agricultura brasileira.

CONCLUSÃO

Os produtos multiplicados a partir das biofábricas possuem baixa qualidade, pois o microrganismo alvo está ausente na maior parte dos casos, e os bioinsumos gerados são constituídos predominantemente de contaminantes, comprometendo a recomendação de uso agrícola.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Microrganismos Promotores de Crescimento de Plantas (INCT-MPCP-AGRO), e a todos os proprietários e agricultores que gentilmente disponibilizaram amostras de bioprodutos para análise.

REFERÊNCIAS

1. Telles TS, Nogueira MA, Hungria M. Valor econômico da fixação biológica de nitrogênio na cultura da soja no Brasil. *Tecnologia e Inovação Ambiental*. 31:103158.
2. Santos MS, Nogueira MA, Hungria M. Inoculantes microbianos: revisando o passado, discutindo o presente e prevendo um futuro marcante para o uso de bactérias benéficas na agricultura. *AMB Express*. Dez de 2019;9(1).
3. Prando AM, Barbosa JZ, de Oliveira AB, Nogueira MA, Possamai EJ, Hungria M. Benefits of soybean co-inoculation with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense*: Large-scale validation with farmers in Brazil. *Eur J Agron*. 2024;155:127112
4. Galindo FS, Pagliari PH, da Silva EC, de Lima BH, Fernandes GC, Thiengo CC, et al. Impact of nitrogen fertilizer sustainability on corn crop yield: the role of beneficial microbial inoculation interactions. *BMC Plant Biol*. 2024;24(1):268
5. Hungria M. Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo. www.infotecacnptiaembrapabr [Internet]. 2011 [cited 2023 Dec 22]; Available from: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/879471>
6. Fukami J, Cerezini P, Hungria M. *Azospirillum*: benefícios que vão muito além da fixação biológica de nitrogênio. *AMB Express* [Internet]. 2018 4 de maio;8. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5935603/>

7. Galeano RMS, Ribeiro JVS, Silva SM, de Oliveira Simas AL, de Alencar Guimarães NC, Masui DC, et al. New strains of *Trichoderma* with potential for biocontrol and plant growth promotion improve early soybean growth and development. *J Plant Growth Regul.* 2024;1-21.
8. Bettiol W, Pinto ZV, Silva JC da, Forner C, Faria MR de, Pacífico MG, et al. Produtos comerciais à base de *Trichoderma*. 1ª edição. EMBRAPA Meio Ambiente, editora. EMBRAPA Meio Ambiente;
9. Bortoloti G. Características da inserção dos bioinsumos para controle biológico no mercado fitossanitário brasileiro. repositoriobiologico.com.br [Internet]. 2023 Sep 14 [cited 2023 Dec 22]; Available from: <http://repositoriobiologico.com.br//jspui/handle/123456789/1190>
10. Delgado NF. Avaliação da produção de biológicos on-farm e seu papel no setor agrícola [Internet]. dspace.unila.edu.br. 2023 [cited 2023 Dec 22]. Available from: <http://dspace.unila.edu.br/123456789/7730>
11. Maral-Gül D, Eltem R. Evaluation of *Bacillus* isolates as a biological control agents against soilborne phytopathogenic fungi. *Int Microbiol.* 2024;1-15.
12. Neha Dhankhar, Kumar J. Impacto do aumento de pesticidas e fertilizantes na saúde humana: uma revisão. 1º de abril de 2023
13. Singh S, Vinod Kumar Garg, Ramamurthy PC, Singh J, Pandey A. Impacto e perspectivas dos pesticidas na saúde humana e ambiental. E-books da Elsevier. 1–32 de janeiro de 2023.
14. Rodrigues R. DECRETO No 4.954 DE 14 DE JANEIRO DE 2004 [Internet]. Jan 14, 2004. Available from: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2004/decreto/d4954.htm
15. Geller N. DECRETO No 8.384, DE 29 DE DEZEMBRO DE 2014 [Internet]. Dec 29, 2014. Available from: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2011-2014/2014/decreto/D8384.htm
16. Valicente FH, Lana UGP, Pereira ACP, Martins JLA, Tavares ANG. Riscos à produção de biopesticida à base de *Bacillus thuringiensis*. 2018 Jan 1.
17. Santos A, Dinnas S, Feitoza A. Qualidade microbiológica de bioprodutos comerciais multiplicados on farm no Vale do São Francisco: dados preliminares. *Enciclopédia Biosfera.* 2020 Dec 30;17(34).
18. Lana UGP, Tavares ANG, Aguiar FM, Gomes EA, Valicente FH. Avaliação da qualidade de biopesticidas à base de *Bacillus thuringiensis* produzidos em sistema “on farm”. 2019 Jan 1.
19. Bocatti CR, Ferreira E, Ribeiro RA, Chueire LMO, Delamuta JRM, Kobayashi RKT, et al. Microbiological quality analysis of inoculants based on *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense* produced “on farm” reveals high contamination with

- non-target microorganisms. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2022 Jan 1;53(1):267–80.
20. Avaliação da qualidade de inoculantes à base de *Bacillus* para promoção de crescimento de plantas produzidos em sistema on farm BOLETIM DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO 238 [Internet]. [cited 2023 Dec 22]. Available from: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/doc/1143636/1/Boletim-238-Avaliacao-da-qualidade-de-inoculantes-a-base-de-Bacillus-para-promocao-de-crescimento-de-plantas.pdf>
21. Ribeiro GF, Angelo NMM, Proença JE, Cruz SP da. Coliforms and antibiotic-resistant bacteria in water from rivers and wells at Curitiba, Santa Catarina. *Acta Brasiliensis* [Internet]. 2022 May 30 [cited 2023 Dec 22];6(2):43–8. Available from: <http://revistas.ufcg.edu.br/ActaBra/index.php/actabra/article/view/580>
22. Esiobu N, Armenta L, Ike J. Antibiotic resistance in soil and water environments. *International Journal of Environmental Health Research*. 2002 Jun;12(2):133–44.
23. Hong PY, Al-Jassim N, Ansari M, Mackie R. Environmental and Public Health Implications of Water Reuse: Antibiotics, Antibiotic Resistant Bacteria, and Antibiotic Resistance Genes. *Antibiotics*. 2013 Jul 31;2(3):367–99.
24. Ahmad N, Joji RM, Shahid M. Evolution and implementation of One Health to control the dissemination of antibiotic-resistant bacteria and resistance genes: A review. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2023 Jan 16;12.
25. Ajayi AO, Odeyemi AT, Akinjogunla OJ, Adeyeye AB, Ayo-Ajayi I. Review of antibiotic-resistant bacteria and antibiotic resistance genes within the one health framework. *Infect Ecol Epidemiol*. 2024;14(1):2312953.