

AVALIAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA ALTERNATIVOS PARA MULTIPLICAÇÃO ON FARM DE BIOINSUMOS A BASE DE *BACILLUS THURINGIENSIS* PARA USO NA AGRICULTURA

EVALUATION OF ALTERNATIVE CULTURE MEDIA FOR ON-FARM MULTIPLICATION OF *BACILLUS THURINGIENSIS*-BASED BIOINPUTS FOR USE IN AGRICULTURE

Jéssica Carolina Dessibio Vidotto¹
Eduarda Leite Correia²
Vinícius Augusto Moreira Ribeiro³
Marcela Pavan Bagagli⁴

RESUMO

O número de registros de bioinsumos no Brasil tem se mostrado crescente, uma vez que estes insumos proporcionam menor impacto ambiental e menores custos, além de serem uma alternativa sustentável à aplicação de produtos sintéticos. Dentre os bioinsumos de origem microbiana, as bactérias do gênero *Bacillus* são amplamente aplicadas na agricultura, sendo o *Bacillus thuringiensis* (Bt) a bactéria mais utilizada globalmente no controle de pragas. Entretanto, na produção de bioinsumos de origem microbiológica, os meios de cultura são responsáveis por grande parte do custo produtivo. Desse modo, este trabalho visou à avaliação de meios de cultura alternativos para cultivar Bt. A esporulação das bactérias foi quantificada em sete meios de cultura líquidos, tendo como fonte principal de carbono melaço de cana-de-açúcar, glicose, sacarose ou amido e, como fonte de nitrogênio, farelo de soja e extrato de levedura. Ainda foi avaliado o cultivo em meio sólido composto por arroz e água. Por fim, o meio contendo melaço de cana-de-açúcar e extrato de levedura foi avaliado quanto ao preparo em presença de cloro ativo. Ao fim dos ensaios, concluiu-se que todos os meios testados foram efetivos para o crescimento de Bt, apresentando contagem de esporos na ordem de 10^6 UFC mL⁻¹ a 10^9 UFC mL⁻¹, sem contaminação por bactérias Gram-negativas. Esses meios se tornam, portanto, opções viáveis para

¹Mestranda em Engenharia Agrícola. Universidade Estadual de Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Faculdade de Ciências Agrônômicas. Botucatu. São Paulo. Brasil. E-mail: jessica.vidotto@unesp.br. ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-0079-9201>.

²Graduanda em Engenharia de Biossistemas. Instituto Federal de Ciência, Educação e Tecnologia de São Paulo. Avaré. São Paulo. Brasil. E-mail: eduarda.correia@aluno.ifsp.edu.br. ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-6917-0534>.

³Mestrando em Ciência, área de concentração em Microbiologia Agrícola. Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba. São Paulo. Brasil. E-mail: viniciusaugustorm1@gmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0009-0008-4029-0301>.

⁴Doutora em Ciência dos Alimentos. Professora do curso de Engenharia de Biossistemas Instituto Federal de Ciência, Educação e Tecnologia de São Paulo. Avaré. São Paulo. Brasil. E-mail: marcela.bagagli@ifsp.edu.br. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1245-4953>.

a multiplicação *on farm* de microrganismos para agricultura por utilizarem insumos de baixo custo e fácil acesso.

Palavras-chave: controle biológico; biopesticida; fermentação submersa.

ABSTRACT

The number of bio-input registrations in Brazil has been growing, as these inputs have a lower environmental impact and lower costs, as well as being a sustainable alternative to the application of synthetic products. Among bio-inputs of microbial origin, bacteria of the *Bacillus* genus are widely applied in agriculture, with *Bacillus thuringiensis* (Bt) being the most widely used bacterium globally in pest control. However, in the production of bio-inputs of microbiological origin, the culture media are responsible for a large part of the production cost. This work therefore aimed to evaluate alternative culture media for Bt cultivars. Bacterial sporulation was quantified in seven liquid culture media, with sugarcane molasses, glucose, sucrose or starch as the main carbon source and soybean meal and yeast extract as the nitrogen source. Cultivation in a solid medium composed of rice and water was also evaluated. Finally, the medium containing sugar cane molasses and yeast extract was evaluated for its preparation in the presence of active chlorine. At the end of the tests, it was concluded that all the media tested were effective for the growth of Bt, with spore counts in the order of 10^6 UFC mL⁻¹ to 10^9 UFC mL⁻¹, without contamination by Gram-negative bacteria, making them viable options for the on-farm multiplication of microorganisms for agriculture as they use low-cost and easily accessible inputs.

Key words: biological control; biopesticide; submerged fermentation.

Artigo recebido em: 27/03/2025

Artigo aprovado em: 10/09/2025

Artigo publicado em: 30/09/2025

Doi: <https://doi.org/10.24302/sma.v14.5903>

INTRODUÇÃO

Os bioinsumos são produtos, processos ou tecnologias de origem vegetal, animal ou microbiana que são destinados à promoção de crescimento, desenvolvimento e controle biológico em atividades agropecuárias. A aplicação desses insumos biológicos na agricultura tem se mostrado crescente devido à baixa toxicidade, biodegradabilidade e menor custo. Além disso, podem ser utilizado para diversos fins, como promotores de fertilidade do solo e controle de pragas e doenças, oferecendo uma alternativa ao uso de produtos sintéticos (1–3). Cabe destacar que em 2020, houve um estímulo à utilização desses insumos biológicos, por meio da criação do Programa Nacional de Bioinsumos (1), e, em dezembro de 2024, foi publicada a lei 15.070 que dispõe sobre a produção de bioinsumos, incluindo para uso próprio, popularmente denominada de *on farm* (4).

Dentre os agentes microbianos, as bactérias do gênero *Bacillus*, estão entre as mais utilizadas como bioinsumos. O *Bacillus thuringiensis* (Bt) tem sido a bactéria mais aplicada no controle de pragas agrícolas (5,6) por ser eficiente no controle de insetos das ordens Coleoptera, Diptera, Hymenoptera e Lepidoptera, e de alguns nematóides, sendo inócuas aos mamíferos, vertebrados e plantas. A função pesticida do Bt ocorre devido à produção de grandes inclusões proteicas durante sua esporulação, consistem em toxinas cristalinas (Cry) e citolíticas (Cyt), conhecidas como δ -endotoxinas. Estas, ao serem ingeridas, lisam as células epiteliais do intestino médio do hospedeiro, formando poros em seu intestino e levando a uma septicemia grave, que resulta na morte do inseto (5–9).

O crescimento do uso de bioinsumos contribuiu para que propriedades agrícolas despertassem interesse em produzi-los para uso próprio, atividade conhecida como produção *on farm* (10) e que constitui uma opção de menor custo e maior praticidade para os produtores agrícolas, uma vez que não é necessário o transporte e armazenamento dos produtos (5). Quanto ao inóculo para a produção, observa-se frequentemente o uso de produtos comerciais como base (10), no entanto, essa prática foi proibida pela Lei nº 15.070 de dezembro de 2024 (4).

É possível classificar uma produção *on farm* em três principais modelos, sendo eles os de alto, médio e baixo investimento. Em produções de alto investimento, há tecnologia e procedimentos semelhantes aos encontrados em uma indústria biotecnológica, enquanto que, em produções de baixo investimento, é possível observar construtivos e procedimentos mais simples. Neste caso, nota-se um impacto direto na qualidade do produto final, o qual pode causar riscos à saúde ou possuir menor ou nenhuma eficácia. Por fim, o modelo de médio investimento, um meio termo entre os dois descritos anteriormente, tem a possibilidade de gerar produtos satisfatórios, porém com presença de contaminantes. Nesse sentido, torna-se necessária, em alguns casos, a aplicação de volumes elevados do produto para se obter os efeitos desejados em campo (2,11–14).

Para um bom cultivo de Bt, é essencial a utilização de meios de cultura com balanço adequado de carbono e nitrogênio, além de minerais e vitaminas, sendo possível o cultivo por fermentação submersa ou em estado sólido (5,15–17). Os meios de cultura representam aproximadamente 30% dos custos dos processos fermentativos (18, 19). Desse modo, é preciso buscar por meios de cultura alternativos, de baixo custo, que proporcionem alta produtividade e que sejam acessíveis para a produção *on farm* (11,12,20,21).

Este trabalho avaliou a formulação de meios de cultura para a bactéria *Bacillus thuringiensis* em comparação ao meio de cultura proposto por Monnerat (5), os quais foram avaliados quanto aos custos e à concentração de esporos do microrganismo.

METODOLOGIA

O *Bacillus thuringiensis* utilizado foi isolado do produto comercializado pela empresa AGRINOR fertilizantes e mantido no laboratório de microbiologia do Instituto

Federal de São Paulo, campus Avaré, em slants de ágar nutriente recobertos por vaselina líquida sob refrigeração (5°C).

O trabalho avaliou meios de cultura para cultivo de Bt por fermentação submersa: melaço de cana-de-açúcar, extrato de malte, amido de milho, sacarose, extrato de levedura microbiológico, extrato de levedura alimentício, farelo de soja desengordurado e farelo de soja micronizado. Todos os meios tiveram pH ajustado para $7,0 \pm 0,2$ utilizando NaOH 1M ou HCl 1M. Foi avaliado, também, o cultivo por fermentação em estado sólido. Nesse caso, utilizou-se o meio composto por arroz tipo 1 adicionado de água (1:1, m:v), conforme mostra a Tabela 1. Os ensaios foram comparados com os obtidos no cultivo do Bt no meio proposto por Monnerat et al. (2020) (5).

As fermentações submersas foram conduzidas em triplicata em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo, inoculados com 3 cilindros (1,5 cm de diâmetro) de ágar Embrapa Sólido (5) completamente recoberto por Bt (cultivo por 48h a 28°C). Os Erlenmeyers foram autoclavados a 121°C por 15 min. Por fim, os frascos foram incubados em um agitador orbital a 28°C e 200 rpm durante 72 horas, com amostragens realizadas nos tempos 0, 48 e 72 horas.

A fermentação em estado sólido também foi conduzida em triplicata em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contudo, com 20 g de arroz cru e 20 mL de água de torneira, cujo cozimento ocorreu durante a esterilização a 121 °C por 15 minutos. Na inoculação, adicionou-se 20 mL de água estéril ao meio e 3 cilindros de ágar (1,5 cm de diâmetro) recobertos com Bt, cultivado da mesma forma descrita para a fermentação submersa. Os ensaios foram mantidos em uma incubadora a 28°C durante 7 dias. Após esse período, realizou-se a extração de esporos por meio da adição de 50 mL de água estéril em cada réplica. Depois de agitá-la por 10 minutos, foi realizada a amostragem do extrato.

Tabela 1 – Composição dos meios de cultivo avaliados para multiplicação de *Bacillus thuringiensis*.

Meio de cultura	Principal fonte de carbono	Principal fonte de nitrogênio	Sais
Embrapa	10 g L ⁻¹ caldo nutriente	1 g L ⁻¹ extrato de levedura laboratorial	1 g L ⁻¹ fosfato de potássio monobásico + 10 mL L ⁻¹ solução de sais minerais (10 g carbonato de cálcio + 10 g sulfato de magnésio hepta hidratado + 1 g sulfato de ferro hepta hidratado + 1 g sulfato de manganês hidratado + 1 g sulfato de zinco hepta hidratado + 1 L água destilada)
Melaço + Extrato de Levedura Microb. (ML1)	15 g L ⁻¹ melaço de cana-de-açúcar	10 g L ⁻¹ extrato de levedura laboratorial	0,25 g L ⁻¹ fosfato de potássio monobásico + 1,42 g/L fosfato de potássio dibásico
Melaço + Extrato de Levedura Aliment. (ML2)	15 g L ⁻¹ melaço de cana-de-açúcar	10 g L ⁻¹ extrato de levedura alimentício	0,25 g L ⁻¹ fosfato de potássio monobásico + 1,42 g/L fosfato de potássio dibásico
Melaço + Farelo Soja (MS)	40 g L ⁻¹ melaço de cana-de-açúcar	30 g L ⁻¹ farelo de soja	1 g L ⁻¹ fosfato de potássio monobásico

Meio de cultura	Principal fonte de carbono	Principal fonte de nitrogênio	Sais
Melaço + Farelo Soja Micronizada (MSm)	15 g L ⁻¹ melaço de cana-de-açúcar	10 g L ⁻¹ farelo de soja micronizada	0,25 g L ⁻¹ fosfato de potássio monobásico + 1,42 g/L fosfato de potássio dibásico
Sacarose + Extrato Malte + Extrato Levedura Aliment. (SML)	20 g L ⁻¹ sacarose	10 g L ⁻¹ extrato de malte + 4 g L ⁻¹ extrato de levedura alimentício	0,25 g L ⁻¹ fosfato de potássio monobásico + 1,42 g L ⁻¹ fosfato de potássio dibásico
Sacarose + Amido + Farelo Soja (SAS)	10 g L ⁻¹ sacarose + 20 g L ⁻¹ amido de milho	30 g L ⁻¹ farelo de soja	1 g L ⁻¹ fosfato de potássio monobásico
Arroz	20 g Arroz	-	-

A contagem de esporos foi realizada conforme metodologia descrita por Monnerat (5). Assim, uma alíquota de amostra sem diluição foi submetida a choque térmico em banho termostático à 80°C por 12 minutos e, em seguida, a um banho de gelo por 5 minutos, a fim de eliminar células vegetativas e manter apenas os esporos viáveis. Posteriormente, foram realizadas diluições decimais seriadas da amostra e foram semeados 100 µL da diluição desejada em placas de Petri contendo Meio Embrapa Sólido. As placas foram mantidas em estufa a 28°C por 24 h e, então, foram contadas as unidades formadoras de colônias. A quantificação de unidades formadoras de colônia por mL de amostra foi calculada de acordo com a Equação 1.

$$E_{\text{esporos}} \left(\frac{UFC}{ml} \right) = \frac{\text{número médio de colônias nas placas} \times \text{fator de diluição}}{\text{volume de amostra semeado (ml)}} \quad \text{Equação 1}$$

Na sequência, foi calculado o aumento da concentração de esporos por volume de meio de cultivo, sendo expressa em aumento de ciclos logarítmicos (base 10), e a taxa de produção de esporos (UFC/h)

Ademais, foi medido o pH das amostras com pHmetro de bancada, previamente calibrado e, ao microscópio óptico, foram observadas lâminas com coloração Gram e coloração de esporos (22).

O levantamento do custo dos meios de cultura utilizados se deu a partir de cotações realizadas no período de 10 a 20 de fevereiro de 2025, em 3 fornecedores de produtos laboratoriais. Considerou-se o preço de varejo e os resultados apresentados referem-se à média das cotações.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e apresentados como média ± desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas usando ANOVA, com o auxílio do software R (R Foundation for Statistical Computing, Viena, Áustria) versão 4.1.0, e, na comparação das médias, foi utilizado o teste Tukey com 95% de confiança.

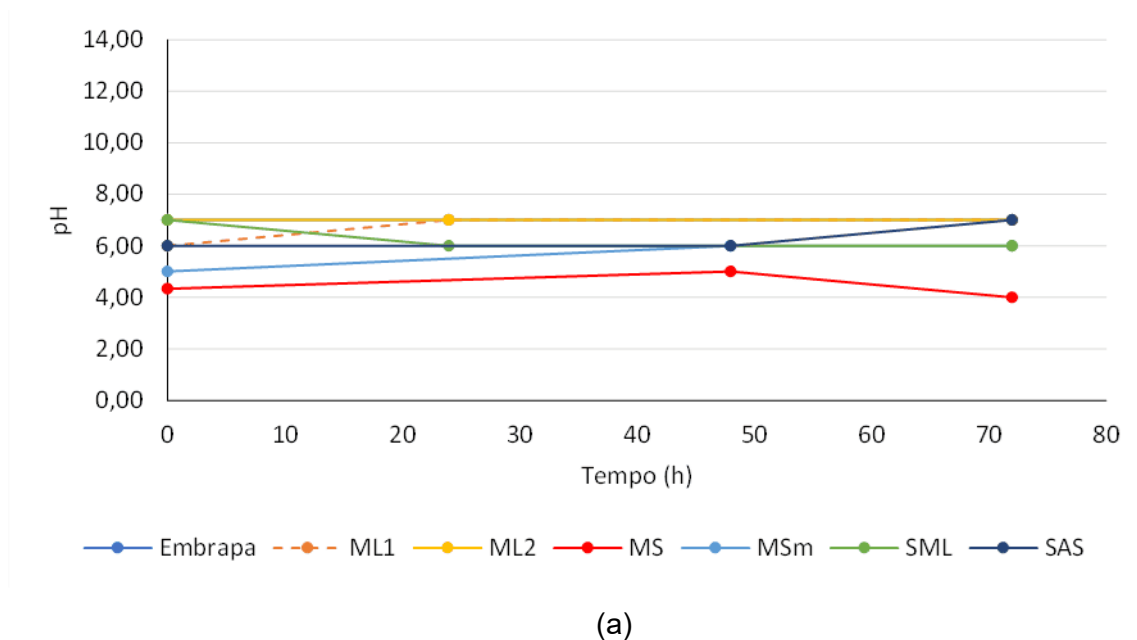
RESULTADOS

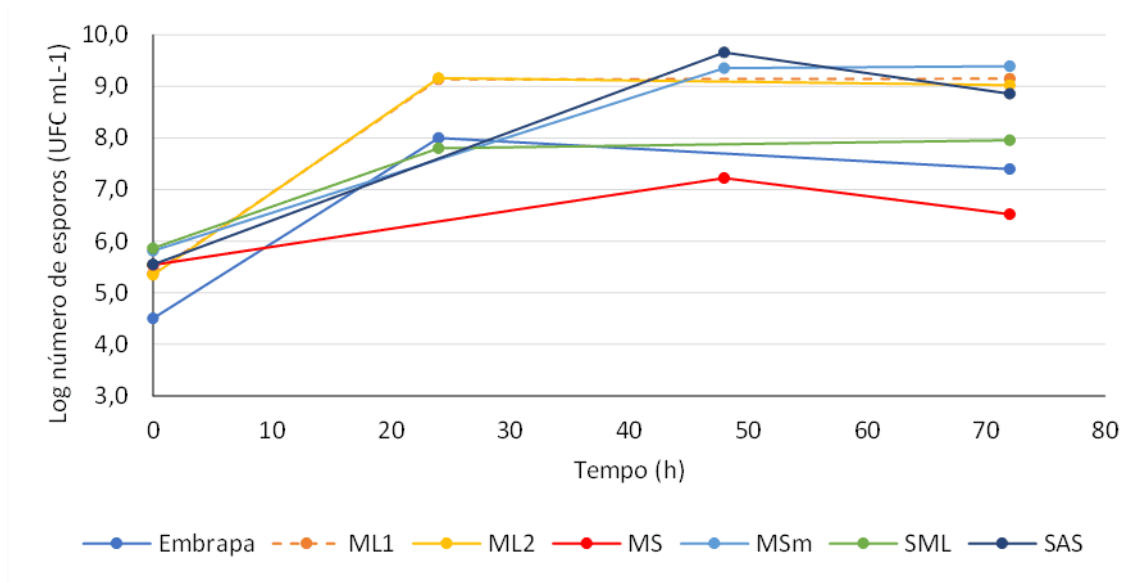
Os resultados de pH obtidos ao decorrer dos ensaios de fermentação submersa oscilaram entre 4,0 e 7,0 e estão detalhados na Figura 1, juntamente com as médias de contagem de esporos de *Bacillus thuringiensis*.

Os extratos obtidos da fermentação em estado sólido, tendo como substrato arroz tipo 1, apresentaram pH de 5,0 e média de contagem de esporos de $5,63 \times 10^8 \pm 7,04 \times 10^7$ UFC mL⁻¹ ou $1,41 \times 10^9 \pm 1,76 \times 10^8$ UFC g⁻¹ de substrato seco.

Os valores médios das contagens de esporos após 72 horas de ensaio estão expressos na Tabela 2, bem como a contagem obtida no extrato da fermentação em estado sólido após 7 dias de cultivo.

Figura 1 - (a) Valores médios para o pH e (b) contagem de esporos de *Bacillus thuringiensis* ao longo das fermentações submersas.





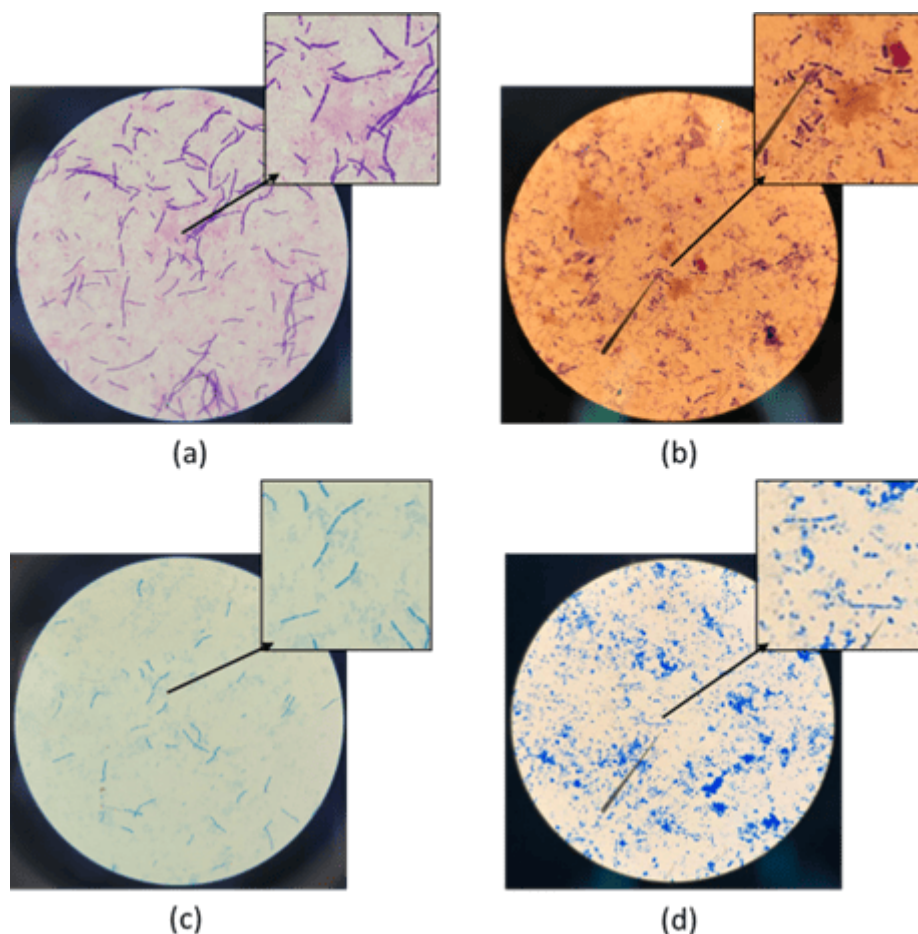
(b)

Em relação à microscopia óptica, ao observar as lâminas submetidas à coloração de Gram (Figura 2a e 2b), constatou-se que, para todos os ensaios, não houve contaminação por bactérias Gram-negativas. Foi possível também identificar células típicas de *Bt*. Nas lâminas com coloração de esporos, a partir do uso de corante azul de Coomassie, foi possível visualizar células esporuladas, esporos e cristais (Figura 2c e 2d).

Tabela 2 – Contagem média de esporos de *Bacillus thuringiensis* ao final de cada ensaio e respectivo desvio-padrão (letras iguais indicam que não houve diferença significativa ao nível de 5% de significância pelo teste Tukey), aumento médio em ciclos logarítmicos (base 10) para a contagem de esporos e taxa de crescimento (UFC h⁻¹) do microrganismo.

Meio de cultivo	Contagem de esporos ao término dos ensaios (UFC mL ⁻¹)	Aumento em ciclos logarítmicos (base 10)	Taxa de crescimento (UFC h ⁻¹)
Embrapa	2,50x10 ⁷ ± 7,07x10 ⁶ bc	2,9	3,47x10 ⁵
ML1	1,40x10 ⁹ ± 2,78x10 ⁸ ab	3,8	1,94x10 ⁷
ML2	1,06x10 ⁹ ± 1,37x10 ⁸ bc	3,7	1,46x10 ⁷
MS	3,33x10 ⁶ ± 5,77x10 ⁶ c	1,0	4,41x10 ⁴
MSm	2,46x10 ⁹ ± 1,28x10 ⁹ a	3,6	3,41x10 ⁷
SML	9,00x10 ⁷ ± 1,00x10 ⁷ bc	2,1	1,24x10 ⁶
SAS	7,20x10 ⁸ ± 8,70x10 ⁸ bc	3,3	1,00x10 ⁷
Arroz	5,63x10 ⁸ ± 7,04x10 ⁷ bc	-	3,35x10 ⁶

Figura 2 – Lâminas de Bt em ampliação de 1000x a) com coloração de Gram após 72 horas em fermentação submersa em meio de cultura ML2, b) com coloração de Gram após 7 dias em fermentação em estado sólido (arroz), c) coradas com corante de esporos após 72 horas em fermentação submersa em meio de cultura ML2 e d) coradas com corante de esporos após 7 dias em fermentação em estado sólido (arroz).



Em relação ao custo dos insumos utilizados nos meios, a Tabela 3 descreve o custo para a produção de Bt por litro de meio de cultura e por contagem de esporos dos microrganismos, considerando 10^{12} UFC de esporos que é um valor típico para a aplicação por hectare (23–25).

Tabela 3 - Preço médio por litro dos meios de cultivo avaliados e para a concentração de 10^{12} esporos.

Meio de cultivo	Preço L ⁻¹	Preço (10^{12} esporos Bt) ⁻¹
Embrapa	R\$ 8,20	R\$ 328,00
ML1	R\$ 7,39	R\$ 5,28
ML2	R\$ 1,58	R\$ 1,49
MS	R\$ 0,55	R\$ 165,17
MSm	R\$ 0,47	R\$ 0,19
SML	R\$ 7,83	R\$ 87,00
SAS	R\$ 0,72	R\$ 1,00
Arroz	R\$ 2,50	R\$ 4,44

DISCUSSÃO

De forma geral, os resultados apresentaram aumento na concentração de esporos ao longo das fermentações, indicando que houve crescimento significativo nos meios de cultura propostos e que o Bt foi capaz de esporular.

Os meios compostos por melaço e farelo de soja micronizado ou melaço e extrato de levedura apresentaram as maiores contagens após 72h de incubação, atingindo contagem de esporos superior a 10^9 UFC mL⁻¹, valores muito próximos da especificação de referência para produtos fitossanitários à base de Bt para agricultura orgânica (23). Não houve diferença entre os meios formulados com extrato de levedura microbiológico e alimentício, sendo que este último apresenta custo mais acessível aos produtores rurais.

O meio MS apresentou as menores contagens de esporos, no entanto, o pH ficou baixo, próximo a 5,0 para o início da fermentação, valor este que não é desejado para o Bt e que pode ter afetado o rendimento da fermentação (5). Além disso, o farelo de soja apresenta teor de lipídios ainda elevado, o que também pode ter interferido nos resultados (26).

Embora a fermentação em estado sólido tenha sido mais lenta do que as avaliadas em fermentação submersa, a quantidade de cristais observadas na microscopia óptica foi marcante. Lima-Pérez (16) observou que o cultivo de *Bacillus thuringiensis* var *kurstoki* HD-73 em estado sólido apresentou maior produção de biomassa e cristais quando comparado à fermentação submersa utilizando o mesmo meio de cultivo.

Desse modo, foi possível constatar que todos os meios propostos são efetivos para o crescimento de Bt, visto que apresentaram contagem de esporos superior a 10^6 UFC mL⁻¹ ao fim dos experimentos, assim como, não manifestaram contaminação por bactérias Gram-negativas.

Os resultados apontam que todos os meios propostos apresentaram menor preço do que o meio de cultura convencional e que o meio MSm resultou ter o menor custo e a maior produção de esporos em relação aos demais.

CONCLUSÃO

Em síntese, pode-se concluir que todos os meios propostos foram efetivos para o crescimento de *Bacillus thuringiensis*, uma vez que apresentaram contagem de esporos superior a 10^6 UFC mL⁻¹, e são, portanto, alternativas para a utilização na produção *on farm* de bioinsumos. Destaca-se também, que o meio composto por melaço de cana-de-açúcar e soja micronizada (MSm) que obteve a maior produtividade, com uma contagem de esporos superior a 10^9 UFC mL⁻¹ após 72 h de cultivo e foi o meio com menor preço de formulação.

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. 2020. Decreto nº 10.375, de 26 de maio de 2020. Institui o Programa Nacional de Bioinsumos e o Conselho Estratégico do Programa Nacional de Bioinsumos. Available at: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2020/decreto/d10375.htm
2. Santos AFJ, Dinna SSE, Feitoza AFA. Qualidade microbiológica de bioprodutos comerciais multiplicados *on farm* no Vale do São Francisco: Dados preliminares. Enciclopédia Biosf. 2020;17(34):429.
3. Embrapa. Portfólio insumos biológicos. 2021. p. 1–2.
4. Brasil. Lei nº 15.070, de 23 de dezembro de 2024. 2024. Available at: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2023-2026/2024/lei/l15070.htm
5. Monnerat R, Montalvão SCL, Martins ES, Queiroz PRM, Silva EYY, Garcia ARM, et al. Manual de produção e controle de qualidade de produtos biológicos à base de bactérias do gênero *Bacillus* para uso na agricultura. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnol. 2020;1–46. Available at: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1122563/1/documentos-36916.pdf>
6. Fontes EMG, Valadares-Inglis MC. Controle biológico de pragas da agricultura. Brasília, DF: Embrapa; 2020.
7. Bravo A, Soberón M, Gill SS. *Bacillus thuringiensis*: Mechanisms and Use. In: Comprehensive Molecular Insect Science. Elsevier; 2005. p. 175–205.
8. Astuto MC, Cattaneo I. *Bacillus thuringiensis*. Ref Modul Biomed Sci. 2023.
9. Bel Y, Ferré J, Hernández-Martínez P. *Bacillus thuringiensis* Toxins: Functional Characterization and Mechanism of Action. Toxins (Basel). 2020;12(12). Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33321796/>
10. Embrapa. Portal Embrapa. Produção de microrganismos para uso próprio na agricultura (*on-farm*) - Esclarecimentos Oficiais - Portal Embrapa; 2021. Available at: https://www.embrapa.br/esclarecimentos-oficiais/-/asset_publisher/TMQZKu1jxu5K/content/nota-tecnica-producao-de-microrganismos-para-uso-proprio-na-agricultura-on-farm-?inheritRedirect=false
11. Valicente HF, Lana UG de P, Pereira ACP, Martins JLA, Tavares ANG. Riscos à Produção de Biopesticida à Base de *Bacillus thuringiensis*. Circ técnica. 2018;239:20. Available at: www.biols.susx.ac.uk/home/Neil_Crickmore/
12. Lana UG de P, Tavares ANG, Aguiar FM, Gomes EA, Valicente FH. Avaliação da Qualidade de Biopesticidas à Base de *Bacillus thuringiensis* Produzidos em Sistema “*on farm*”. Bol Pesqui e Desenvol - Embrapa. 2019;191:21. Available at: <https://www.embrapa.br/milho-e-sorgo/publicacoes>

13. Moreira VAR. Estudo de bioreatores e protocolos de produção de bioinsumos on farm para pequenos produtores. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo - Campus Avaré; 2023.
14. Kovalski E, Passos EGC, Ganen J dos S, Nogueira MA, Cunha MH, Cruz SP. Análises microbiológicas de bioinsumos multiplicados a partir de *Bacillus* e *Trichoderma* em biofábrica na região de Curitiba - SC. *Saúde Meio Ambient.* 2024;13:131–49.
15. Farrera RR, Pérez-Guevara F, De La Torre M. Carbon:nitrogen ratio interacts with initial concentration of total solids on insecticidal crystal protein and spore production in *Bacillus thuringiensis* HD-73. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1998;49(6):758–65.
16. Lima-Pérez J, López-Pérez M, Viniegra-González G, Loera O. Solid-state fermentation of *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* HD-73 maintains higher biomass and spore yields as compared to submerged fermentation using the same media. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2019;42(9):1527–35. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31115662/>
17. Zhang W, Qiu L, Gong A, Cao Y, Wang B. Solid-state Fermentation of Kitchen Waste for Production of *Bacillus thuringiensis*-based Bio-pesticide. *BioResources.* 2013;8(1):1124–35. Available at: <https://bioresources.cnr.ncsu.edu/resources/solid-state-fermentation-of-kitchen-waste-for-production-of-bacillus-thuringiensis-based-bio-pesticide/>
18. Montiel MDLT, Tyagi RD, Valero JR. Wastewater treatment sludge as a raw material for the production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. *Water Res.* 2001;35(16):3807–16. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12230163/>
19. Stanbury PF, Whitaker A, Hall SJ. Principles of Fermentation Technology. Segunda Ed. Butterworth Heinemann; 1994.
20. Arruda ROM, Roberg RAP, Gonzalez C, Larentis AL, Silveira MM, Benintende GB, et al. Cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em meio sólido. *Arq Instituto Biol.* 2003;70(3):133–6.
21. Molina-Peñate E, Arenòs N, Sánchez A, Artola A. *Bacillus thuringiensis* Production Through Solid-State Fermentation Using Organic Fraction of Municipal Solid Waste (OFMSW) Enzymatic Hydrolysate. *Waste and Biomass Valor.* 2023;14(5):1433–45. <https://doi.org/10.1007/s12649-022-01978-5>
22. Ammons D, Rampersad J, Khan A. Usefulness of staining parasporal bodies when screening for *Bacillus thuringiensis*. *J Invertebr Pathol.* 2002 Mar;79(3):203–4. [https://doi.org/10.1016/s0022-2011\(02\)00018-6](https://doi.org/10.1016/s0022-2011(02)00018-6).
23. Meyer MC, Bueno ADF, Mazaro SM, Silva JC. Bioinsumos na cultura da soja. Brasília: Embrapa; 2022. Available at: www.embrapa.br/fale-conosco/sac/

24. Brasil. Instrução Normativa Conjunta SDA/SMC n. 01, de 28 de novembro de 2017. Brasil; 2017 p. 1–8.
25. Faria M, Mascarin GM, Souza DA, Lopes RB. Controle de qualidade de produtos comerciais à base de fungos para o manejo de invertebrados (insetos, ácaros, nematoides) em sistemas agropecuários. Documentos Embrapa; 2022;377:1–48. <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1139001/1/doc377-vs10.pdf>
26. Diomandé SE, Nguyen-The C, Guinebretière MH, Broussolle V, Brillard J. Role of fatty acids in *Bacillus* environmental adaptation. *Front Microbiol.* 2015 Aug 5;6:813. doi: 10.3389/fmicb.2015.00813.