

CIRCULAR TÉCNICA

IGA
Instituto Goiano
de Agricultura

Edição nº 6
Setembro de 2023
Montividiu/GO

Produção em grande escala de *Chromobacterium subtsugae* On farm em propriedades produtoras de algodão

INTRODUÇÃO:

A produção de microrganismos no sistema *On farm* apresenta desafios e oportunidades (Faria et al., 2023). Um dos desafios encontrados na produção dos microrganismos neste sistema é a complexidade envolvida no processo, visto que cada espécie de microrganismo, como a bactéria *Chromobacterium subtsugae*, possui parâmetros específicos de crescimento.

A *C. subtsugae* foi isolada em 2000 por pesquisadores do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos do solo de uma floresta em Maryland-EUA como uma nova espécie de bactéria do gênero *Chromobacterium* (Martin et al., 2007a). É uma espécie gram-negativa, facultativamente aeróbica, móvel, com flagelos polares, que produz a violaceína, um metabólito que confere às suas colônias uma típica coloração violeta. As primeiras colônias podem ser observadas após 2-3 dias em meio específico, com pH entre 6 e 8, incubado a 25-30 °C, podendo ser inicialmente de cor creme, tornando-se gradualmente violeta claro a escuro entre 72 e 96 horas de incubação (Martin et al., 2007b; Koivunen et al., 2009).

EXPEDIENTE

Autores: **Lidiane M. S. Moreira, Robério C. S. Neves, Heloiza A. Boaventura, Francisco V. C. Neto, Thais S. Souza, Thais T. Yoshinaga, Daniela S. Silva, Luciana D. Oliveira, Elane R. B. Silva**

Presidente: **Haroldo Rodrigues da Cunha**

Diretor Executivo: **Dulcimar Pessatto Filho**

Pesquisadores: **Robério C. S. Neves, Antônio J. S. Solino; Lais F. Fontana**

Contato: iga@iga-go.com.br



A bactéria *C. subtsugae* possui atividade inseticida contra diferentes espécies de insetos como, por exemplo, o percevejo-verde da soja, *Nezara viridula*, (*Hemiptera: Pentatomidae*) e vaquinhas, *Diabrotica* spp. (*Coleoptera: Crysomelidae*) (Martin et al., 2007a, b). A atividade de amplo espectro de *C. subtsugae* está relacionada a múltiplos modos de ação envolvendo diferentes compostos que contribuem para sua ação inseticida (Asolkar et al., 2014).

No Brasil ainda não existem inseticidas microbiológicos comerciais registrados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa) que contenham a bactéria *C. subtsugae* em sua composição (Agrofit, 2023). No entanto, há inúmeros relatos de produtores que apostam na multiplicação do microrganismo no interior de fazendas, no denominado sistema *On farm* de produção de bioinsumos, visando ao manejo biológico de pragas agrícolas. O interesse pela produção *On farm* cresceu significativamente após o lançamento do Programa Nacional de Bioinsumos instituído pelo Decreto Nº 10.375, em maio de 2020, pelo MAPA.

Desta forma, em 2020, foi iniciado no Instituto Goiano de Agricultura (IGA), em Montividiu-GO, o Projeto Biofábricas, da Associação Goiana dos Produtores de Algodão (Agopa), visando à validação da multiplicação *On farm* de bactérias benéficas, como a *C. subtsugae*, no IGA e sua aplicação em diferentes propriedades produtoras de algodão. Portanto, o objetivo deste trabalho foi validar a eficácia do processo de multiplicação *On farm* de *C. subtsugae* em Biofábrica do IGA e em propriedades parceiras do Projeto Biofábricas.

MATERIAL E MÉTODOS:

1. Multiplicação *On farm* de *Chromobacterium subtsugae* em Laboratório.

1.1. Etapa 1.

O estudo foi realizado para validação da multiplicação *On farm* de *Chromobacterium subtsugae* no Instituto Goiano de Agricultura (IGA), Fazenda Rancho Velho, localizada na Rodovia GO 174, Km 45, à direita 3,5 km, Zona Rural, Montividiu – GO, nas coordenadas 17° 26' 37.9"S e 51° 08' 49.0"O, com 860 metros de altitude. A bactéria foi identificada como *C. subtsugae* com base nas características morfológicas e na taxonomia molecular, utilizando marcadores específicos dos genes 16S e GyrB. O objetivo desta etapa foi avaliar a eficácia do sistema de aeração da Biofábrica, após mudanças estruturais e instalação de compressores de ar, na multiplicação de *C. subtsugae*.

Antes de iniciar o processo de multiplicação, um protocolo de sanitização foi realizado para limpeza da Biofábrica, seguindo as diretrizes do Manual de Multiplicação *On farm* disponibilizado pelo fabricante, juntamente com adaptações validadas pelo IGA.

Em seguida, uma Biofábrica com capacidade máxima de 250 L (Figura 1) foi preenchida com 100 L de água e acrescentado 3 Kg do meio de cultura SoluFarm Bug® (meio de cultura específico para o microrganismo, com componentes importantes para o crescimento da espécie). A mistura foi mantida em agitação por 10 minutos para homogeneização do meio. Após este período, 1 L do pré-inóculo Tec Bug® foi adicionado à Biofábrica, dando início ao processo de multiplicação.

Todos os insumos utilizados no processo (água, meio de cultura e pré-inóculo do produto Tec Bug®) foram previamente analisados quanto à sua concentração e pureza (Tabela 1). Também foram retiradas cinco amostras de *C. subtsugae* em diferentes tempos (T0, T1, T2, T3 e T4) após o início do processo de multiplicação para avaliação da presença da bactéria, concentração e pureza (Tabela 1). Todas as amostras da multiplicação foram coletadas por meio de uma torneira de amostragem previamente higienizada, presente na Biofábrica, e armazenadas em tubos de Falcon de 15 ml esterilizados e identificados. No momento de cada coleta também foi registrada a temperatura e pH da amostra.

Todas as amostras coletadas foram analisadas no Laboratório de Microbiologia Aplicada à Agricultura do IGA, seguindo a metodologia padrão de análise de água, meio de cultura e microrganismo específico.



Figura 1. Biofábrica de 250 L para validação das multiplicações de bactérias no IGA.

TABELA 1 – RESUMO DOS PARÂMETROS AVALIADOS NO PROCESSO DE MULTIPLICAÇÃO ON FARM DE *C. subtsugae* EM LABORATÓRIO (ETAPA 1).

Origem do produto	Momento da coleta	Tempo da multiplicação	Temperatura (°C)	pH
Água	Antes da multiplicação*	-	37,0	6,8
Meio de cultura	Antes da multiplicação*	-	-	-
Pré-inóculo	Antes da multiplicação*	-	19,1	7,6
Multiplicado	T0	10 min	28,7	6,6
	T1	04 h	27,4	6,6
	T2	08 h	25,6	6,8
	T3	12 h	26,4	7,0
	T4	16 h	28,9	6,9

*Amostras coletadas antes do início do processo de multiplicação de *C. subtsugae*.

1.2. Etapa 2.

O objetivo desta etapa foi avaliar o processo de multiplicação de *C. subtsugae* após mudanças estruturais para melhoria da qualidade da água. Neste protocolo, o pré-inóculo utilizado foi produzido no Laboratório de Microbiologia Aplicada a Agricultura do IGA e o meio de cultura SoluFarm Bug® adquirido da empresa fornecedora de insumos *On farm*.

No preparo do pré-inóculo, as colônias puras da bactéria foram adicionadas a um Erlenmeyer de 125 ml contendo meio de cultura Luria Bertani (LB) modificado e incubado em estufa a 32 °C por 24 horas, seguindo metodologia de Monnerat et al. (2020) com modificações. Após este período, para preparar 0,5 L do pré-inóculo, uma alíquota do produto, anteriormente preparado, foi transferida para Erlenmeyer de 1 L com meio de cultura geral e colocado sob agitação constante em incubadora rotativa sob agitação de 180 RPM, 28 °C ± 3 °C por 24 horas.

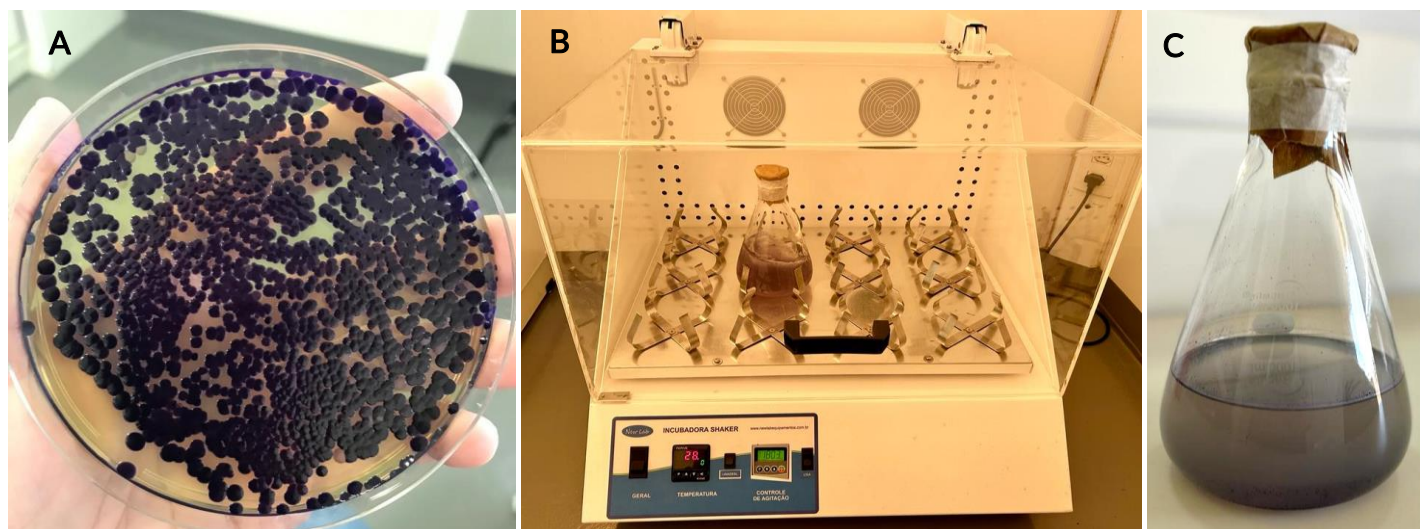


Figura 2. A – Placa de Petri contendo colônias de *C. subtsugae*. B – Preparo do pré-inóculo de *C. subtsugae* sob agitação constante em incubadora shaker. C – Pré-inóculo após 24 horas de agitação em shaker e 48 horas de incubação a 30° C.

Antes do processo de multiplicação do microrganismo, uma metodologia de sanitização semelhante à descrita anteriormente foi utilizada. Além disso, foi realizada uma titulação para determinar o cloro ativo na água em quantidade padrão recomendada para não afetar o crescimento do microrganismo.

A multiplicação foi realizada na Biofábrica de 250 L para obter 100 L do produto multiplicado (*C. subtsugae*). A Biofábrica foi preenchida com 100 L de água, em seguida, adicionado 3 Kg do meio de cultura SoluFarm Bug® e, após agitação por 10 min, inoculada com 1 L do pré-inóculo preparado em laboratório.

Os insumos empregados no processo (água, meio de cultura e pré-inóculo preparado) foram analisados quanto à sua concentração e pureza. Também foram retiradas sete amostras do produto multiplicado de *C. subtsugae* em diferentes tempos (T0, T1, T2, T3, T4, T5 e T6) para verificação do crescimento bacteriano (Tabela 2). Todas as amostras foram coletadas através de uma torneira de amostragem, semelhante à descrita anteriormente. No momento de cada coleta também foi registrada a temperatura e o pH da amostra por meio de um pHmetro de bancada (Tabela 2).

TABELA 2 – RESUMO DOS PARÂMETROS AVALIADOS NO PROCESSO DE MULTIPLICAÇÃO ON FARM DE *C. subtsugae* EM LABORATÓRIO (ETAPA 2).

Origem do produto	Momento da coleta	Tempo da multiplicação	Temperatura (°C)	pH
Água	Antes da multiplicação*	-	-	-
Meio de cultura	Antes da multiplicação*	-	-	-
Pré-inóculo	Antes da multiplicação*	-	24,0	6,7
Multiplicado	T0	10 min	25,0	6,6
	T1	03 h	26,0	6,8
	T2	06 h	26,0	7,3
	T3	09 h	25,0	7,5
	T4	12 h	26,0	7,7
	T5	16 h	25,0	7,9
	T6	24 h	24,0	7,4

*Amostras coletadas antes do início do processo de multiplicação de *C. subtsugae*.

Todas as amostras coletadas foram transportadas para o Laboratório de Microbiologia Aplicada a Agricultura do IGA e analisadas seguindo a metodologia padrão de cada insumo e microrganismo específico.

2. Multiplicação On farm de *C. subtsugae* nas propriedades do Projeto Biofábrica.

O estudo foi realizado em três propriedades produtoras de algodão associadas ao Projeto Biofábrica da Associação Goiana dos Produtores de Algodão (Agopa) com o objetivo de validar o processo de multiplicação On farm de *C. subtsugae* em maior escala utilizando Biofábricas de 1.500 L (Figura 3). Os protocolos realizados nas fazendas foram semelhantes aos protocolos de multiplicação validados no IGA (Etapas 1.1 e 1.2).

As propriedades de estudo foram a Fazenda Onça (GMS Agrícola), localizada no município de Luziânia-GO (coordenadas 16°19'28.0"S e 47°40'13.8"W), a Fazenda Cachoeirinha (Grupo JHS), localizada no município de Caiapônia-GO (coordenadas 17°14'15.6"S e 51°38'45.2"W) e a Fazenda Santa Maria do Mirante (SMM), localizada em Turvelândia-GO (coordenadas 17°48'45.8"S e 50°19'02.1"W).

2.1. Fazenda Onça (GMS).

Inicialmente, antes do processo de multiplicação, foi realizado em todo sistema de produção o protocolo de sanitização para limpeza da Biofábrica, de acordo com o Manual de Multiplicação On Farm e adaptações de sanidades realizadas pelo IGA e pela fazenda. Em seguida, uma Biofábrica (capacidade máxima de 1.500 L) foi preenchida com 1.000 L de água e acrescentado 30 Kg do meio de cultura SoluFarm Bug®. A mistura foi mantida em agitação por 10 minutos para homogeneização. Depois do período, 10 L do pré-inóculo Tec Bug® foi adicionado a Biofábrica, iniciando o processo de multiplicação.

Os insumos utilizados no processo (água, meio de cultura e pré-inóculo Tec Bug®) foram previamente analisados em relação a concentração e pureza (Tabela 3). Também foram retiradas três amostras de *C. subtsugae* em diferentes tempos (T0, T1 e T2) depois do início da multiplicação para avaliação de concentração e pureza (Tabela 3).

As amostras de multiplicação foram coletadas por meio da torneira de amostragem da Biofábrica e armazenadas em tubos de Falcon de 15 ml devidamente esterilizados e identificados. Neste momento foi registrada a temperatura e o pH da amostra. As amostras foram enviadas ao Laboratório de Microbiologia Aplicada a Agricultura do IGA para análise, seguindo a metodologia padrão dos insumos e microrganismo específico.



Figura 3. Biofábrica de 1.500 L para multiplicação de bactérias na fazenda

**TABELA 3 – RESUMO DOS PARÂMETROS AVALIADOS NO PROCESSO DE MULTIPLICAÇÃO ON FARM DE *C. subtsugae* NA FAZENDA ONÇA (GMS).**

Origem do produto	Momento da coleta	Tempo da multiplicação	Temperatura (°C)	pH
Água	Antes da multiplicação*	-	-	-
Pré-inóculo	Antes da multiplicação*	-	-	-
	T0	10 min	24,3	6,7
Multiplicado	T1	14 h	26,4	7,7
	T2	16 h	28,3	7,5

*Amostras coletadas antes do início do processo de multiplicação de *C. subtsugae*.

2.2. Fazenda Cachoeirinha (JHS).

Nesta multiplicação, como todo início de processo, foi realizado o protocolo de sanitização da Biofábrica (Manual de Multiplicação *On farm*) e adaptações. Após o processo, foi realizado mais um processo de filtragem (filtro UV) para melhorar a qualidade da água de multiplicação (padrão recomendado para não afetar o crescimento do microrganismo).

A multiplicação foi realizada na Biofábrica de 1.500 L para obter 1.000 L do produto com *C. subtsugae*. A Biofábrica foi preenchida com 1.000 L de água filtrada. Em seguida, foi adicionado 30 Kg do meio de cultura SoluFarm Bug® e, após agitação por 15 min, 10 L do pré-inóculo Tec Bug® foi adicionado.

Uma amostra do pré-inóculo foi coletada diretamente da embalagem, dias antes da multiplicação para análise da concentração e pureza do produto. Durante a multiplicação, três amostras foram coletadas em diferentes tempos após o início do processo, para avaliar a presença de *C. subtsugae* (Tabela 4). A metodologia de coleta e medição de temperatura e pH de cada amostra foi semelhante à descrita anteriormente. Todas as amostras foram transportadas para análise no Laboratório de Microbiologia Aplicada à Agricultura do IGA.

TABELA 4 – RESUMO DOS PARÂMETROS AVALIADOS NO PROCESSO DE MULTIPLICAÇÃO ON FARM DE *C. subtsugae* NA FAZENDA CACHOEIRINHA (JHS).

Origem do produto	Momento da coleta	Tempo da multiplicação	Temperatura (°C)	pH
Pré-inóculo	Antes da multiplicação*	-	-	-
	T1	08 h	24,0	7,0
Multiplicado	T2	12 h	30,9	6,8
	T3	16 h	27,0	5,5

*Amostras coletadas antes do início do processo de multiplicação de *C. subtsugae*.

2.3. Fazenda Santa Maria do Mirante (SMM).

Inicialmente, foi realizado o protocolo padrão de sanitização para limpeza da Biofábrica com adaptações da fazenda e do IGA. A Biofábrica foi preenchida com 1.000 L de água e 30 Kg do meio de cultura SoluFarm Bug®. Em seguida, a mistura foi agitada por 10 minutos para homogeneização. Após isso, 10 L do pré-inóculo Tec Bug® foi adicionado no processo de multiplicação.

Dos insumos utilizados no processo, uma amostra de água do tanque limpo e uma amostra do pré-inóculo (diretamente na embalagem) foram coletadas para avaliar concentração e pureza do produto (Tabela 5). Para avaliar a presença de *C. subtsugae*, concentração e pureza no processo, uma amostra também foi coletada no final de multiplicação (Tabela 5).

As coletas e análise dos insumos (água e pré-inóculo) e do produto multiplicado seguiram a metodologia descrita anteriormente com medição de temperatura e pH realizada no momento da coleta. As amostras coletadas foram transportadas para serem analisadas no Laboratório de Microbiologia Aplicada a Agricultura do IGA, seguindo a metodologia padrão para análise da água e microrganismo específico.

TABELA 5 – RESUMO DOS PARÂMETROS AVALIADOS NO PROCESSO DE MULTIPLICAÇÃO ON FARM DE *C. subtsugae* NA FAZENDA SANTA MARIA DO MIRANTE (SMM).

Origem do produto	Momento da coleta	Tempo da multiplicação	Temperatura (°C)	pH
Água	Antes da multiplicação*	-	-	-
Pré-inóculo	Antes da multiplicação*	-	-	-
Multiplicado	T1	16 h	32,7	6,9

*Amostras coletadas antes do início do processo de multiplicação de *C. subtsugae*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

1. Multiplicação On farm de *Chromobacterium subtsugae* em Laboratório.

1.1. Etapa 1.

Nas análises realizadas antes do início da multiplicação não foi observada a presença de microrganismos no meio de cultura, mas na análise de água foi observada concentração $<1,0 \times 10^3$ UFC/ml de outros microrganismos (Figura 4 A e B). O pré-inóculo apresentou concentração de $2,3 \times 10^7$ UFC/ml da bactéria *C. subtsugae*, com ausência de outros microrganismos (Figura 4 C).

Em relação ao processo de multiplicação, na amostra T0, coletada aos 10 minutos do processo, a concentração de *C. subtsugae* foi $1,0 \times 10^5$ UFC/ml, e 04 horas após o início da multiplicação (T1) foi observado o mesmo exponencial de 10^5 UFC/ml (Figura 4 D e E). Na amostra T2, após 08 horas do processo, foi observado que *C. subtsugae* atingiu concentração $<2,5 \times 10^6$ UFC/ml. Na avaliação realizada em 12 horas após o início do processo (T3), foi possível observar a multiplicação da bactéria *C. subtsugae*, que alcançou $<1,1 \times 10^8$ UFC/ml (Figura 4 F e G). Após 16 horas do início da multiplicação (T4), a *C. subtsugae* apresentou o maior crescimento atingindo $3,2 \times 10^9$ UFC/ml (Figura 4 H).

Assim, nesta etapa foi observado que a aeração da Biofábrica contribuiu significativamente para o sucesso da multiplicação da bactéria *C. subtsugae*. Nesta etapa foi detectada a presença de carga microbiana na amostra inicial de água, o que pode ter contribuído para que no T2 a concentração de outros microrganismos tenha atingido $>3,0 \times 10^8$ UFC/ml. No T3 e T4, mesmo na presença de alta carga microbiana indesejada, foi possível observar a multiplicação da *C. subtsugae*. Nestas amostras (T3 e T4), o crescimento de outros microrganismos foi de $7,8 \times 10^8$ e $1,7 \times 10^9$ UFC/ml, respectivamente.

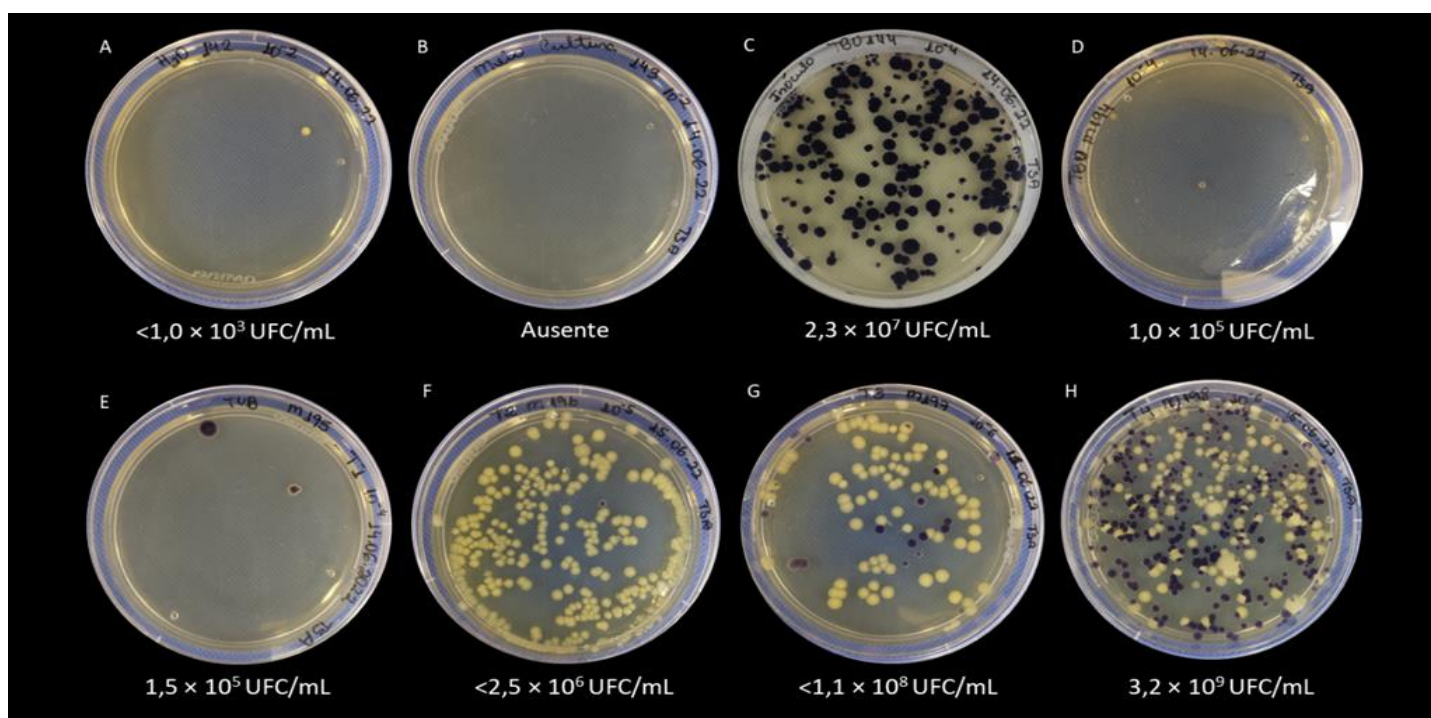


Figura 4. A – Água; B – Meio de cultura; C – Pré-inóculo; D – T0: 10 min. de multiplicação; E – T1: 04h de multiplicação; F – T2: 08h de multiplicação; G – T3: 12h de multiplicação; H – T4: 16h de multiplicação.



1.2. Etapa 2.

As análises do meio de cultura e da água não apresentaram crescimento bacteriano (microrganismos ausentes), nas amostras retiradas antes do início da multiplicação, após melhorias no processo de filtragem da água (Figura 5 A e B). O pré-inóculo (produzido no laboratório do IGA) apresentou concentração de $3,2 \times 10^9$ UFC/ml da bactéria *C. subtsugae*. No entanto, na amostra deste pré-inóculo, foi observada a presença de outros microrganismos (concentração $<5,0 \times 10^7$ UFC/ml) (Figura 5 C).

Em relação à multiplicação, na amostra T0 (10 minutos do início do processo) a concentração da bactéria *C. subtsugae* foi $2,7 \times 10^7$ UFC/ml e na amostra T1 (03 horas após o início de multiplicação) foi observada a concentração $2,0 \times 10^8$ UFC/ml (Figura 5 D e E). Nas amostras T2 e T3 (06 e 09 horas de multiplicação) a bactéria *C. subtsugae* atingiu concentrações de $2,6 \times 10^8$ e $7,7 \times 10^8$ UFC/ml, respectivamente (Figura 5 F e G). Nas três últimas avaliações, realizadas em 12, 16 e 24 horas do início da multiplicação (T4, T5 e T6) foi possível observar que a bactéria *C. subtsugae* atingiu concentrações que variaram de $6,4 \times 10^8$ a $3,9 \times 10^9$ UFC/ml (Figura 5 H, I e J). Assim, com 24 horas do início da multiplicação (T6), a *C. subtsugae* atingiu seu maior crescimento.

Nesta etapa, foi observado que a água filtrada e tratada contribui expressivamente para o aumento na concentração da bactéria *C. subtsugae* durante a multiplicação na Biofábrica. Também foram encontrados outros microrganismos na amostra T0 ($5,5 \times 10^5$ UFC/ml), no início da multiplicação, e em amostras de outros tempos (T2 e T5) que podem estar relacionados, além do processo, aos microrganismos indesejáveis observados no pré-inóculo. A concentração de outros microrganismos atingiu $6,1 \times 10^8$ UFC/ml no tempo final. No entanto, estes microrganismos não afetaram o processo de multiplicação da bactéria *C. subtsugae* durante o estudo.

A presença excessiva de microrganismos indesejáveis compete por nutriente e sua multiplicação pode afetar o pH do meio e interromper a multiplicação da bactéria de interesse. Nas duas etapas do estudo, o pH manteve-se na faixa de 6,6 a 7,6 que é adequada para crescimento da bactéria *C. subtsugae*. Por esse motivo, a presença de outros microrganismos deve ser minimizada ao máximo no início e durante o processo de multiplicação.

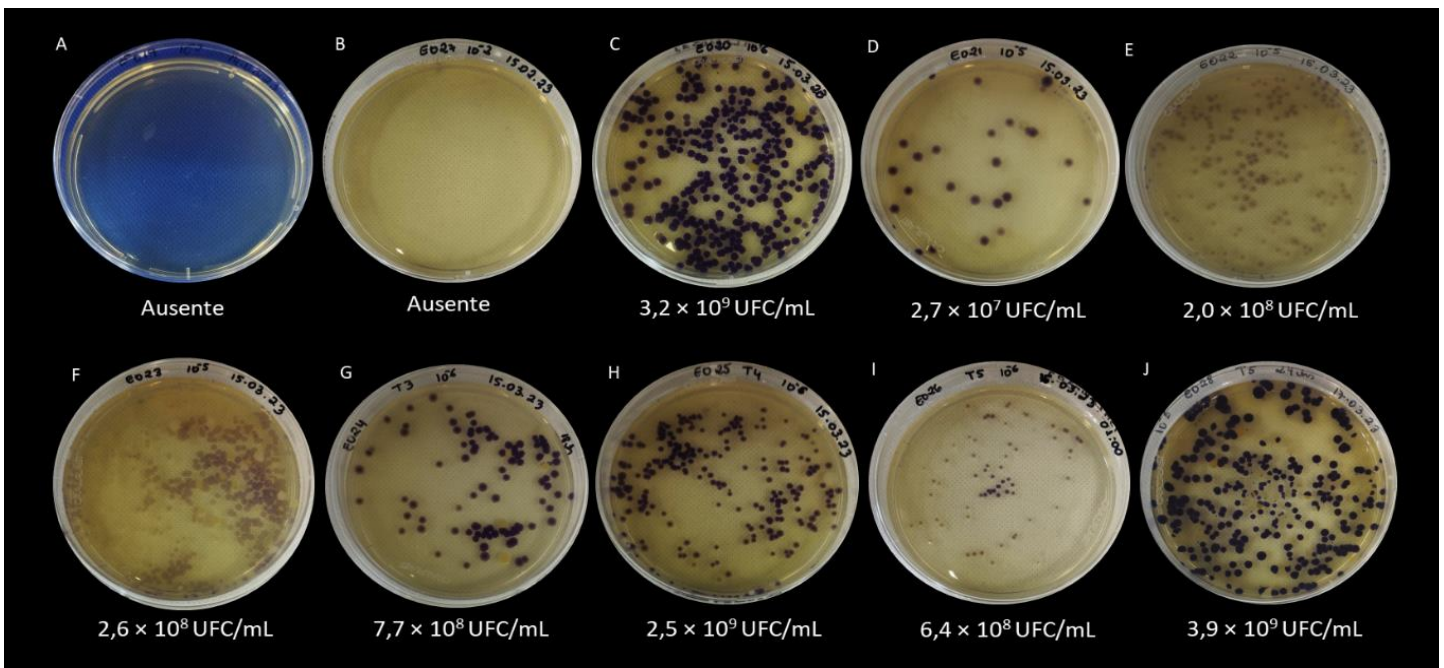


Figura 5. A – Água; B – Meio de cultura; C – Pré-inóculo; D – T0: 10 minutos após a multiplicação; E – T1: 3 horas após a multiplicação; F – T2: 6 horas após a multiplicação; G – T3: 9 horas após a multiplicação; H – T4: 12 horas após a multiplicação; I – T5: 16 horas após a multiplicação; J – T6: 24 horas após a multiplicação.

2. Multiplicação *On farm* de *C. subtsugae* nas fazendas do Projeto Biofábrica.

2.1. Fazenda Onça (GMS).

Na análise de água da biofábrica não foi observada presença de microrganismos “Ausente” (Figura 6 A). O pré-inóculo apresentou concentração de $9,6 \times 10^7$ UFC/ml da bactéria *C. subtsugae*, com ausência de outros microrganismos (Figura 6 B).

Em relação ao processo de multiplicação, na amostra T0, coletada aos 10 minutos do início do processo, foi detectada a presença de *C. subtsugae* na concentração $1,4 \times 10^8$ UFC/ml (Figura 6 C). Na amostra T1, retirada 08 horas após o início do processo, foi observado que *C. subtsugae* atingiu concentração $9,6 \times 10^8$ UFC/ml (Figura 6 D).

A concentração obtida neste período de tempo foi semelhante aos resultados encontrados na Etapa 2 citada anteriormente, no estudo em menor escala de biofábrica. Na amostra T2, coletada após o período de 16 horas de multiplicação, a bactéria *C. subtsugae* apresentou o maior crescimento, atingindo $2,0 \times 10^9$ UFC/ml (Figura 6 E).

Por fim, foi observado que a multiplicação da bactéria *C. subtsugae* pode ser realizada com sucesso em biofábrica de 1.500 L, desde que possua um sistema de aeração adequado. É importante frisar que nesta etapa também foi detectada a presença de microrganismos indesejados na amostra do produto multiplicado em T1 e T2, permanecendo em 10^8 UFC/ml. Porém, o crescimento destes microrganismos indesejados não afetou o crescimento da bactéria de interesse, que se sobressaiu durante o processo em primeiro momento.

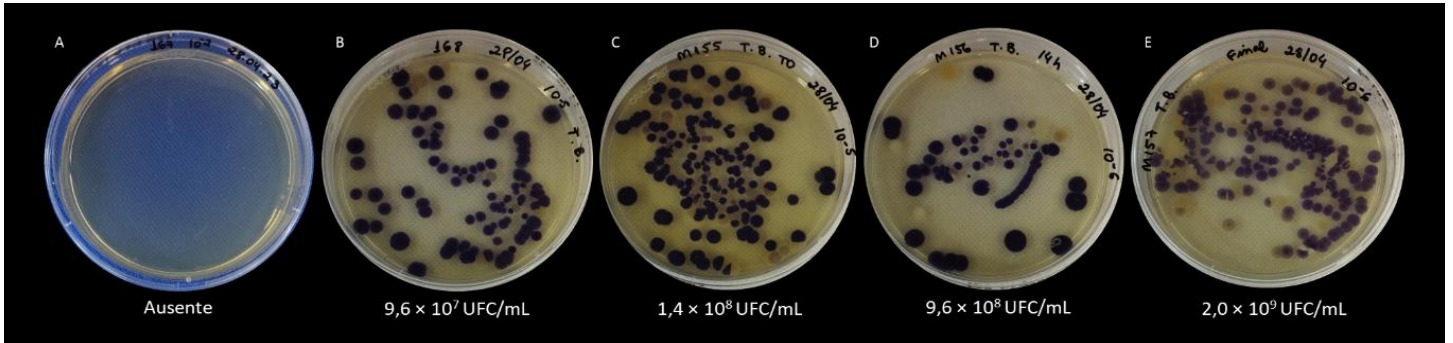


Figura 6. A – Água; B – Pré-inóculo; C – T0: 10 minutos após a multiplicação; D – T1: 14 horas após a multiplicação; E – T2: 16 horas após a multiplicação.

2.2. Fazenda Cachoeirinha (JHS).

O pré-inóculo utilizado nesta etapa do estudo apresentou concentração de $3,2 \times 10^7$ UFC/ml da bactéria *C. subtsugae* (Figura 7 A). Também não foi encontrado nenhum outro microrganismo na amostra.

Na multiplicação da *C. subtsugae*, a amostra T1, coletada 08 horas após o início do processo, continha a bactéria na concentração de $8,0 \times 10^9$ UFC/ml (Figura 7 B). Na amostra T2, extraída 12 horas após do início do processo, foi encontrado *C. subtsugae* na concentração $1,8 \times 10^8$ UFC/ml (Figura 7 C). Neste momento, foi detectado uma pequena redução na concentração da bactéria quando comparado ao primeiro tempo de multiplicação. Na amostra T3, realizada 16 horas após o início da multiplicação, a bactéria de interesse atingiu a concentração de $1,0 \times 10^9$ UFC/ml (Figura 7 D). Assim, após os períodos de 08 e 16 horas de multiplicação foram obtidas as maiores concentrações da bactéria *C. subtsugae*.

Ainda em relação ao estudo, na primeira amostra coletada (T1 - 08 horas) foi detectada a presença de microrganismos indesejados de $8,5 \times 10^7$ UFC/ml. O mesmo foi observado nas amostras T2 e T3, que apresentaram concentração de outros microrganismos na concentração de 10^7 UFC/ml. Essa contaminação pode estar relacionada ao processo de sanitização, ao manejo durante a manipulação dos insumos, ambiente ou ainda a água utilizada, já que não foi realizada análise prévia de pureza. No entanto, a presença de outros microrganismos não afetou o crescimento da bactéria de interesse (Figura 7 D).

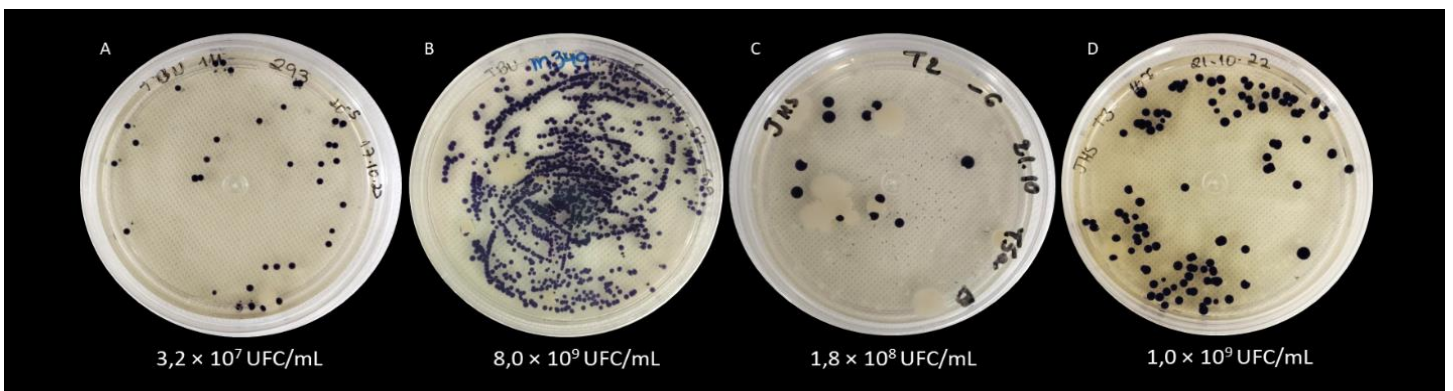


Figura 7. A – Pré-inóculo; B – T1: 8 horas após a multiplicação; C – T2: 12 horas após a multiplicação; D – T3: 16 horas após a multiplicação.

2.3. Fazenda Santa Maria do Mirante (SMM).

Na análise de água da biofábrica, não houve presença de outros microrganismos “Ausente” (Figura 8 A). O pré-inóculo da bactéria *C. subtsugae* apresentou concentração de $7,3 \times 10^7$ UFC/ml, com ausência de outros microrganismos (Figura 8 B).



Na amostra T1, retirada 16 horas após o início do processo de multiplicação, foi observado alto crescimento bacteriano, que atingiu $3,4 \times 10^9$ UFC/ml de concentração (Figura 8 C).

Nas condições instaladas foi possível observar que a amostra de água, coletada após o processo de sanitização e preenchimento da Biofábrica, não possuía contaminação, comprovando que foi realizada uma eficiente sanitização, pois a qualidade da água não foi afetada. O pré-inóculo puro, com ausência de outros microrganismos, contribuiu positivamente para o sucesso da multiplicação da *C. subtsugae*. Portanto, ao seguir toda a metodologia padrão de qualidade na multiplicação, foi possível produzir a bactéria *C. subtsugae* com alto crescimento ($3,4 \times 10^9$ UFC/ml) após 16 horas de multiplicação na fazenda (Figura 8 C).

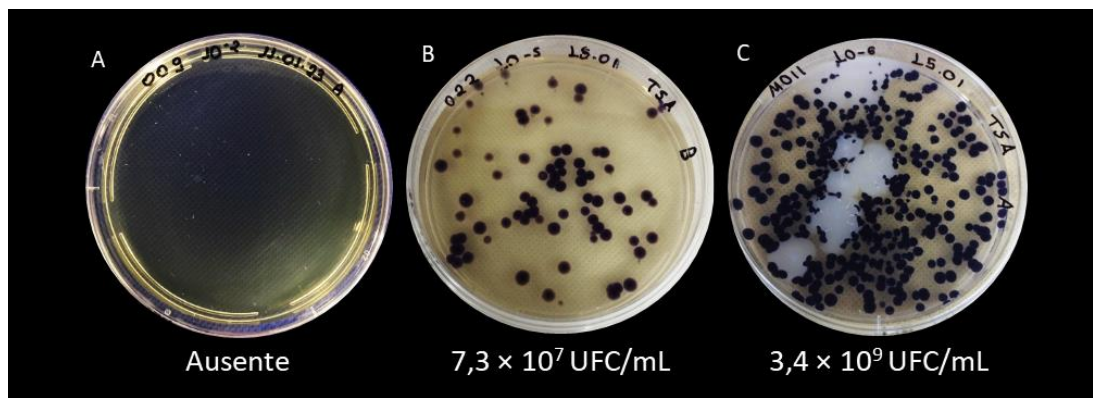


Figura 8. A – Água da Biofábrica; B – Pré-inóculo; C – T1: 16 horas após a multiplicação.

CONCLUSÃO:

A partir dos resultados obtidos, conclui-se que é possível produzir a bactéria *C. subtsugae* em alta concentração no processo de multiplicação *On farm* e que, nos estudos, o tempo de 16 horas do processo de multiplicação foi o mais significativo, tanto no laboratório do IGA quanto nas três biofábricas instaladas nas fazendas do Projeto Biofábricas.

Também foi possível concluir que, ao seguir corretamente os protocolos de sanitização, o número de microrganismos indesejáveis no processo pode ser reduzido e os parâmetros ideais para o crescimento de *C. subtsugae*, mantidos. Mais estudos serão necessários para investigar as causas de contaminação durante a multiplicação, visto que podem ser atribuídos aos fatores que compõem o sistema, como manejo inadequado dos colaboradores, capacidade do filtro de ar e outras fontes de contaminação da água.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

AGROFIT – Sistemas de agrotóxicos fitossanitários.

Disponível em: <https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons> Acesso em: 24 de maio de 2023.

ASOLKAR, R.; HUANG, H.; KOIVUNEN, M.; MARRONE, P. *Chromobacterium* Bioactive Compositions and Metabolites. US Patent Application Publication, US 14/293,728, 9 October 2014.

FARIA, M., MASCARIN, G. M., BUTT, T., & LOPES, R. B. (2023). On-farm production of microbial entomopathogens for use in agriculture: Brazil as a case study. *Neotropical Entomology*, 1-12.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inovacao/bioinsumos/o-programa>> Acesso em: 24 de maio de 2023.

MARTIN, P.A.W., GUNDERSEN-RINDAL, D., BLACKBURN, M. AND BUYER, J. 2007a: *Chromobacterium subtsugae* sp. nov., a betaproteobacterium toxic to Colorado potato beetle and other insect pests. *Int. J. Syst. Evol. Microb.* 57: 993-999.

MARTIN, P.A.W., HIROSE, E., AND ALDRICH, J.R. 2007B: Toxicity of *Chromobacterium subtsugae* to southern green stink bug (Heteroptera: Pentatomidae) and corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol.* 100: 680-684.

MONNERAT, R. et al. 2020. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/213246/1/documentos-36916.pdf>>. Acesso em: 21 jul. 2023.

KOIVUNEN, M., CHANBUSARAKUM, L., FERNÁNDEZ, L., ASOLKAR, R., TAN, E., WALLNER, D., & MARRONE, P. (2009). Development of a new microbial insecticide based on *Chromobacterium subtsugae*. *IOBC/wprs Bulletin*, 45, 183-186.

DIRETORIA E CONSELHO FISCAL: BIÊNIO 2023/2024

Diretoria

Presidente: **Haroldo Rodrigues da Cunha**

1º Vice-Presidente: **Carlos Alberto Moresco**

2º Vice-Presidente: **Marcelo Jony Swart**

1º Secretário: **Marcelo Peglow**

2º Secretário: **Gabriel Bindewald Schlatter**

1º Tesoureiro: **Paulo Kenji Shimohira**

2º Tesoureiro: **Cássio Sitta**

Diretor Executivo: **Dulcimar Pessatto Filho**

Conselho Fiscal

1º Titular: **Morelos Thiago Verlage Mesquita**

2º Titular: **Sandra Marina Paschoaletti**

3º Titular: **Roland van de Groes**

1º Conselheiro Suplente do Conselho Fiscal: **Luiz Renato Zapparoli**

COMITÊ TÉCNICO- CIENTÍFICO (CTC): BIÊNIO 2023/2024

Presidente do CTC:

Haroldo Rodrigues da Cunha

Vice-Presidente do IGA:

Carlos Alberto Moresco

Pesquisador em Entomologia e Plantas Daninhas do IGA:

Robério Carlos dos Santos Neves

Pesquisador em Fitotecnia e Solos do IGA:

Antônio Jussié Silva Solino

Pesquisadora em Fitopatologia e Nematologia do IGA:

Lais Fernanda Fontana

Chefe de Pesquisa e Desenvolvimento da Embrapa Arroz e Feijão:

Ana Luiza Dias Coelho Borin

Consultor agrônomo do IGA:

Wanderley Katsumi Oishi

Diretor Elisa Agro Sustentável:

Edson Rodrigo Vendruscolo

Diretor Aprosoja Goiás:

Charles Louis Peeters

Consultor agrônomo - Grupo Schlatter:

André Luis Silva

Gerente Faz. Pamplona - SLC Agrícola:

Marcelo Peglow

Gerente - Grupo FMA:

Carlos Eduardo Elias Teixeira

AGRADECIMENTO:

AO INSTITUTO BRASILEIRO DO ALGODÃO (IBA) PELO FINANCIAMENTO DESTA PESQUISA POR 3 ANOS.

Realização



Laboratório de
**Microbiologia Aplicada
à Agricultura**

Apoio Institucional

