**Produção de *Bacillus thuringiensis* Berliner var.
kurstaki em meios alternativos**

Luís Francisco Angeli Alves
Biólogo

Orientador: Prof^o Dr. Sérgio Batista Alves

**Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura "Luiz
Queiroz", da Universidade de
de São Paulo, para obtenção do
título de Mestre em Ciências.
Área de Concentração: Entomologia**

P I R A C I C A B A

Estado de São Paulo - Brasil

Novembro - 1994

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCLQ/USP

A474p Alves, Luis Francisco Angeli
 Produção de *Bacillus thuringiensis* Berliner var.
 Kurstaki em meios alternativos.* Piracicaba, 1994.
 89p.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Bactéria entomopatogênica - Produção 2. Inseto -
Controle biológico 3. Resíduo industrial como meio de
cultura I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Quei-
roz, Piracicaba

CDD 589.9

**Produção de *Bacillus thuringiensis* Berliner var.
kurstaki em meios alternativos**

Luis Francisco Angeli Alves

Aprovada em: 21/12/94

Comissão Julgadora:

Profº Dr. Sérgio Batista Alves	ESALQ/USP
Profº Dr. Evoneo Berti Filho	ESALQ/USP
Drª Deise Maria Fontana Capalbo	EMBRAPA/CNPMA

Profº Dr. Sérgio Batista Alves
Orientador

A Dario e Margarida, meus pais,
pelo amor com que me geraram e
me formaram, e ao meu irmão
André, pela companhia e amizade

DEDICO

A Sandra pela sua compreensão e
presença viva, sempre constan-
tes ao meu lado

OFEREÇO

HOMENAGEM

A memória de Benedicto Pedro Bastos Cruz, ilustre pesquisador do Instituto Biológico, pelo seu exemplo de dedicação e amor à carreira profissional.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha existência e por estar sempre a me conduzir.

Ao Dr. Sérgio Batista Alves, Professor Associado do Departamento de Entomologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, pelo incentivo e orientação segura e sobretudo pela amizade e confiança com as quais me acolheu.

Aos Professores do curso de Pós-Graduação em Entomologia (ESALQ/USP), pela atenção dispensada e pelos preciosos ensinamentos transmitidos.

Ao meu primeiro mestre e grande amigo, Antonio Batista Filho, Pesquisador Científico do Instituto Biológico, por ter me aceito como estagiário e discípulo, abrindo-me novos horizontes e encaminhando-me continuamente na vida profissional.

À Dra Deise M. F. Capalbo, Pesquisadora Científica do CNPMA/EMBRAPA, pela inestimável colaboração e orientação segura e, também, pelo estímulo e apoio sempre oferecidos.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos para a realização do curso de Mestrado em Entomologia.

Aos funcionários do Departamento de Entomologia

da ESALQ/USP, especialmente a Regina Célia B. de Moraes, Ana G. Brancalhão, Cícera de C. Sabino e Solange Aparecida Vieira, pela inestimável colaboração.

Ao Instituto Biológico, através da Seção de Controle Biológico das Pragas, pela disponibilidade de seus laboratórios e equipamentos e principalmente pela incansável dedicação de seus funcionários, indispensável para a condução deste trabalho.

Às bibliotecárias Kátia Maria de A. Ferraz e Eliana Maria G. Sabino, pela correção das referências bibliográficas.

Ao Prof^o Evôneo Berti Filho pela elaboração do "Summary".

A Josivaldo Prudêncio G. de Moraes, aluno do Curso de Pós-Graduação do Departamento de Zootecnia da ESALQ/USP, pela execução das análises químicas dos meios de cultura.

À Rhodia Agro S.A. pelo fornecimento dos insetos.

Aos amigos do Curso de Pós-Graduação em Entomologia, em especial José Eduardo M. de Almeida, Laerte A. Machado, Nelson A. C. Daza, Alcides Moino Júnior, Amarildo Pasini, Fernando L. Cônsoli, Anderson D. Grutzmacher, Luiz Cláudio P. Silveira, Dirceu Pratissoli, Marcílio José Thomazini, Ariane P. de B. Werckmeister, Fabíola Dobeles, Reginaldo Barros, Valmir A. Costa, Renata

C. Monteiro, Teresinha A. Giustolin, Silvia M. Gomes e Laila H. Mihsfeldt, pela alegria da convivência fraterna e oportunidades de crescimento mútuo na troca de experiências.

Aos amigos Alcides Moino Júnior, José Eduardo M. de Almeida, José Baldin Pinheiro, Pedro V. Gonzaga e Rogério de Mello C. Pinto, com os quais vivi bons momentos em nossa república.

SUMÁRIO

Página

LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xiii
RESUMO	xv
SUMMARY	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. Histórico	3
2.2. Caracterização e classificação	4
2.3. <i>Bacillus thuringiensis</i> como bioinseticida	5
2.4. Produção de <i>Bacillus thuringiensis</i>	7
2.4.1. Acompanhamento da fermentação e suas fases	26
3. MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1. Isolado de <i>Bacillus thuringiensis</i>	29
3.2. Insetos utilizados	30
3.3. Meios de cultura	30
3.3.1. Meios sólidos	31
3.3.1.1. Meio Ágar Nutriente (AN) modificado para isolamento de <i>B. thuringiensis</i>	31

3.3.1.2. Meio Ágar Nutriente simples para preservação de <i>B.</i> <i>thuringiensis</i>	31
3.3.2. Meios líquidos	32
3.3.2.1. Meio Caldo Nutriente modificado (CNY) para pré - fermentação de <i>B.</i> <i>thuringiensis</i>	32
3.3.2.2. Meios de fermentação	33
3.4. Pré-fermentação	33
3.5. Seleção de meios de cultura	33
3.6. Perfil de produção nos meios selecionados .	38
3.6.1. Produção de esporos e pH do meio . .	38
3.6.2. Determinação do crescimento bacteriano (Produção de biomassa) .	39
3.7. Determinação dos custos de produção	41
3.8. Determinação da composição dos meios selecionados	41
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1. Seleção de meios de cultura	46
4.2. Composição centesimal dos meios de cultura selecionados	46
4.3. Comportamento de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> nos meios selecionados	47

4.3.1. Produção de esporos de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i>	47
4.3.2. Crescimento de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i>	52
4.3.3. Acompanhamento do pH do meio .	58
4.4. Determinação da CL ₅₀	66
4.5. Custos de produção	70
5. CONCLUSÕES	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

LISTA DE TABELAS

TABELA Nº	Página
1	Composição dos meios à base de levedura de cana-de-açúcar em combinações com diversas fontes de carbono e nitrogênio 34
2	Meios à base de soro de leite bovino com diferentes complementações 35
3	Composição dos meios baseados em Samprosoy 90 e fontes de carbono 36
4	Meios baseados em farinha de pupa de <i>B. mori</i> 36
5	Produção de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> obtido em diferentes meios líquidos 42
6	Percentual de carboidratos solúveis e proteínas nos meios selecionados 46

7	Produção de esporos de <i>B. thuringiensis</i> , nos 4 meios selecionados	48
8	Produção média de matéria seca de <i>B.</i> <i>thuringiensis</i> , obtida durante o período de incubação, nos meios selecionados	53
9	Variação média do pH nos diferentes meios de cultura, ao longo de 48 horas de fermentação	60
10	Concentração letal mediana (CL ₅₀) para lagartas de <i>A. gemmatalis</i> infectadas por esporos e cristais de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> obtidos em diferentes meios	68
11	Custo de obtenção dos componentes de meios selecionados, obtido na região Sudeste, em outubro de 1994	71
12	Preço de obtenção, produção e custo relativo de 10 ⁹ esporos/ml em cada um dos meios selecionados	72

LISTA DE FIGURAS

FIGURA Nº	Página
1	Produção de esporos de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> em diferentes meios líquidos . . . 50
2	Eficiência dos meios selecionados na produção de biomassa de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> após 48 horas de incubação, sob 120 rpm e $31 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 56
3	Relação entre produção de biomassa e esporos, nos diferentes meios de cultura selecionados 57
4	Valores do pH do meio de cultura ao longo das fases de fermentação 59
5	Produção de esporos em função do pH do meio de cultura 63
6	Produção de biomassa em função do pH do meio de cultura 65

- 7 Porcentagem média de mortalidade de lagartas
de *A. gemmatalis* infectadas por esporos
e cristais de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* 67

**Produção de *Bacillus thuringiensis* Berliner var. *kurstaki*
em meios alternativos**

Autor: Luis Francisco Angeli Alves

Orientador: Profº Dr. Sérgio Batista Alves

Resumo

O objetivo da pesquisa foi verificar a adequabilidade de sementes de leguminosas e subprodutos agroindustriais, como componentes de meios para obtenção de esporos e cristais de *Bacillus thuringiensis* Berliner var. *kurstaki*, com alta virulência e baixo custo. A partir da quantificação de esporos produzidos em 43 meios, foram selecionados 4 meios, incubados sob $31 \pm 1^\circ\text{C}$, 120 rpm, em agitador-incubador, com acompanhamento de parâmetros de produção. Todos os meios produziram esporos, sendo que a maior produção ($5,41 \times 10^{10}$ esporos/ml) foi obtida no meio Soro de leite bovino + Leite de soja + Melaço de cana. O menor custo de produção foi obtido com o meio Farinha de crisálida + Melaço de cana. A atividade tóxica do complexo esporo-cristal foi afetada pela composição do meio, detectada por bioensaios com lagartas de *Anticarsia gemmatilis* Hubner (Lepidoptera, Noctuidae), sendo a menor CL₅₀ observada para o produto obtido no meio Caldo Nutriente + extrato de levedura.

**Production of *Bacillus thuringiensis* Berliner var.
kurstaki on alternative media**

Author: Luis Francisco Angeli Alves

Adviser: Dr. Sérgio Batista Alves

Summary

This research was carried out to verify the feasibility of leguminous seeds and agroindustrial byproducts as components of media used for the obtention of spores and crystals of *Bacillus thuringiensis* Berliner var. *kurstaki*, with high virulence and low cost. From the quantification of spores produced on 43 media there were selected 4 media which were incubated at $31 \pm 1^{\circ}\text{C}$, and 120 rpm in a shaker, and registered the parameters of production. All these media have produced spores and the highest production (5.41×10^{10} spores/ml) was obtained on the medium cheese whey + soybean milk + sugarcane molasses. The lowest cost of production was obtained with the silkworm pupa flour + molasses medium. The toxic activity of the spore-crystal complex was affected by the medium composition and detected through bioassays with *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera, Noctuidae) larvae, being the lowest LC₅₀ observed for the product obtained on the medium nutrient broth + yeast extract.

1 - INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas os fungos, vírus e bactérias têm sido relatados como os entomopatógenos mais eficientes no controle de insetos pragas e vetores de doenças. Sua utilização, porém, exige quantidades superiores às encontradas na natureza. Dessa maneira, há necessidade de se desenvolver métodos de produção e formulação destes patógenos, tornando-os disponíveis em quantidades suficientes, a um custo compatível com os apresentados pelos produtos químicos.

No tocante à produção em larga escala, as bactérias, fungos e nematóides são, até o momento e, ao contrário dos vírus, passíveis de serem produzidos "in vitro", através de processos fermentativos.

Assim, os meios de cultivo representam boa parte dos custos de produção e a pesquisa visando reduzi-los justifica-se pelo reflexo na ampliação do uso de tais agentes de controle. Isto pode ser feito pela substituição dos chamados meios sintéticos, com elevado custo de obtenção, por meios alternativos, compostos por resíduos e

subprodutos agroindustriais regionais, com baixo custo e de grande disponibilidade.

Com mais de 30 variedades já conhecidas, *Bacillus thuringiensis* é, atualmente, o mais promissor dos entomopatógenos no campo do controle biológico, devido à sua ação rápida (que o assemelha a um inseticida químico), aliada à alta especificidade em relação ao hospedeiro, garantindo efetivo controle de lagartas e coleópteros fitófagos, além de várias espécies de dípteros vetores de doenças.

Nesta pesquisa foram testados subprodutos e resíduos agroindustriais, em diferentes combinações, como componentes de meios de cultivo de baixo custo e nutricionalmente equilibrados para a obtenção de esporos e toxinas de *B. thuringiensis* Berliner var. *kurstaki*, através de fermentação líquida descontínua.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - Histórico

O primeiro isolado de *Bacillus thuringiensis* que se tem conhecimento foi obtido no Japão em 1902, proveniente de criações de *Bombyx mori*, sendo um segundo isolado obtido na Alemanha, em 1915, em lagartas de *Anagasta kuehniella*, coletadas em moinhos. Os estudos conduzidos de forma mais aprofundada, levaram à observação de um corpo paraesporal ao qual, posteriormente, atribuiu-se a atividade entomopatogênica da bactéria. Durante muitos anos os estudos com *B. thuringiensis* (bem como o de outros entomopatógenos) caminharam de forma paralela ao sucesso dos inseticidas químicos, produzidos a um custo menor e com grande eficiência no controle dos insetos. Porém, os problemas decorrentes do uso indevido destes produtos (insetos resistentes, intoxicações diretas e indiretas, etc) favoreceram as pesquisas e a extensão do uso de bioinseticidas, dentre eles *B. thuringiensis* (LÜTHY et al., 1982).

2.2 - Caracterização e classificação

HABIB & ANDRADE (1986) descreveram *B. thuringiensis* como uma bactéria aeróbica facultativa e mesofílica, tendo na fase vegetativa o formato típico de um bastonete, geralmente com motilidade. Durante esta fase produz ácidos, pela decomposição da glicose e, ao final desta, inicia-se uma série de transformações bioquímicas e morfológicas, que são divididas em 7 fases e resultarão em um esporo de resistência. É também relatada, durante o processo de esporulação, a formação de um corpo protéico cristalino, que é uma característica típica desta bactéria. O cristal é uma estrutura bipiramidal (na maioria das variedades) e geralmente única na célula, embora seja também referida a não ocorrência ou a ocorrência de dois cristais por célula. A sua composição química é baseada em toxinas protéicas (com destaque para a δ - endotoxina) que, sob efeito do pH alcalino e enzimas digestivas do mesêntero do inseto, tornam-se ativas e com ação tóxica para insetos (LÜTHY et al., 1982).

O endosporo de *B. thuringiensis*, ou simplesmente esporo, além de representar a forma de resistência do microrganismo às adversidades ambientais e garantir a multiplicação da bactéria, apresenta uma proteína com ação tóxica aos insetos (HABIB & ANDRADE, 1986).

Embora se saiba da ação conjunta do complexo esporo-cristal na patogenicidade de *B. thuringiensis*, a δ - endotoxina é o fator principal e a análise da sua estrutura tóxica (sub-unidades protéicas) e o conhecimento do seu modo de ação explicam a especificidade e seletividade do patógeno a determinadas ordens de insetos. Sendo assim, são conhecidas variedades de *B. thuringiensis* cujas toxinas são ativas contra Lepidoptera, Coleoptera e Diptera (GILL et al., 1992; TANADA & KAYA, 1993).

As alterações morfológicas e fisiológicas nos insetos, decorrentes da infecção causada por *B. thuringiensis*, são marcadas inicialmente por interações das toxinas com a membrana plasmática das células epiteliais do mesêntero, desorganizando-as, afetando todo o trato digestivo e outras funções orgânicas do inseto (SUTTER & RAUN, 1967; SALAMA & SHARABY, 1985; ALVES, 1990; GILL et al., 1992).

2.3 - *Bacillus thuringiensis* como bioinseticida

Embora seja conhecido desde o início do século, o primeiro produto comercial à base de *B. thuringiensis* surgiu na França, em 1938, e na década de 40 passou também a ser produzido nos EUA, ficando restrito às indústrias farmacêuticas ligadas à produção de antibióticos por fermentação de microrganismos. O mercado mundial expandiu-

se enormemente nas últimas décadas, movimentando cerca de 200 milhões de dólares anuais, sendo a América do Norte o maior consumidor deste patógeno. A América do Sul, embora seja, juntamente com a América Central, o 4º mercado consumidor de *B. thuringiensis*, apresenta, especificamente no Brasil, grandes perspectivas de expansão, haja vista recentes estudos revelando a viabilidade do patógeno em controlar a traça do tomateiro *Scrobipalpuloides absoluta* na região Nordeste, lagartas desfolhadoras de eucalipto e outras espécies de hábitos desfolhadores e broqueadores (HAJI, 1992; LAMBERT & PEFEROEN, 1992; CANNON, 1993; MARQUES, 1994).

Atualmente são conhecidos em todo o mundo mais de 20 produtos que, de acordo com a variedade podem ser utilizados no controle de besouros e lagartas desfolhadoras das principais culturas, de hortaliças e também traças de grãos armazenados, além de dípteros vetores de doenças.

Apesar da eficiência dos produtos à base de *B. thuringiensis* depender de certos cuidados no momento da aplicação (em função das condições ambientais), sua utilização é justificada pelo fato da bactéria matar o inseto em pouco tempo após a ingestão e também por ser este patógeno inócuo aos animais homeotérmicos, peixes, répteis, minhocas e vegetais. Além disso, é de fácil produção "in vitro" e praticamente não tem restrições com relação ao período de carência, podendo ser aplicado até próximo à

colheita (BENS & ALTWEGG, 1975; GILL et al., 1992).

2.4 - Produção de *Bacillus thuringiensis*

Existem 2 formas básicas para a produção de *B. thuringiensis*: fermentação contínua e descontínua. A fermentação contínua é muito utilizada em processos industriais (cervejarias, vinícolas e destilarias), porém poucas referências têm sido feitas a este processo na obtenção de microrganismos esporulantes (CAPALBO & MORAES, 1987). Entretanto, CAPALBO & MORAES (1984), verificaram, em condições de laboratório, que a fermentação contínua foi bem sucedida para processos com mais de um estágio, na obtenção de esporos e cristais de *B. thuringiensis*.

Resultados semelhantes foram obtidos por AVIGNONE-ROSSA & MIGNONE (1993), em relação à produção de esporos de *B. thuringiensis* var. *israelensis* via fermentação contínua, porém, quando avaliaram a produção de biomassa, esta foi ligeiramente superior no processo descontínuo. Observaram também que a atividade tóxica dos cristais produzidos foi inversa ao ocorrido com os esporos, isto é, a fermentação descontínua levou à síntese de cristais com menor atividade tóxica para larvas de *Culex pipiens*.

Já a fermentação descontínua, na qual a produção de microrganismos ocorre em bateladas, é o

processo mais difundido e utilizado na produção de *B. thuringiensis*.

Este tipo de fermentação não envolve técnicas diferentes daquelas utilizadas tradicionalmente para a produção de enzimas e antibióticos e, embora a grande maioria dos trabalhos esteja calcada na utilização de meios líquidos, há que se considerar a possibilidade da utilização de meios semi-sólidos (30% do meio são sólidos com até 85% de teor de umidade) na obtenção de esporos e cristais de *B. thuringiensis* (CAPALBO, 1989).

NAGAMA et al. (1972) afirmaram que embora o processo de cultura submersa seja adotado pelas indústrias nos EUA, a virulência dos esporos e cristais assim produzidos pode ser menor que a de bactérias oriundas de cultura semi-sólida. Os autores não realizaram um experimento que comprovasse tal afirmação, que pode não ser correta, conforme as pesquisas de MUMMIGATTI & RAGHUNATHAN (1988), os quais compararam a produção de esporos e cristais de *B. thuringiensis* em 3 métodos diferentes: cultura submersa, superficial (meio semi-sólido) e "in vivo" (em lagartas de *Bombyx mori*). Os resultados mostraram que a cultura submersa gerou esporos e cristais 2 vezes mais tóxicos que os produzidos em cultura superficial e 30 vezes em relação à cultura "in vivo". Por outro lado, a produção, em termos de biomassa, foi maior no meio semi-sólido, seguida da produção em meio-líquido e "in vivo".

No Brasil, CAPALBO (1989) mostrou, a partir de estudos de fermentação semi-sólida, que os esporos e cristais obtidos em meios residuais fragmentados e umidecidos, causaram 80% de mortalidade em lagartas de *Anticarsia gemmatalis*, exigindo ainda este processo maiores estudos, principalmente no desenvolvimento de equipamentos mais adequados.

Sendo a fermentação líquida (submersa) descontínua um processo difundido na produção de *B. thuringiensis*, desde meados deste século, diversos estudos são relatados descrevendo a interação da bactéria com os componentes do meio e as condições de fermentação (aeração, pH e temperatura).

A fermentação submersa, em linhas gerais, consiste na utilização de equipamentos (fermentadores) que propiciem as condições ideais para o crescimento e esporulação das bactérias contidas no meio.

As primeiras patentes de processos de produção de *B. thuringiensis*, foram obtidas na década de 60 e serviram como base para os processos atuais de fermentação. Tais patentes incluíam todas as fases do processo: desde o isolamento do patógeno, passando pela composição do meio e abrangendo o tipo de fermentador (DULMAGE & RHODES, 1971).

Os componentes básicos para o completo desenvolvimento e esporulação de *B. thuringiensis* são materiais orgânicos ricos em carbono e nitrogênio, além de

pequenas quantidades de sais minerais. Segundo COUCH & ROSS (1980) o desenvolvimento de um meio de cultura equilibrado na proporção carbono : nitrogênio é a chave para o sucesso da produção de *B. thuringiensis* e, segundo os autores, desde a década de 50 são encontradas na literatura diversas citações a respeito.

Partindo-se do princípio que carbono e nitrogênio são os nutrientes básicos para o crescimento e esporulação de *B. thuringiensis*, MURREL (1961) alertou para a necessidade de se estabelecer proporções equilibradas de carbono e nitrogênio, no sentido de se evitar excessos que retardem a esporulação e, conseqüentemente, a formação do cristal. Segundo o autor, as alterações são decorrentes do excessivo crescimento vegetativo (motivado pelo excesso de nutrientes), que leva a alterações no teor de oxigênio disponível e no pH, além de elevar as concentrações de alguns compostos inibidores.

DULMAGE & RHODES (1971) complementaram tais informações, observando esporulação incompleta, rompimento celular, germinação de esporos e autólise celular, como resultantes do desequilíbrio na proporção carbono : nitrogênio presentes no meio, para a produção de *B. thuringiensis*.

SCHERRER et al. (1973), visando alta produção de esporos e cristais, elaboraram meios de cultura com elevado teor de carbono e constataram uma resposta direta

entre o aumento da concentraçã_o de açúcares e a qualidade da produção (tamanho do cristal, concentração de cristais e toxidez) até o valor de 8 g de glicose/litro. Acima deste valor houve efeito inverso, que pode ser decorrência de perda da estabilidade das proteínas no momento de formação dos cristais, gerando-os com aspecto amorfo ou até mesmo com sua composição alterada, já que a toxidez dos mesmos diminuiu.

SALAMA et al. (1983c) utilizaram meios de cultura com alto percentual de proteínas, visando obter alta concentração de δ - endotoxina (cuja natureza é proteinácea), o que em parte foi conseguido.

Entretanto, ARCAS et al. (1987), considerando a existência de tal crença, afirmaram que se deve ter muito cuidado, pois verificaram que em meios com alta concentração de nutrientes (acima de 56 g de glicose/litro e 28 g de extrato de levedura/litro) houve consumo total da glicose, mas a produção do complexo esporo-cristal foi afetada (em termos qualitativos e quantitativos).

Por outro lado, PEARSON & WARD (1988) constatarem o baixo número de esporos em meios com alta concentração de proteínas e maior produção em meios com alta proporção de carboidrato em relação à proteína.

SAKHAROVA et al. (1988), em um estudo detalhado sobre os efeitos da concentração do meio, verificaram também que as proteínas em excesso foram prejudiciais,

inibindo completamente a esporulação.

Da mesma forma que o excesso, a falta ou a baixa concentração de nutrientes podem afetar o perfeito crescimento e esporulação de *B. thuringiensis*.

Embora SINGER et al. (1966) e ROGOFF & YOSTEN (1969) tenham conseguido esporulação de *B. thuringiensis* em meio mínimo (glicose + sais, acrescido de aminoácidos ou somente aminoácidos + sais), NICKERSON & BULLA (1974) mostraram a necessidade de se enriquecer tais meios com citrato, aspartato ou glutamato, em concentrações próximas de 0,2%, para assim verificar-se o crescimento da bactéria.

Apesar de serem os meios sintéticos de custo elevado, devido ao seu grau de pureza e sua composição conhecida, são mais adequados a estudos básicos de microrganismos, embora se encontrem na literatura estudos, como o de MORAES et al. (1980), que utilizaram um meio à base de melaço de cana e água de maceração de milho em estudos de influência da oxigenação no desenvolvimento de *B. thuringiensis*.

A produção industrial envolve grande quantidade de produtos para elaboração de meios e neste caso, desde a década de 60, quando aumentou o interesse na produção industrial de *B. thuringiensis*, já se pensava em meios alternativos como melaços e água de maceração de milho (BRIGGS, 1963).

SALAMA et al. (1983a) e CAPALBO et al. (1991)

afirmaram que uma das formas de se reduzir os custos da produção de *B. thuringiensis* é a introdução de resíduos e subprodutos agroindustriais regionais nos meios de cultura.

FODA et al. (1993) & PANTUWATANA et al. (1993) sugeriram, para os países em desenvolvimento, além do uso de resíduos e subprodutos agroindustriais de disponibilidade local, a regionalização da produção, onde existam insetos-pragas ou vetores de doenças de caráter endêmico, usando para tal fermentadores de menores proporções (com no máximo 200 litros de capacidade útil), pois desta forma pode-se baixar o custo de produção de *B. thuringiensis*, bem como controlar melhor a qualidade do produto, evitando sua eventual degradação devido ao transporte por longas distâncias, entre o produtor e o consumidor.

Dentre os resíduos, SCHERRER et al. (1973) referiram-se à utilização, em escala industrial, de meios para a produção de *B. thuringiensis* à base de melaços, amido, soja e caseína, por serem boas fontes de carbono e nitrogênio e por seu baixo custo de obtenção.

COUCH & ROSS (1980) referiram-se às farinhas de peixe e de sementes de algodão e de soja, caseínas, levedura de cerveja, melaços e amido.

Embora nos estudos iniciais de produção de *B. thuringiensis* já se tenha referência do uso de amido e farinha de sementes de algodão e de soja, na composição dos

meios, estes ainda se baseavam em dextrose, extrato de levedura, bacto-peptona e triptona, que encareciam os meios e resultavam em baixa produção de esporos e cristais, conforme salientaram ARCAS et al. (1984).

Ainda assim, DULMAGE (1971) constatou que o meio denominado B-2a (triptona a 1%, dextrose e amido ambos a 0,5%, extrato de levedura a 0,2%, além de sais minerais), em frascos Erlenmeyer mantidos sob 280 rpm e $32\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 72 horas produziu maior quantidade de esporos e toxina, sendo ainda, esta última, cerca de duas vezes mais potente em relação à obtida em outros meios. O autor ressaltou que a superioridade do meio B-2a não pode ser diretamente transferida para a fermentação em grande escala, mas é indicativa da possibilidade de ocorrer na produção em escala industrial.

NAGAMA et al. (1972), visando substituir ou diminuir a concentração de ágar na fermentação semi-sólida de *B. thuringiensis*, testaram a farinha de semente de tamarindo (FST) e torta de amendoim (TA), em diferentes concentrações e combinações com ágar. A máxima produção de esporos foi obtida após 72 horas de incubação, no meio com proporção percentual de 10,0:1,5:0,5, respectivamente para FST, TA e ágar.

GOLDBERG et al. (1980) compararam a eficiência dos meios M1 (bacto-peptona e glicose, ambos a 0,2%, além de sais) e M2 (água de maceração de milho a 0,3%, peptona

de soja a 0,2% e glicose a 0,5% e sais), na produção de esporos e cristais de *B. thuringiensis* em fermentadores experimentais sob 31°C e 600 a 800 rpm, durante 48 horas. A produção máxima foi obtida no meio M2 com $1,2 \times 10^9$ esporos/ml, com alta toxidez. O experimento repetido, sob as mesmas condições, porém, num fermentador de 500 litros, confirmou os resultados anteriores, porém, a produção no meio M2 foi cerca de 3 vezes maior a um custo efetivamente menor.

Contudo, ARCAS et al. (1984) afirmaram que a água de maceração de milho nos meios testados para *B. thuringiensis* é usualmente complementada com extrato de levedura e glicose o que, em escala industrial, torna-a inviável economicamente. Assim sendo, testaram-na somente complementada com glicose e a produção foi baixa, quando comparada ao meio MSE (constituído de resíduos da industrialização do malte + glicose), nas condições de fermentação em frascos Erlenmeyer mantidos a 30°C e 200 rpm, excluindo o extrato de levedura para reduzir o custo da produção.

SMITH (1982) verificou em testes com 6 combinações diferentes de meios para *B. thuringiensis*, fermentados em frascos Erlenmeyer, mantidos sob 30±1°C, por 72 horas, que os meios 1 (à base de glicose, extrato de levedura e sais), 2 (glicose, farinha de soja e farinha de milho) e 3 (caldo nutriente e glicose) mostraram-se menos

adequados, resultando em baixa produção de esporos e pouca toxidez contra larvas de *Aedes aegypti*. As combinações de aminoácidos da caseína e sais minerais (meio 4) e farinha de semente de algodão, extrato de levedura, bacto-peptona e glicose em maior concentração (meio 5) resultaram em maior produção e potência dos esporos e cristais. A substituição da glicose do meio 6 por glicerol (glicose, farinha de soja e extrato de levedura) não melhorou a produção de esporos, porém o glicerol aumentou a toxidez dos mesmos.

Resultados semelhantes, para *B. sphaericus*, foram obtidos por VILELLA et al. (1990), que também comprovaram que o glicerol poderia ser usado como fonte alternativa de carbono, associado ou não ao caldo nutriente. A complementação resultou na maior concentração final de esporos, porém, o glicerol como mono-componente resultou em produção de cristais mais tóxicos. Para os estudos de PEARSON & WARD (1988), a farinha de soja + melaço de cana mostraram-se mais adequados à produção de esporos de *B. thuringiensis*, tanto em frascos Erlenmeyer como em fermentador.

DULMAGE (1970) constatou a eficiência da farinha de semente de algodão na produção de *B. thuringiensis*. O meio A (triptona, dextrose e extrato de levedura) levou à baixa produção de esporos, quando comparado ao que foi obtido no meio constituído basicamente de farinha de semente de algodão (resíduo agroindustrial),

acrescida de extrato de levedura, dextrose e sais. A virulência não foi proporcional à produção de esporos.

ROGOFF et al. (1969) verificaram que a farinha de semente de algodão + melaços de cana e de batata foi menos adequada à produção de esporos e toxinas de *B. thuringiensis*, quando comparada à farinha de peixe, ambas complementadas com sais minerais e mantidas sob incubação a 30°C e 270 rpm por 24 horas.

PRASERTPHON (1975) verificou que no meio constituído por farinha de soja (30 g/litro), melaço de cana (30 g/litro) e sais houve uma grande produção de *B. thuringiensis*.

SALAMA et al. (1983a) utilizaram, para produzir *B. thuringiensis*, combinações diversas de sementes de leguminosas e resíduos e subprodutos agroindustriais (líquidos e sólidos) como: soro de leite, água de maceração de milho, levedura de cana e farinhas de peixe, de sangue bovino, de restos de abatedouro de aves e de sementes de algodão. Os componentes líquidos foram testados como mono-componentes e os sólidos foram acrescidos ao meio básico (glicose 6 g/litro, extrato de levedura 2 g/litro e sais minerais). As condições de fermentação, em frascos Erlenmeyer, foram de 100 rpm e 26°C, durante 3 a 4 dias. Constatou-se que os componentes sólidos, tanto os de origem animal como vegetal, foram igualmente eficientes na produção de esporos e toxinas (com valor médio de $7,4 \times 10^8$

esporos/ml), exceto a levedura de cana que produziu cerca de 1,7 vezes mais esporos em relação aos demais. Os componentes líquidos mostraram-se menos eficientes, sendo comparáveis ao meio padrão (meio básico), resultando na média de $1,2 \times 10^8$ esporos/ml, superior à produção obtida apenas com soro de leite ($2,7 \times 10^7$ esporos/ml).

Por outro lado, HERTLEIN et al. (1981) sugeriram a produção de *B. sphaericus* e *B. thuringiensis* var. *israelensis*, em escala local, em meios baseados em extratos aquosos de proteína animal, fezes ou resíduos agroindustriais. Segundo os autores, a fermentação em frascos Erlenmeyer agitados a 300 rpm sob 35°C, utilizando diferentes meios, durante 48 e 56 horas, levou à produção de esporos de ambas bactérias. Porém, a análise da CL₅₀ dos esporos-cristais obtidos nos diferentes meios revelou a adequação dos meios com proteína animal, exceto de leite em pó, para *B. sphaericus*, e do leite em pó e farinha de osso para *B. thuringiensis*. Com relação aos meios com fezes, houve maior produção de *B. sphaericus* (cerca de $1,0 \times 10^8$ esporos/ml) que *B. thuringiensis*, que praticamente não se desenvolveu, sendo o mesmo observado nos testes com meios baseados em resíduos agroindustriais.

Também, OBETA & OKAFOR (1983) verificaram que fontes de nitrogênio derivadas de animais, foram eficientes para a produção de *B. sphaericus*, pois a presença de sangue bovino nos meios complementados com pequenas quantidades de

sementes de leguminosas (amendoim, soja e caupi), resultaram na média de $5,5 \times 10^8$ esporos/ml. Além disso, a menor CL₅₀ foi obtida a partir de esporos e cristais produzidos no meio complementado com torta de amendoim. Há perspectivas de utilização destes meios, em escala industrial, considerando-se os resultados obtidos, disponibilidade local e o seu baixo custo.

Em função de resultados anteriores (SALAMA et al., 1983 a,b,c) desenvolveram um experimento baseado na utilização de levedura de cana como mono-componente para *B. thuringiensis*, embora também tenham testado meios compostos de sementes de leguminosas, extratos aquosos de batata, cenoura e batata-doce, além de outros resíduos como farinhas de peixe, de resíduos de abatedouro de aves e de industrialização de suco cítrico. Todos os experimentos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer e os produtos obtidos foram testados sobre *Spodoptera littoralis*. Constatou-se que, excetuando-se a levedura de cana, os demais componentes, embora fossem capazes de conduzir o processo fermentativo, resultaram em baixa concentração de esporos, mas a toxidez variou, não acompanhando de forma direta e homogênea a tendência demonstrada na produção de esporos.

Considerando ainda a levedura de cana como mono-componente, ALVES et al. (1993) constataram a produção de $2,26 \times 10^8$ esporos/ml de *B. thuringiensis*, quando a

levedura foi utilizada na concentração de 2% e complementada com sais minerais, sob $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ e 120 rpm durante 48 horas.

DIAS et al. (1990) verificaram também a eficiência da levedura de cana na produção de *B. sphaericus*, principalmente quando submetida à extração protéica por fervura a 130°C , sob agitação.

Utilizando um subproduto muito comum no Egito, SALAMA et al. (1983b) verificaram que o soro de leite a 50% e sem sal é um excelente meio de cultura para a produção de *B. thuringiensis*. Porém, a complementação do meio com 2% de levedura de cana elevou ligeiramente a produção da bactéria, quando comparada à adição de sementes de feijão e fava, as quais entretanto, geraram toxinas mais potentes.

GERMANI & THOMAS (1994) constataram a alta eficiência de meios baseados em soro de leite e proteína de soja na produção de esporos de *B. sphaericus*, em fermentadores de 14 litros, sob 30°C e 400 rpm, durante 27 horas, sem no entanto avaliar a toxidez contra insetos.

Sementes de leguminosas foram também utilizadas por MUMMIGATTI & RAGHUNATAN (1990) para produção de *B. thuringiensis* em frascos Erlenmeyer a $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ e 142 rpm. Na incorporação de meio básico (extrato de levedura 0,2% e sais minerais) com farinhas de soja ou de caupi (fontes de nitrogênio) e amido ou melaço de cana, em diferentes concentrações e combinações (como fontes de carbono),

verificaram que a produção de esporos foi maior nos meios baseados em farinha de soja e amido (menor razão entre carbono : nitrogênio) e em tempo menor que nos demais meios, embora a maior toxidez tenha sido verificada no meio baseado em farinha de caupi e melaço de cana.

PEREZ & GONZALEZ (1984) compararam fontes de carboidratos para a produção de *B. thuringiensis*, utilizando, ao contrário de MAJUNDER & PADMA (1957) que trabalharam com meios sintéticos, subprodutos agroindustriais e farinha vegetal. A base dos meios testados era composta de levedura de cana e de pão (ambas a 1,0%), com variação de melaço de cana (meio 30) e farinha de batata-doce (meio 32) ambos a 0,1%. A produção no meio 30 foi de $1,8 \times 10^9$ esporos/ml, cerca de 1,5 vezes maior que no meio 32. Foi constatado, porém, que o meio 32 produziu cristais 7 vezes mais tóxicos que o meio 30, sendo nas condições do experimento o melaço recomendado como fonte de carboidratos.

Meios semelhantes foram testados por CARDOSO et al. (1990) utilizando, para produzir *B. thuringiensis*, farinha de batata-doce e extrato de levedura em diferentes concentrações. O melhor meio, nas condições impostas no experimento (frascos Erlenmeyer agitados durante 30 horas sob $28 \pm 2^\circ\text{C}$) foi o denominado A4 (farinha de batata 10g/l e extrato de levedura 3 g/l), que produziu em média $6,0 \times 10^8$ esporos/ml e altamente tóxicos para lagartas de *Ascia*

monuste orseis.

DHARMSTHITI et al. (1985) acompanharam o desenvolvimento de *B. thuringiensis* e *B. sphaericus* em meios compostos de resíduo da produção de glutamato monossódico, complementado com sais, comparando com os meios padrões à base de caldo nutriente + glicose e sais, e glicose + aminoácidos e sais. Os testes foram conduzidos em frascos Erlenmeyer a 30°C e 200 rpm e também em fermentadores, nas mesmas condições. Os resultados evidenciaram que os meios à base de resíduo foram adequados, gerando grande número de esporos e CL₅₀ baixa, sendo os dados comparáveis aos 2 meios padrões. O meio constituído por resíduo foi mais viável à produção em grande escala, pois o custo de 10 litros deste meio foi da ordem de US\$ 0,02 enquanto que os preços da mesma quantidade dos meios padrões oscilaram em torno de US\$ 10,00.

CAPALBO et al. (1991) testaram em fermentadores, diferentes combinações de água de coco filtrada, melaços cítrico e de cana-de-açúcar (fontes de carbono) e do resíduo da industrialização de glutamato monossódico (fonte nitrogenada) como meios de cultura para *B. thuringiensis*. Segundo os resultados, a água de coco não foi suficiente para o crescimento da bactéria, mostrando a necessidade do nitrogênio, pois na sua ausência não ocorreu esporulação. Concluiu-se também, que o resíduo utilizado

como mono-componente ou na complementação a fontes de carbono, mostrou-se adequado para a produção de esporos de *B. thuringiensis*.

FERNANDES et al. (1975) utilizaram, para a produção de *B. thuringiensis*, água de coco como mono-componente e também em complementação ao caldo nutriente. Foi constatada sua ineficiência, nas duas situações, pois obtiveram, respectivamente, cerca de 40 e 100 vezes menos esporos que no caldo nutriente.

VENTOSILLA et al. (1994) conseguiram produzir esporos e toxinas de *B. thuringiensis* em água de coco, inoculando os esporos no interior de coco verde.

SANCHES et al. (1994) utilizaram com sucesso meios à base de resíduos de indústria têxtil, alimentícia e agrícola para a produção, via fermentação líquida, de esporos e cristais de *B. thuringiensis*. Obteve-se grande crescimento bacteriano e elevado percentual de esporogênese, a um baixo custo e em curto período operacional.

Além das fontes de nitrogênio e carbono, essenciais ao crescimento e esporulação, é importante a presença de sais minerais na composição dos meios.

WEINBERG (1955) confirmou a necessidade de manganês para a esporulação de bactérias do gênero *Bacillus*.

ERTOLA (1987) citou a necessidade de cálcio

para conferir aos esporos refratividade e resistência ao calor. Referiu-se também à necessidade de manganês para a esporulação e ao potássio como básico para toda a fisiologia da bactéria.

SIKDAR et al. (1991) trabalharam com meio sintético contendo glicose (10 g/litro) e extrato de levedura (1 g/litro), variando a concentração dos sais K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ e $CaCO_3$. Desta forma, a produção máxima de esporos e maior atividade tóxica dos cristais foram obtidas nas respectivas concentrações dos sais: 1 g/l, 0,3 g/l e 1 g/l, enquanto outros elementos como ferro, manganês e cobre foram exigidos, porém, em concentrações mínimas.

Com relação às condições de fermentação, SMIRNOFF (1963) verificou que em baixas temperaturas (12 e 16°C), ocorrem distúrbios fisiológicos nas células, principalmente a formação de cristais antes da esporulação.

Por outro lado, IGNATENKO et al. (1983), trabalhando com temperaturas mais elevadas, verificaram que o aumento da temperatura, de 20 para 35°C, duplicou a produção de esporos, os quais também se mostravam mais termo-resistentes. Entretanto, quando a fermentação foi conduzida a 40°C houve uma nítida inibição na esporulação.

MORAES & CAPALBO (1986b) fizeram considerações genéricas sobre as necessidades de *B. thuringiensis*. Segundo os autores, a temperatura geralmente utilizada nos processos fermentativos é de $30 \pm 2^\circ C$, sendo a aeração e

agitação variáveis de acordo com o equipamento utilizado.

IGNATENKO et al. (1983) também afirmaram que a elevação do suprimento de ar aumenta o crescimento vegetativo, porém, não interfere na produção de esporos.

AVIGNONE-ROSSA et al. (1992) afirmaram que a produção de *B. thuringiensis* sob condições limitadas de oxigenação foi significativamente afetada, quando comparada àquela sob oxigenação normal, isto é, sem interrupção. Segundo os autores, a limitação reduziu em 80% a produção de biomassa e esporos, enquanto que a síntese de δ - endotoxina foi diminuída em cerca de 50%.

De um modo geral, vê-se que há possibilidade de se utilizarem meios alternativos para produzir *B. thuringiensis*, pois existe uma grande diversidade e disponibilidade de resíduos e subprodutos agroindustriais que se mostram adequados à produção de esporos (na ordem de 10^7 a 10^9 esporos/ml) e com elevada atividade patogênica, e efetivamente a custos muito inferiores aos meios definidos e semi-definidos.

2.4.1. - Acompanhamento da fermentação e suas fases

Uma vez efetuada a inoculação, as condições adequadas (suporte nutricional, aeração, pH e temperatura)

oferecidas aos esporos e células vegetativas, farão com que a bactéria multiplique-se no meio.

O crescimento típico das bactérias apresenta, após o período de germinação (cerca de 4 horas), uma etapa inicial (fase lag), na qual a população permanece inalterada, mas as células estão fisiologicamente ativas, sintetizando protoplasma, aumentando seu volume. Ao final desta fase, que dura no máximo 2 horas, as células iniciam sua divisão, vagarosamente, até que todas atinjam a fase logarítmica, com divisão em ritmo constante, por aproximadamente 4 horas. O crescimento começa a diminuir a partir das 10 horas, em função da exaustão do meio ou devido ao acúmulo de produtos tóxicos, ficando a população constante. Passadas 4 horas mais, observa-se o início da fase de esporulação, que se estende por cerca de 4 horas. Finalmente, a população entra em declínio com morte mais rápida que o surgimento de novas células, caracterizando a fase de lise celular (PELCZAR et al., 1980; TIANJIAN et al., 1993). O comportamento do microrganismo em relação ao meio de cultura pode ser acompanhado através de vários métodos, o que permite detectarem-se alterações devido à inadequabilidade do meio ou do ambiente, ou ainda em decorrência de eventuais contaminações.

Os métodos utilizados em estudos microbiológicos, são: contagem direta do número de esporos ou células por microscopia; determinação do número de

esporos viáveis em placas, contagem com membranas filtrantes, densidade celular por turbidimetria, peso seco das células e consumo de nutrientes. Neste sentido, a contagem em câmara de Petroff-Hauser, embora seja barata, rápida, prática e acurada, leva em consideração esporos viáveis e não viáveis. Já a contagem em placas, que considera apenas os esporos viáveis, apresenta inconvenientes, como exigir o preparo de meios para crescimento e demora na leitura, devido à necessidade de incubação. Consideram também o peso seco como um eficiente método de determinação do crescimento, principalmente em estudos básicos. Finalizando, afirmam que não existe um método ideal de acompanhamento e que a escolha deve recair em aspectos econômicos, praticidade e interesses do estudo (PELCZAR et al., 1980; TIANJIAN et al., 1993).

A produção de *B. thuringiensis*, seja em escala industrial ou em estudos básicos, também pode ser acompanhada e, dentre os métodos acima, SALAMA et al. (1983a), ARCAS et al. (1984 e 1987), PEARSON & WARD (1988), SIKDAR et al. (1991) e AVIGNONE-ROSSA et al. (1992) citaram em seus trabalhos, a utilização da contagem total de esporos ou células sob microscopia ou contagem de esporos viáveis em placa, além da determinação do peso seco, como métodos adequados ao acompanhamento da produção.

Por outro lado, MORAES & CAPALBO (1986a) e CAPALBO (1989) mostraram a possibilidade de se utilizar o

acompanhamento da variação do pH do meio de cultura, ao longo da fermentação, como um indicador, pois há uma concordância no traçado das curvas de pH e produção de esporos, ou seja, a estabilização do pH coincide com a máxima concentração de esporos no meio, ao final da fermentação. Segundo TIANJIAN et al. (1993) a variação é devida à formação de ácidos, principalmente pirúvico e acético, como decorrência do consumo de açúcares pelas células em reprodução (crescimento). Posteriormente, tais ácidos são consumidos, o que eleva o pH do meio, criando condições para a esporulação. Com a exaustão do meio e o acúmulo de resíduos nitrogenados, o crescimento cessa, fazendo o pH estabilizar-se. Neste momento, sob condições adequadas de fermentação, verifica-se uma alta concentração de esporos e cristais no meio.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no laboratório de Patologia e Controle Microbiano dos Insetos, do Departamento de Entomologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, em Piracicaba, São Paulo e nos laboratórios de Entomopatologia da Seção de Controle Biológico das Pragas, do Instituto Biológico de São Paulo, em Campinas, São Paulo.

3.1 - Isolado de *Bacillus thuringiensis*

O patógeno utilizado no trabalho foi *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, sorotipo H: 3a-3b, isolado do produto comercial Dipel PM. Para tal, 0,1 g do produto foi suspenso em água destilada estéril e, sob condições assépticas, foi feita a inoculação, na superfície do meio de cultura para isolamento, em placas de Petri, com auxílio de uma alça de platina flambada, pela técnica do esgotamento. Após a incubação, durante 24 horas a 30°C, as

colônias foram repicadas em meio líquido de pré-fermentação, em frascos Erlenmeyer incubados sob 30°C, 120 rpm, por 24 horas. Após a constatação, sob microscópio óptico de contraste de fase, da pureza da cultura, foram inoculados tubos de ensaio contendo o meio de cultura AN, para preservação. Após 48 horas, a cultura foi coberta com óleo mineral estéril, marca Nujol e então os frascos foram armazenados sob refrigeração, à temperatura de 10°C.

3.2 - Insetos utilizados

Foram utilizados como insetos teste, lagartas de *Anticarsia gemmatilis* Hübner, 1818 (Lepidoptera, Noctuidae), conhecida como lagarta-da-soja, de 3^o instar e provenientes de criação da Seção de Controle Biológico das Pragas. As lagartas foram mantidas sob dieta artificial à base de feijão, desenvolvida por GREENE et al. (1976).

3.3 - Meios de Cultura

Os meios utilizados nos experimentos eram sólidos e líquidos, e foram destinados ao isolamento, preservação, pré-fermentação e fermentação. Após a preparação, foram esterilizados em autoclave a 120°C e 1 atm por 20 minutos. As vidrarias utilizadas foram esterilizadas em estufa a 150°C por 2 horas.

3.3.1 - Meios sólidos

3.3.1.1 - Meio Ágar Nutriente + Extrato de levedura (CNY) para isolamento de *B. thuringiensis*

Ágar	20,0 g
Peptona	5,0 g
Extrato de carne	3,0 g
Extrato de levedura	1,0 g
Água destilada q.s.p.	1000,0 ml

3.3.1.2 - Meio AN simples para preservação de *B. thuringiensis*

Ágar	20,0 g
Peptona	5,0 g
Extrato de carne	3,0 g
Água destilada q.s.p.	1000,0 ml

3.3.2 - Meios líquidos

3.3.2.1 - Meio Caldo Nutriente + Extrato de levedura (CNY) para pré-fermentação de *B.thuringiensis*

Peptona	5,0 g
Extrato de carne	3,0 g
Extrato de levedura	1,0 g
Água destilada q.s.p.	1000,0 ml

3.3.2.2 - Meios de fermentação

Com base em informações da literatura pertinente e na disponibilidade e custo local, foram selecionados alguns materiais para comporem diferentes combinações nos meios de cultura: melaço de cana-de-açúcar, levedura de cana-de-açúcar, sacarose, feijão, soja, soro de leite bovino, leite de soja, glicerol, proteína de soja, resíduo da industrialização de glutamato monossódico, farinha de pupa de bicho-da-seda, todos complementados com CaCO_3 0,2% e $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,05%.

3.4 - Pré-fermentação

Antes de cada processo fermentativo, foi preparado o inóculo, a partir do isolado mantido sob refrigeração, em tubos de ensaio. Assim, 50 ml de meio CN estéril, mantido em frasco Erlenmeyer de 250ml, receberam uma pequena porção da cultura esporulada do isolado, por meio de uma alça de platina. O frasco foi mantido em uma câmara agitadora-incubadora, por 24 horas a 120 rpm e $31 \pm 1^\circ\text{C}$. Após este período, repetiu-se o procedimento, transferindo-se 1 ml do caldo já fermentado para novo frasco com meio CNY estéril, mantido, em seguida sob as mesmas condições.

3.5 - Seleção de meios de cultura

Estes testes tiveram por objetivo determinar meios alternativos e eficientes na produção de esporos, sendo selecionados com base na concentração final de esporos da bactéria/ml de meio, através da contagem, em câmara de Petroff-Hauser, sob microscópio óptico de contraste de fase.

Foram formulados 43 meios de cultura divididos em 4 grupos, tendo como base, cada um deles, a levedura de cana, soro de leite bovino, proteína de soja e farinha de pupa de bicho-da-seda. A complementação e variação na

composições dos meios foram feitas no sentido de se obter concentrações cada vez mais elevadas de esporos em cada processo fermentativo.

Os diferentes meios foram preparados incorporando-se os materiais nas respectivas concentrações, sendo as sementes de feijão e de soja foram cozidas, previamente durante 30 minutos, desintegradas em liquidificador e adicionadas aos meios, antes da autoclavagem (Tabela 1).

Tabela 1. Composição dos meios à base de levedura de cana-de-açúcar em combinações com diversas fontes de carbono e nitrogênio.

Composição dos meios de cultura
Levedura de cana 0,2%
Levedura de cana 1%
Levedura de cana 2%
Levedura de cana 2% + Feijão 10%
Levedura de cana 2% + Soja 10%
Levedura de cana 2% + Soja 10% + Melaço 1%
Levedura de cana 2% + Sacarose 1%
Levedura de cana 2% + Sacarose 2%
Levedura de cana 2% + Melaço 1%
Levedura de cana 2% + Melaço 2%
Levedura de cana 2% + Leite de Soja 10%
L. de cana 2% + L. de Soja 10% + Melaço 0,5%
L. de cana 2% + L. de Soja 10% + Melaço 0,5% + RGM 0,5%

Um segundo grupo de meios baseou-se no soro de

leite bovino, acrescido de outros componentes, sendo a metodologia empregada no preparo dos meios idêntica a já descrita anteriormente (Tabela 2).

Tabela 2. Meios à base de soro de leite bovino com diferentes complementações

Composição dos meios de cultura
Soro de leite 50%
Soro de leite 50% + Levedura de cana 2%
S.de leite 50% + Leved. de cana 2% + Feijão 5%
S.de leite 50% + Leved. de cana 2% + Melaço 0,5%
Soro de leite 50% + Melaço 0,5%
Soro de leite 50% + Melaço 1,0%
Soro de leite 50% + Soja 5%
Soro de leite 50% + Soja 5% + Melaço 0,5%
Soro de leite 50% + Feijão 5% + Melaço 0,5%
S.de leite 50% + Leite de Soja 10% + Melaço 0,5%
S.de leite 50% + L. de Soja 10% + L. de cana 2%
S.de leite 50% + L. de Soja 10% + Gludex ¹ 0,5%
S.de leite 50% + L. de Soja 10% + Glicerol 0,5%

¹marca registrada de melaço de cana-de-açúcar refinado

Houve ainda um grupo baseado em 5% de proteína isolada de soja marca Samprosoy 90 (Sanbra) como monocomponente e também acrescida de uma fonte de carbono (Tabela 3).

Tabela 3. Composição dos meios baseados em Samprosoy 90 e fontes de carbono

Composição dos meios de cultura
Samprosoy 90 5%
Samprosoy 90 5% + Melaço 0,5%
Samprosoy 90 5% + Glicerol 0,5%
Samprosoy 90 5% + Gludex 0,5%

O quarto grupo teve como composição básica, a farinha de pupa de *Bombyx mori*. Esta foi utilizada sob duas formas: hidrolisada alcalinamente e não hidrolisada (Tabela 4). A hidrólise alcalina refere-se à pré-autoclavagem do material, a 120°C e 1 atm durante 30 minutos, em suspensão aquosa, com pH alcalino, seguida da coagem, incorporação de outros componentes e correção do pH. Quando não submetida a este processo, a farinha é pré-cozida durante 20 minutos e coada, seguindo-se a complementação, para então ser esterilizada em autoclave.

Tabela 4. Meios baseados em farinha de pupa de *B. mori*.

Composição dos meios de cultura
Farinha de pupa de <i>Bombyx mori</i> 15% + Melaço 0,2%
Far. de pupa de <i>B. mori</i> 15% + Melaço 0,5%
Far. de pupa de <i>B. mori</i> 15% + Glicerol 0,2%
Far. de pupa de <i>B. mori</i> 15% + Glicerol 0,5%
Far. de pupa de <i>B. mori</i> 15% + Glicer. 0,5%

Composição dos meios de cultura

Far. de pupa de <i>B. mori</i> 15% + Glicer. 0,5% - pH 8 *
Far. de pupa de <i>B. mori</i> 15% + Glicer. 0,5% - pH 10 *
Far. de pupa de <i>B. mori</i> 15% + Glicer. 0,5% - pH 12 *
Far. de pupa de <i>B. mori</i> 15% + Gludex 0,5%
Far. de pupa de <i>B. mori</i> 15% + Gludex 0,5% - pH 8 *
Far. de pupa de <i>B. mori</i> 15% + Gludex 0,5% - pH 10 *
Far. de pupa de <i>B. mori</i> 15% + Gludex 0,5% - pH 12 *

* submetidos à hidrólise alcalina

Como referência utilizou-se o meio CNY descrito anteriormente no item 3.3.2.1.

Todos os meios líquidos tiveram seu pH corrigido para 7,4 adicionando-se soluções de ácido clorídrico ou hidróxido de sódio.

Após o preparo, os meios foram distribuídos, no volume de 50 ml, em frascos Erlenmeyer de 250 ml, tamponados com algodão hidrófobo.

Em todos os experimentos foram utilizados 5 frascos para cada meio, sendo cada um considerado uma repetição.

Cada frasco recebeu, após a esterilização e o resfriamento, 1 ml do caldo pré-fermentado, conforme o item 3.4 e foram mantidos sob as mesmas condições que a pré-fermentação, porém durante 48 horas.

A fim de se verificar a produção de esporos em

cada meio utilizado, ao final do período de fermentação, foram tomadas amostras de 2 ml de cada frasco, submetidas a um choque térmico (10 minutos imersos em banho-maria a 80°C e 5 minutos em gelo). Destes tubos foram retiradas amostras, que após sucessivas diluições em solução de água destilada e espalhante adesivo (para melhorar a dispersão dos esporos), foram submetidas à contagem dos esporos, em câmara de Petroff-Hauser, sob microscópio óptico de contraste de fase.

3.6 - Perfil da produção nos meios selecionados

3.6.1 - Produção de esporos e pH do meio

Os meios selecionados na etapa 3.5 foram novamente submetidos a processos fermentativos, conforme já mencionado, partindo-se, porém, de 36 frascos para cada meio. Isto porque a cada 4 horas foram tomados, ao acaso, 3 frascos, sendo cada um destinado a uma repetição. Após uma vigorosa agitação, foram retiradas 3 amostras de 1 ml de cada frasco, que foram submetidas a contagem de esporos, conforme descrito no item 3.5. Além disso, ao se tomarem as amostras, determinou-se, sob agitação, o pH do meio fermentado utilizando-se um Potenciômetro. Adotou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com parcelas subdivididas, sendo cada fermentação uma parcela,

a fim de se comparar o efeito dos diferentes meios sobre a produção de esporos.

3.6.2 - Determinação do crescimento bacteriano (produção de biomassa)

O conteúdo de cada um dos 3 frascos, retirados em cada intervalo, foi submetido à centrifugação sob 13000 rpm, durante 20 minutos. Em seguida, o material precipitado obtido foi transferido para placas de Petri, mantidas sob refrigeração. Na última amostragem, todas as placas foram deixadas em estufa a $81 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas, e em seguida, resfriadas por 3 horas em dessecador. Finalmente, procedeu-se a pesagem das amostras em balança analítica, sendo os valores do peso original e final das placas, bem como o peso do meio estéril centrifugado, submetidos à fórmula abaixo, para que se obtivesse a quantidade de biomassa formada em cada amostragem.

$\text{Biomassa} = (\text{PF} - \text{PI}) - \text{PME}$, sendo:

PI: Peso Inicial das placas

PF: Peso Final das placas (com meio fermentado precipitado e seco)

PME: Peso seco do meio estéril precipitado

Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com parcelas subdivididas, de forma que cada fermentação constituiu uma parcela, a fim de

se comparar o efeito dos diferentes meios sobre o crescimento bacteriano, representado pela produção de biomassa.

3.6.3 - Bioensaio para determinação da virulência de esporos e cristais obtidos nos diferentes meios a lagartas de *Anticarsia gemmatalis*

Ao final de cada fermentação, tomou-se uma amostra de cada frasco, que foi submetida ao choque térmico e posterior contagem, segundo o item 3.5. Em seguida, foram preparadas diluições sucessivas, utilizando-se água destilada e espalhante adesivo 0,01%, de forma a se obterem concentrações padronizadas de 10^9 , 10^7 , 10^5 , 10^3 e 10^1 esporos/ ml, constituindo cada uma delas num tratamento.

Com auxílio de uma pipeta automática, 40 microlitros de cada suspensão, além da testemunha (água destilada e espalhante adesivo 0,01%) foram inoculados sobre a superfície de dieta artificial (GREENE et al., 1976), desprovida de formol, em tubos de vidro (8,5 cm de altura X 2,0 cm de diâmetro) tamponados com algodão hidrófobo. Após a secagem, cada tubo recebeu uma lagarta de *A. gemmatalis* no 3º instar, num total de 100 lagartas por tratamento, divididas em 4 repetições.

Diariamente, e até que completassem o

desenvolvimento larval, procedeu-se a avaliação do experimento, anotando-se a mortalidade, bem como o agente causal. Avaliou-se a eficiência dos esporos e cristais produzidos em cada meio, submetendo-se os dados à análise de Logit, para se determinar a CL₅₀ em cada meio, além de se verificar a eficiência dos mesmos e influência do meio na virulência do produto obtido.

3.7 - Determinação dos custos de produção

Os custos de produção foram determinados com base nos preços dos componentes dos meios de cultura selecionados, cotados no mercado da região Sudeste.

3.8 - Determinação da composição dos meios selecionados

Amostras dos meios foram submetidas à análise química quantitativa, a fim de se determinar a concentração de proteínas e açúcares, sendo para tal utilizada, respectivamente, a determinação da concentração de proteína bruta, conforme a metodologia desenvolvida por TOSI & FAVORETTO¹ e carboidratos solúveis, segundo A.O.A.C. (1975).

¹ TOSI, H. & FAVORETTO, V. (Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal / UNESP) Apostila de aula do Curso de Pós-Graduação em Produção Animal.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Seleção de meios de cultura

Pela contagem de esporos, verificou-se que houve a produção de esporos de *B. thuringiensis* em todos os meios formulados e, em alguns meios, em valores elevados (Tabela 5).

Tabela 5. Produção de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* obtido em diferentes meios líquidos¹

Meio de cultura	esporos/ml
Levedura de cana 0,2%	3,40 X 10 ⁷
Levedura de cana 1%	2,02 X 10 ⁸
Levedura de cana 2%	2,26 X 10 ⁸
Levedura de cana 2% + Feijão 10%	1,57 X 10 ⁸
Levedura de cana 2% + Soja 10%	1,69 X 10 ⁸
Levedura de cana 2% + Soja 10% + Melaço 1%	5,40 X 10 ⁸
Levedura de cana 2% + Sacarose 1%	1,22 X 10 ⁸
Levedura de cana 2% + Sacarose 2%	9,00 X 10 ⁸
Levedura de cana 2% + Melaço 1%	1,37 X 10 ⁸
Levedura de cana 2% + Melaço 2%	1,33 X 10 ⁸

Meio de cultura	esporos/ml
Levedura de cana 2% + Leite de Soja 10%	1,22 X 10 ¹⁰
L. de cana 2% + L. de Soja 10% + Melaço 0,5%	1,78 X 10 ¹⁰
L. de cana 2% + L. de Soja 10% + Melaço 0,5% + Resíduo de industrialização de Glutamato monossódico 0,5%	1,60 X 10 ¹⁰
Soro de leite 50%	1,08 X 10 ⁹
Soro de leite 50% + Levedura de cana 2%	6,00 X 10 ⁸
S.de leite 50% + Leved. de cana 2% + Feijão 5%	1,50 X 10 ⁹
S.de leite 50% + Leved. de cana 2% + Melaço 0,5%	6,40 X 10 ⁸
Soro de leite 50% + Melaço 0,5%	9,80 X 10 ⁸
Soro de leite 50% + Melaço 1,0%	9,20 X 10 ⁸
Soro de leite 50% + Soja 5%	1,31 X 10 ⁹
Soro de leite 50% + Soja 5% + Melaço 0,5%	1,62 X 10 ⁹
Soro de leite 50% + Feijão 5% + Melaço 0,5%	1,18 X 10 ⁹
S.de leite 50% + Leite de Soja 10% + Melaço 0,5%	1,56 X 10 ¹⁰
S.de leite 50% + L. de Soja 10% + L. de cana 2%	1,50 X 10 ¹⁰
S.de leite 50% + L. de Soja 10% + Gludex ² 0,5%	2,99 X 10 ¹⁰
S.de leite 50% + L. de Soja 10% + Glicerol 0,5%	2,67 X 10 ¹⁰
Samprosoy 90 5%	1,45 X 10 ¹⁰
Samprosoy 90 5% + Melaço 0,5%	2,09 X 10 ¹⁰
Samprosoy 90 5% + Glicerol 0,5%	1,81 X 10 ¹⁰
Samprosoy 90 5% + Gludex 0,5%	1,48 X 10 ¹⁰
Farinha de pupa de <i>Bombyx mori</i> 15% + Melaço 0,2%	1,64 X 10 ¹⁰
Far. de pupa de <i>B. mori</i> 15% + Melaço 0,5%	1,17 X 10 ¹¹
Far. de pupa de <i>B. mori</i> 15% + Glicerol 0,2%	3,56 X 10 ⁹
Far. de pupa de <i>B. mori</i> 15% + Glicerol 0,5%	4,34 X 10 ⁹
Far. de pupa de <i>B. mori</i> 15% + Glicer. 0,5%- pH 6	6,52 X 10 ⁸
Far. de pupa de <i>B. mori</i> 15% + Glicer. 0,5%- pH 8	1,17 X 10 ⁹
Far. de pupa de <i>B. mori</i> 15% + Glicer. 0,5%- pH 10	7,50 X 10 ⁸
Far. de pupa de <i>B. mori</i> 15% + Glicer. 0,5%- pH 12	2,73 X 10 ⁹
Far. de pupa de <i>B. mori</i> 15% + Gludex ² 0,5%- pH 6	5,98 X 10 ⁸

Meio de cultura	esporos/ml
Far. de pupa de <i>B. mori</i> 15% + Gludex ² 0,5% - pH 8	1,48 X 10 ⁹
Far. de pupa de <i>B. mori</i> 15% + Gludex ² 0,5% - pH 10	1,24 X 10 ⁹
Far. de pupa de <i>B. mori</i> 15% + Gludex ² 0,5% - pH 12	8,00 X 10 ⁹
Caldo Nutriente + Extrato de levedura 0,1%	1,44 X 10 ⁸

¹ Complementados com CaCO₃ 0,2% e MnSO₄H₂O 0,005%

² Marca registrada de melaço de cana refinado

Houve uma grande variação na concentração final de esporos. No entanto, partindo-se do princípio que em todos os experimentos foi utilizado o mesmo isolado e condições de fermentação (temperatura, agitação, recipiente e volume de meio nos frascos) justifica-se a variação como resultante da interação da bactéria com o meio, ou seja, como o efeito da composição nutricional sobre o metabolismo das células, ocorrendo maior ou menor concentração final de esporos nos meios.

DULMAGE (1970) referiu-se a esta variação, demonstrando-a em 12 variedades de *B. thuringiensis*. Trabalhos mais recentes, como HERTLEIN et al. (1981), também mostraram esta variação, porém, mencionaram que a produção não pode ser prognosticada pela simples contagem de esporos. Estudos conduzidos por SMITH (1982), SALAMA et al. (1983c) e PEREZ & GONZALEZ (1984) concordam com tal afirmação, pois verificaram através de contagens que a alta concentração de esporos, em determinados meios, não se

refletia na toxidez elevada do produto. Por outro lado, SCHERRER et al. (1973), SALAMA et al. (1983 a,b) e AVIGNONE-ROSSA & MIGNONE (1993) observaram, em determinados meios, que houve uma relação direta na alta produção e toxidez do complexo esporo-cristal obtido.

Diante do exposto, a contagem, considerada uma avaliação inicial, deve ser complementada com outros parâmetros de produção. Dada a grande quantidade de meios em teste, resultantes da combinação de diversos componentes, estipulou-se a produção mínima de $1,0 \times 10^{10}$ esporos/ml (que foi encontrada na maioria dos trabalhos como um valor máximo de produção), e também a composição predominantemente baseada em resíduos e/ou subprodutos agroindustriais. Desta forma, foram selecionados, para estudos posteriores, os meios Soro de leite bovino 50% + Leite de Soja 10% + Melaço 0,5% (SLL); Samprosoy 90 5% + Melaço 0,5% (PSM); Farinha de pupa de *B. mori* 15% + Melaço 0,5% (FCM); Caldo Nutriente + Extrato de Levedura 0,1% (CNY), sendo o último considerado um meio de referência, mesmo apresentando a concentração de esporos abaixo do mínimo estabelecido, uma vez que em diversos trabalhos usou-se um meio básico e sintético como padrão de comparação (SALAMA et al., 1983 a,b,c).

4.2 - Composição centesimal dos meios de cultura selecionados

Através da análise química, determinou-se a composição básica dos meios selecionados, no que se refere aos carboidratos solúveis e proteína bruta (Tabela 6).

Tabela 6. Percentual de carboidratos solúveis e proteínas nos meios selecionados.

Meio	Composição centesimal	
	Carboidratos solúveis	Proteína bruta
CNY	3,21	82,69
SLL	24,14	35,46
PSM	26,93	46,26
FCM	15,76	46,14

Verifica-se que o meio CNY é o que apresenta as maiores diferenças na proporção carboidratos : proteínas, sendo a relação entre ambos próxima de 1:26. O meio FCM, embora apresente maior quantidade de carboidratos que o anterior, tem em sua composição 46,14% de proteína, o que lhe confere melhor proporcionalidade, havendo apenas 2,93 vezes mais proteínas que carboidratos.

A proporção entre carboidratos solúveis e proteínas torna-se mais equilibrada nos meios PSM e SLL, embora apresentem, como os demais, percentuais mais elevados de proteínas que carboidratos. Sendo assim,

verificam-se 1,72 e 1,47 vezes mais proteínas nos meios PSM e SLL, respectivamente. A partir disso, considera-se mais equilibrado o meio SLL.

4.3 - Comportamento de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* nos meios selecionados

4.3.1 - Produção de esporos de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*

Da mesma maneira que na seleção inicial, verificou-se a adequabilidade dos meios à produção de *B. thuringiensis*, nas condições da experimentação. Constatou-se, porém, que houve uma diferença em relação aos testes iniciais, sendo que os meios CNY e SLL mostraram-se mais produtivos e os meios PSM e FCM levaram à menor concentração de esporos que nos ensaios de seleção.

Considerando-se o tempo de incubação, verifica-se uma grande semelhança no comportamento de *B. thuringiensis* nos diferentes meios testados (Tabela 7).

Tabela 7. Produção de esporos¹ de *B. thuringiensis*, nos 4 meios selecionados (Temperatura= 31 ± 1°C; 120 rpm).

Tempo	Meio							
	SLL		PSM		FCM		CNY	
12	2,936 F	a	0,211 D	b	1,863 F	ab	0,728 B	b
16	4,416 EF	a	0,992 D	b	2,348 F	ab	1,045 B	b
20	5,000 EF	a	1,193 D	b	3,288 F	ab	1,018 B	b
24	5,963 E	a	1,530 D	b	7,110 E	a	1,412 AB	b
28	5,543 E	b	2,123 CD	c	8,452 E	a	1,764 AB	c
32	6,846 E	ab	4,903 C	b	7,396 E	a	2,096 AB	c
36	10,550 D	ab	8,480 B	b	10,980 D	a	1,889 AB	c
40	18,646 C	a	8,781 B	c	14,190 C	b	2,116 AB	d
44	34,109 B	a	10,103 B	c	21,726 B	b	2,776 AB	d
48	54,113 A	a	13,813 A	c	26,203 A	b	3,958 A	d
C.V.= 20,387 %								

1 Valores expressos X 10⁹ esporos/ml

Médias seguidas por letras maiúsculas distintas, na mesma coluna, ou por letras minúsculas na mesma linha, diferem entre si, ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Letras maiúsculas: médias de tempo dentro de meio

Letras minúsculas: médias de meio dentro de tempo

Os meios apresentavam muitas partículas em suspensão, o que dificultou a contagem de esporos logo nas primeiras 8 horas de fermentação, exigindo muitas diluições para se conseguir visualizar os esporos. Em função disto, o número de esporos na lâmina era muito baixo e oscilava ao longo das repetições das contagens (10⁴ a 10⁷), o que

poderia conduzir a erros de leitura. Assim, considerou-se o início do acompanhamento da esporulação às 12 horas, quando então a concentração já era considerável. Constatou-se também que as máximas concentrações de esporos, nos 4 meios testados, foram obtidas após às 48 horas de incubação.

Observações semelhantes foram feitas por SAKHAROVA et al. (1988), que verificaram em meio constituído por sais nitrogenados e glicose, o início da esporulação próximo das 10 horas de incubação, sob 220 rpm e 30°C. Por outro lado, PEARSON & WARD (1988) constataram o início da esporulação 18 horas após a inoculação e obtiveram valores máximos de esporos/ml, em 22 horas de fermentação em frascos Erlenmeyer, contendo meio à base de farinha de soja, amido e glicose e incubados 30°C e 150 rpm.

Pode-se observar que ao longo do período de fermentação existem algumas semelhanças entre os meios (Figura 1). Verifica-se que após 24 horas, nos meios SLL e FCM a produção de esporos sofreu um incremento, aumentando gradativamente até 36 horas, quando passou a ser mais intensa, principalmente no meio SLL. Embora tenha aumentado a esporulação no meio PSM decorridas 32 horas, teve evolução menos intensa que nos anteriores. Já no meio CNY a velocidade de produção de esporos praticamente não se alterou até 48 horas, quando se observou a maior concentração de esporos no meio.

Figura 1. Produção de esporos de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* em diferentes meios líquidos.

A relação mais próxima entre a concentração de carboidratos e proteínas pode ser a explicação para a superioridade do meio SLL na produção de esporos, em relação aos demais, sendo obtidos neste meio, $5,40 \times 10^{10}$ esporos/ml o que representa cerca de 2 vezes a produção do meio FCM e 4 vezes a obtida no meio PSM. No meio CNY, que possui na sua composição relação carbono : nitrogênio (1:26), e considerado referência, produziu-se $3,95 \times 10^9$ esporos/ml, que embora sendo um valor considerável,

representa apenas 7,3% da produção do meio SLL. Além disso, em todas as amostragens, ao longo do período de observação, o meio SLL mostrou-se distinto dos demais, as vezes superior a todos e outras muito semelhante ao meio FCM ou ao PSM (Tabela 7). Confirmou-se, porém, após 40 horas de fermentação, a adequação do meio SLL à esporulação de *B. thuringiensis*, quando a concentração de esporos neste meio passou a se manter estável e acima dos demais.

A utilização de soja em meios de cultura foi testada por GOLDBERG et al. (1980), que constataram o aumento de cerca de 100 vezes na produção de esporos de *B. thuringiensis* ao testar a substituição da bacto-peptona (meio padrão) por peptona de soja, e por MUMMIGATTI & RAGHUNATHAN (1990), que verificaram a superioridade do meio de cultura à base de soja, em relação a outras leguminosas, quando testada em complementação ao amido.

Por outro lado, SALAMA et al. (1983a) constataram que sementes de soja foram menos eficientes, como fontes nitrogenadas, a *B. thuringiensis* que a levedura de cana, quando complementadas ao Caldo Nutriente (meio básico). Os autores também avaliaram o potencial do soro de leite como um complemento nitrogenado ao meio básico, sendo inclusive superior à soja. Além disso, a complementação do soro com levedura de cana a 1%, elevou a produção de esporos, de 5×10^7 esporos/ml (meio contendo soro de leite como mono-componente) para 1×10^9

esporos/ml.

A complementação do soro de leite com soja foi também testada por SALAMA et al. (1983b), que verificaram a superioridade da combinação soro de leite diluído (50%) + levedura de cana 1%, em relação à complementação com soja e outras leguminosas, obtendo um máximo de 2×10^8 esporos/ml.

Provavelmente a menor esporulação ou a diminuição da sua intensidade, nos demais meios, esteja associada à formação ou acúmulo de catabólitos nitrogenados, que segundo PEARSON & WARD (1988) regulam a síntese de esporos e cristais ao longo da fermentação, através de um mecanismo repressor. Segundo os autores, isto é passível de ocorrer em meios com elevado teor protéico, como no caso dos meios CNY, FCM e PSM.

4.3.2 - Crescimento de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*

O peso seco obtido nos meios mostrou-se, ao longo do tempo, menos variável que a produção de esporos (Tabela 8), sendo o meio FCM considerado uma exceção.

Tabela 8. Produção média de matéria seca¹ de *B. thuringiensis*, obtida durante o período de incubação, nos meios selecionados.

Tempo	Meio			
	SLL	PSM	FCM	CNY
4	87,5 A a	64,6 C b	18,8 F b	34,6 B b
8	106,9 A a	72,9 B b	58,1 F bc	35,7 AB c
12	114,7 A b	121,7 AB b	191,5 E a	51,2 AB c
16	87,2 A b	104,4 AB b	583,2 ABC a	56,5 A c
20	112,6 A b	108,3 AB b	539,0 C a	58,1 A c
24	122,7 A b	102,8 AB b	438,2 D a	52,9 AB c
28	127,4 A b	119,5 AB b	540,6 C a	44,6 AB c
32	126,3 A b	121,8 AB b	631,8 A a	51,1 AB c
36	129,4 A b	124,2 A b	549,3 BC a	40,9 AB c
40	131,8 A b	107,8 AB b	594,4 AB a	43,3 AB c
44	129,5 A b	111,5 AB b	599,7 AB a	47,3 AB c
48	132,6 A b	113,0 AB b	598,6 AB a	45,3 AB c
C.V. = 9,017 %				

¹ Valores expressos em mg/50ml

Médias seguidas por letras distintas, maiúsculas na mesma coluna, ou por letras minúsculas na mesma linha, diferem entre si, ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey.

A comparação de resultados deste experimento com dados de outros autores torna-se difícil, uma vez que a maioria dos trabalhos refere-se à determinação do crescimento celular através do aumento da densidade óptica (d.o.), isto é, aumento da turbidez do meio pelo

crescimento celular. Ainda assim, GOLDBERG et al. (1980), em estudos feitos em mini-fermentadores com meios baseados em bacto-peptona ou peptona de soja e glicose, verificaram que a d.o. elevou-se constantemente até próximo de 10 horas de incubação quando então estabilizou-se, mostrando um pequeno declínio próximo das 20 horas.

ARCAS et al. (1984), também verificaram, principalmente no meio composto por melaço 10 g/l, extrato de levedura 10 g/l e sais minerais, um aumento constante da d.o., porém, até as 24 horas, quando então a curva estabilizou-se. Resultados semelhantes foram obtidos por AVIGNONE-ROSSA & MIGNONE (1993) que observaram, no meio à base de glicose e extrato de levedura, o início do crescimento após 12 horas, mantendo-se até as 24 horas, para estabilizar-se próximo das 30 horas de incubação.

Da mesma forma, observou-se que nos meios PSM, FCM e CNY houve uma nítida fase de aumento de biomassa, a qual foi mais longa nos meios CNY e PSM (até 20 horas e 36 horas, respectivamente). Verifica-se, no entanto, um menor aumento no meio CNY, provavelmente em decorrência da baixa concentração de carboidratos no meio, que teria sido consumida pela reprodução bacteriana, exaurindo-se rapidamente, resultando em baixo número de células.

O meio SLL mostrou-se atípico em relação aos demais não apresentando qualquer variação significativa ao longo do período de fermentação. Considerando-se o impacto

do meio de cultura sobre as células em desenvolvimento, o suprimento mais equilibrado no meio SLL, provavelmente favoreceu ao crescimento de modo que decorridas 4 horas (momento da primeira avaliação), já se observaram 87,5 mg de biomassa/frasco (50 ml de meio).

A maior produção de biomassa foi obtida com o meio FCM, que mostrou sua adequabilidade em relação a este parâmetro, principalmente a partir das 12 horas, quando distinguiu-se dos demais, produzindo, em média, nesta amostragem, 191 mg de biomassa, valor 3,74 vezes maior que o meio referência (CNY).

Ao final do processo, a diferença entre a produção no meio FCM e CNY passou a ser cerca de 13 vezes, sendo obtidos 598,6 mg/50 ml no meio FCM e 45,3 mg/50 ml no meio padrão (Figura 2).

Figura 2. Eficiência dos meios selecionados na produção de biomassa de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* após 48 horas de incubação, sob 120 rpm e $31 \pm 1^\circ\text{C}$.

A produção de biomassa/ml aqui obtida, para o meio FCM foi a que mais se aproximou aos valores obtidos por AVIGNONE-ROSSA & MIGNONE (1993), com o meio à base de glicose e extrato de levedura, que foram de 6,5 mg/ml a 8,5 mg/ml, para maior e menor concentração de glicose no meio, respectivamente.

Observou-se aqui, que nos meios CNY e PSM a produção de biomassa foi menor (entre 2,26 e 2,6 mg/ml) e refletiu-se na baixa produção de esporos. Por outro lado, verificou-se alta produção de biomassa no meio FCM, e maior produção de esporos no meio SLL (Figura 3).

Figura 3. Relação entre produção de biomassa e esporos, nos diferentes meios de cultura selecionados.

Considerando-se a biomassa como a representação do crescimento bacteriano, era de se esperar, de acordo com GOLDBERG et al. (1980), que nos meios onde se verificou um elevado crescimento houvesse uma elevada concentração de esporos ao final da fermentação.

ARCAS et al. (1987) observaram também a relação direta entre a alta produção de biomassa e a concentração de esporos, em estudos de influência da concentração do meio no crescimento bacteriano. Entretanto, verificaram que houve uma inversão na relação biomassa : esporos, quando

usaram meio concentrado.

NICKERSON & BULLA (1974) concluíram, em seus estudos, que os meios que dão suporte ao crescimento exagerado de células podem não ser adequado à esporulação.

Sendo assim, não foi possível estabelecer-se para os experimentos desenvolvidos, qualquer relação entre o crescimento e a produção de esporos, pois mostraram-se sujeitos à grande variação e dependentes de fatores como a composição do meio de cultura, condições de fermentação e variedade da bactéria.

4.3.3 - Acompanhamento do pH do meio

Houve uma variação no valor do pH ao longo do período de fermentação, tendo sido observados valores desde 5,59 (como menor valor, obtido no meio FCM) e 9,12 (maior valor registrado no meio CNY) (Tabela 9).

Os valores mais elevados de pH ocorreram ao final, o que não justificaria a sua correção, por meio da adição de ácidos, embora ROGOFF & YOSTEN (1969) e SALAMA et al. (1983a), afirmaram que valores extremos podem afetar a qualidade do cristal, não mencionando, porém, o tempo de exposição. No meio CNY, porém, às 12 horas de fermentação, o pH estava próximo de 8 e os cristais formados foram certamente expostos durante um tempo maior a valores elevados, principalmente após as 40 horas, quando se

observava pH próximo de 9.

Constatou-se também, tal como observado por MORAES (1973), na produção de *B. thuringiensis* em meio a base de melaço e caseína em fermentadores, a curva de pH após 36 horas, demonstrou uma tendência a estabilização.

Tabela 9. Variação média do pH nos diferentes meios de cultura, ao longo de 48 horas de fermentação

Tempo	Meio			
	SLL	PSM	FCM	CNY
0	6,92	7,24	7,43	7,34
4	6,48	7,05	7,12	6,95
8	5,83	6,21	5,75	7,44
12	5,86	6,67	5,59	7,90
16	6,18	6,96	6,09	8,30
20	6,28	7,16	6,10	8,43
24	6,17	7,50	5,99	8,59
28	6,58	7,70	6,43	8,63
32	6,63	7,69	6,79	8,58
36	6,99	7,79	6,94	8,66
40	7,67	7,88	7,46	8,90
44	7,90	8,33	7,53	8,91
48	7,88	8,18	7,40	9,12

Verifica-se também que o traçado das curvas do pH é muito semelhante entre os meios, o que demonstra a

coerência dos dados, porém, a menor queda do pH é observada no meio CNY, o qual também demonstrou a rápida ascensão (a partir de 8 horas). Isto pode estar associado à baixa concentração de açúcares no meio, pois segundo ROGOFF & YOSTEN (1969) e MORAES & CAPALBO (1984, 1986b) o declínio do pH é decorrência do acúmulo dos ácidos acético e pirúvico no meio, em função do consumo e metabolização de açúcares, pela bactéria. Atribui-se a rápida ascensão do pH (indicando o final da fase log), ao fato do meio de fermentação ser o mesmo da pré-fermentação, o que diminuiu a duração da fase lag (adaptação do microrganismo ao meio), pois não há alteração de meio e conseqüentemente o período de crescimento tem seu início e final antecipados. Nos demais meios, nos quais a concentração de açúcares é maior, a queda do pH, além de mais acentuada, estendeu-se até 8 horas para o meio PSM e 12 horas nos meios SLL e FCM, (Figura 4).

De um modo geral pode-se afirmar que as curvas seguiram o traçado típico, isto é, queda durante a fase log (primeiras horas de fermentação), recuperação (durante a fase de esporulação), aproximando-se ou ultrapassando o valor inicial e, estabilizando-se, ou não, como igualmente demonstrado por PEARSON & WARD (1988), SAKHAROVA et al. (1988) e CAPALBO et al. (1991). Desta forma, nas condições em que foram conduzidos os experimentos o pH, tal como sugeriram MORAES & CAPALBO (1986b) e CAPALBO (1989), pode

ser utilizado como um indicador das fases da fermentação.

Os valores obtidos estão próximos dos citados por PEARSON & WARD (1988) e CAPALBO et al. (1991), embora DHARMSTHITI et al. (1985) tenham observado, na fase de esporulação, valores de pH entre 8,0 e 8,3 e SAKHAROVA et al. (1988), na mesma fase, valores superiores a 8,5. Por outro lado, MORAES & CAPALBO (1986a) confirmaram que na fase de decréscimo do pH (fase log), este alcançou valores entre 5,0 e 5,5.

Verificou-se, também, que em todos os meios testados a ascensão do pH coincidiu com a fase de esporulação, onde segundo SAKHAROVA et al. (1988) ocorre absorção dos ácidos produzidos. Além disso, a estabilização do pH está próxima do pico de produção de esporos (Figura 5).

Figura 4. Valores do pH do meio de cultura ao longo das fases de fermentação.

Figura 5. Produção de esporos em função do pH do meio de cultura.

Confrontando-se ainda os valores de pH dos diferentes meios com os respectivos dados de produção de biomassa, verificou-se também que houve uma certa relação entre ambos (Figura 6).

Nos meios CNY e PSM a ascensão do pH foi acompanhada diretamente pelo aumento da biomassa, sendo também observada a estabilização do pH quando houve diminuição na produção de biomassa, em todos os meios testados. Isto pode estar associado à redução da atividade metabólica no meio, pois neste momento a biomassa é constituída quase totalmente por células em esporulação, e com baixa taxa de crescimento. À medida em que os esporos são formados acumulam-se no meio e, sendo inativos, resultam na menor produção de ácidos e catabólitos o que conseqüentemente, reflete-se na estabilização do pH.

Figura 6. Produção de biomassa e oscilação do pH nos meios durante o período de fermentação.

4.4 - Determinação da CL₅₀

Embora tenha havido uma certa variação entre os valores de CL₅₀, foi possível detectar a patogenicidade do complexo esporo-cristal produzido nos 4 meios selecionados (Figura 7). Verificou-se que a maior mortalidade média foi alcançada, após 8 dias da inoculação, com o produto do meio CNY (98%), na concentração de $1,94 \times 10^9$ esporos/ml. O meio PSM proporcionou complexo esporo-cristal que levou à morte 94% da população testada, na concentração de $1,16 \times 10^9$ esporos/ml. A produção dos meios SLL demonstrou a menor atividade tóxica, pois mesmo em concentrações mais elevadas que os anteriores ($2,70 \times 10^9$ esporos/ml), causou apenas 71% de mortalidade nas lagartas. O produto do meio FCM, embora na concentração próxima da usada no bioensaio com o meio PSM, mostrou-se menos ativo matando apenas 61% dos insetos. Esta variação pode ser observada nos valores de CL₅₀ obtidos pela inoculação dos meios em *A. gemmatilis* (Tabela 10).

Figura 7. Porcentagem média de mortalidade de lagartas de *A. gemmatalis* infectadas por esporos e cristais de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*.

Tabela 10. Concentração letal mediana (CL₅₀) para lagartas de *A. gemmatilis* infectadas por esporos e cristais de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* obtidos em diferentes meios.

Meio de Cultura	CL ₅₀ ¹
Caldo Nutriente + Extrato de levedura (CNY)	8,41 X 10 ⁵
Proteína de Soja + Melaço (PSM)	2,80 X 10 ⁷
Soro de Leite + Leite de Soja + Melaço (SLL)	1,76 X 10 ⁸
Farinha de pupa de <i>B. mori</i> + Melaço (FCM)	4,93 X 10 ⁸

¹ esporos/ml

DULMAGE (1970), trabalhando com muitas variedades de *B. thuringiensis* produzidas em 2 meios diferentes, constatou também que a composição do meio influenciou na produção e na atividade tóxica da δ - endotoxina, com alternância na relação entre os 2 parâmetros, isto é, ora a relação era direta (com alta produção e CL₅₀ elevada) ora inversa.

Verificou-se que o produto do meio CNY foi o mais tóxico, com CL₅₀ de 8,41 X 10⁵ esporos/ml. Dos meios alternativos, o meio PSM foi o de menor CL₅₀ (2,80 X 10⁷ esporos/ml), enquanto para os meios SLL e FCM obtiveram-se, respectivamente, CL₅₀ de 1,76 X 10⁸ e 4,93 X 10⁸ esporos/ml. Desta forma, o uso de farinha de pupa, como fonte nitrogenada diminuiu a virulência do patógeno,

principalmente quando comparada ao uso de proteína de soja, no meio PSM.

Confrontando-se os valores de CL₅₀ com os valores máximos da concentração de esporos, ao final da fermentação (Tabela 7), ainda que se observe entre os meios CNY, PSM e FCM um aumento diretamente proporcional entre a concentração de esporos e CL₅₀, no meio SLL obteve-se a maior produção e esta mostrou-se medianamente tóxica. Desta forma, não se pode estabelecer uma relação direta entre produtividade e virulência (Tabela 10) .

DULMAGE (1971) também verificou tais diferenças, em estudos com meios para produção de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*. A maior produção de esporos foi obtida no meio baseado em triptona, dextrose, amido de milho e extrato de levedura, enquanto a menor CL₅₀, para lagartas de *Heliothis virescens* foi constatada para o produto do meio constituído de farinha de soja, dextrose e amido de milho.

Recentemente, AVIGNONE-ROSSA & MIGNONE (1993) também afirmaram que não se pode basear na contagem de esporos para se predizer a qualidade tóxica do produto, pois verificaram a alta produção, em meios com glicose e extrato de levedura, mas com baixa atividade tóxica.

Atribui-se ao meio de cultura o principal fator de interferência na síntese do cristal e conseqüentemente na atividade tóxica, pois como demonstraram SCHERRER et al.

(1973), o tamanho e a forma do cristal, bem como sua atividade tóxica se alteraram de acordo com a concentração de carboidratos no meio. Além disso, FALOCI et al. (1993) verificaram, através de eletroforese, que a composição do meio afetou a concentração de δ - endotoxina no cristal, refletindo-se na atividade tóxica de *B. thuringiensis*.

4.5 - Custos de produção

Foram feitos levantamentos de preço de venda dos componentes utilizados nos meios selecionados, feitos no mercado da região Sudeste (Tabela 11).

Verificou-se que os componentes mais caros são os extratos de carne e de levedura, além da peptona (todos da marca Difco), componentes de alta pureza e usados na composição do meio CNY. Os demais, subprodutos ou resíduos, são comparativamente de custo muito inferior, indicando seu potencial de utilização.

Tabela 11. Custo de obtenção dos componentes de meios selecionados, obtido na região Sudeste, em outubro de 1994.

Componente	Preço (US \$)
Extrato de carne (kg)	332,00
Extrato de levedura (kg)	157,36
Farinha de pupa de <i>B. mori</i>	0,14
Leite de soja (kg)	4,98
Melaço (kg)	0,22
Peptona (kg)	196,00
Samprosoy 90 (kg)	5,26
Soro de leite (l)	0,06
CaCO ₃ (kg)	6,00
MnSO ₄ . H ₂ O (kg)	7,72

Baseando-se na composição dos meios selecionados, apresentada no item 4.1, calculou-se a produção e os custo relativo de 10⁹ esporos (Tabela 12).

Tabela 12. Preço de obtenção, produção e custo relativo de 10^9 esporos/ml em cada um dos meios selecionados.

Meio	Preço/litro ¹ (US \$)	Produção ² (esporos/ml)	Custo de 10^9 esporos/ml
CNY	1,76	$3,96 \times 10^9$	0,444
SLL	0,44	$54,11 \times 10^9$	0,008
PSM	0,22	$13,81 \times 10^9$	0,015
FCM	0,02	$26,20 \times 10^9$	0,0007

O meio CNY, em função do preço de seus componentes, é o mais caro de todos, correspondendo a 4 vezes o preço do meio SLL, 8 vezes em relação ao meio PSM e 88 vezes mais caro que o FCM. Além disso, o custo para se produzir no meio CNY a concentração de 10^9 esporos/ml (o que corresponde ao "custo relativo"), seria US \$ 0,44, contra US\$ 0,015 e US\$ 0,0007 para os meios PSM e FCM, respectivamente.

Dentre os meios alternativos, o meio FCM tem o preço mais baixo, ou seja, 26,5 vezes menor que o meio SLL e 13 vezes mais barato que o meio PSM. Embora o preço do meio PSM também seja baixo, sua produção reduzida fez com que seu custo relativo fosse 1,87 vezes maior que o SLL e 21,5 vezes maior, quando comparado ao custo relativo do meio FCM.

O meio SLL tem o maior preço, dentre os alternativos, porém, sua elevada produção fez com seu custo relativo fosse um dos mais baixos. Seu uso é sugerido porque para a composição do meio FCM (que tem o menor custo relativo, implicando numa aparente economia), a disponibilidade local da farinha de pupa de *B. mori* é relativamente baixa (cerca de 3000 toneladas/ano), devido a pequena atividade sericícola no Estado de São Paulo. Sendo assim, haveria necessidade de trazê-la de outros locais, como o Estado do Paraná, o que certamente elevaria seu preço e alteraria os cálculos dos custos de produção.

5 - CONCLUSÕES

- a) Não há relação entre produção de biomassa, esporos e virulência.
- b) O pH é um indicador que pode ser utilizado para o acompanhamento da fermentação.
- c) *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* cresce e esporula em todos os meios testados, sendo o meio Soro de Leite + Leite de Soja + Melaço, o mais produtivo.
- d) O meio Farinha de Pupa de *Bomby mori* + Melaço apresenta menor custo, mas de difícil obtenção.
- e) O complexo esporo-cristal produzido no meio Caldo Nutriente + Extrato de levedura apresenta maior virulência que o produzido nos demais meios.
- f) É possível formular meios mais econômicos para obtenção de esporos e cristais de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, L.F.A.; ALVES, S.B.; BATISTA FILHO, A. Produção de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* utilizando levedura de cana. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 14., Piracicaba, 1993. Resumos. Piracicaba, SEB, 1993. p. 325.
- ALVES, S.B. Controle microbiano de insetos. In: CROCOMO, W.B., org. Manejo integrado de pragas. Botucatu, Unesp, 1990. p. 147-76.
- ARCAS, J.; YANTORNO, O.; ARRARÁS, E.; ERTOLA, R. A new medium for growth and δ - endotoxin production by *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *Biotechnology Letters*, Middlesex, 6(8): 495-500, 1984.
- ARCAS, J.; YANTORNO, O.; ERTOLA, R. Effect of high concentration of nutrients on *Bacillus thuringiensis* cultures. *Biotechnology Letters*, Middlesex, 9(2): 105-10, 1987.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 12. ed. Washington, 1975. 1094 p.

AVIGNONE-ROSSA ,C.A. & MIGNONE, C. δ - endotoxin activity and spore production in batch and fed-batch cultures of *Bacillus thuringiensis*. **Biotechnology Letters**, Middlesex, 5(3): 295-300, 1993.

AVIGNONE-ROSSA, C.; ARCAS, J.; MIGNONE, C. *Bacillus thuringiensis* growth, sporulation and δ - endotoxin production in oxygen limited and non-limited cultures. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, 8(3): 301-4, 1992.

BENS, G. & ALTWEGG, A. Safety of *Bacillus thuringiensis* for earthworm. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, 26: 125-6, 1975.

BRIGGS, J.D. Comercial productions of insect pathogens. In: STEINHAUS, E.A., ed. **Insect pathology**. New York, Academic Press, 1963. v. 2, p. 519-48.

CANNON, R.J.C. Prospects and progress for *Bacillus thuringiensis* - based pesticides. **Pesticide Science**, London, 37(4): 331-5, 1993.

CAPALBO, D.M.F. Desenvolvimento de um processo de fermentação semi-sólida para obtenção de *Bacillus thuringiensis* Berliner. Campinas, 1989. 159p. (Doutorado - Universidade Estadual de Campinas).

CAPALBO, D.M.F. & MORAES, I.O. Study of continuous fermentation for obtaining bacterial insecticide to control agricultural pests. In: JAPAN-BRAZIL SYMPOSIUM ON SCIENCE AND TECHNOLOGY, 4., São Paulo, 1984. *Anais*. São Paulo, Academia de Ciências do Estado de São Paulo, 1984. p. 248-55.

CAPALBO, D.M.F. & MORAES, I.O. Produção de inseticida biológico com *Bacillus thuringiensis*. Jaguariúna, EMBRAPA/CNPDA, 1987. 15p. (EMBRAPA/CNPDA. Boletim de Pesquisa, 1).

CAPALBO, D.M.F.; MORAES, I.O.; SOBRINHO, M.R.; CONTI, H.H. Obtenção de bioinseticida à base de *Bacillus thuringiensis* em novos meios de cultura. *Pesticidas - Revista Técnico Científica*, Curitiba, 1(1): 13-9, 1991.

CARDOSO, V.A.; RIOS, E.M.; LOPES, C.E. Produção de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* em meio líquido. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 2., Brasília, 1990. *Resumos*. Brasília, EMBRAPA/CENARGEN, 1990. p.94.

COUCH, T.L. & ROSS, D.A. Production and utilization of *Bacillus thuringiensis*. **Biotechnology and Bioengineering**, Easton, 22: 1297-304, 1980.

DHARMSTHITI, S.C.; PANTUWATANA, S.; BHUMIRATANA, A. Production of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* strain 1593 on media using a byproduct from a monosodium glutamate factory. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, 46: 231-8, 1985.

DIAS, J.M.C.S.; HONDA, C.S.; SCHENKEL, R.G.M. Desenvolvimento do processo de produção de *Bacillus sphaericus*, um bioinseticida contra mosquitos. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 2., Brasília, 1990. **Resumos**. Brasília, EMBRAPA/CENARGEN, 1990. p.99.

DULMAGE, H.T. Production of the spore- δ -endotoxin complex variants of *Bacillus thuringiensis* in two fermentation media. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, 16: 385-9, 1970.

DULMAGE, H.T. Production of δ -endotoxin by eighteen isolates of *Bacillus thuringiensis*, serotype 3, in 3 fermentation media. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, 18: 353-8, 1971.

- DULMAGE, H.T. & RHODES, R.A. Production of pathogens in artificial media. In: BURGESS, H.D. & HUSSEY, N.W., ed. **Microbial control of insects and mites.** London, Academic Press, 1971. p. 508-40.
- ERTOLA, R. Production of *Bacillus thuringiensis* insecticides. In: AIBA, S., ed. **Horizons of biochemical engineering.** Tokyo, University Press, 1987. p. 187-99.
- FALOCI, M.M.; YANTORNO, O.M.; MARINO, H.A.; ARCAS, J.A.; ERTOLA, R.J. Effect of the media composition on the growth parameters and biological properties of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* delta-endotoxin. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, 6(1): 32-8, 1993.
- FERNANDEZ, W.L.; OCAMPO, T.A.; PEREZ, D.C. Cocconut water in three media reduces cell yield of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* Berliner. **Philippine of Agriculturist**, Laguna, 58(7/8): 273-9, 1975.

FODA, M.S.; SALAMA, H.S.; FADEL, M. Local production of *Bacillus thuringiensis* in Egypt: advantages and constraints. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON *Bacillus thuringiensis* AND ITS APPLICATION AS IT RELATES TO DEVELOPING COUNTRIES, 1., Cairo, 1993. **Proceedings**. Cairo, NCR/Cairo. p. 149-65.

GERMANI, J.C. & THOMAS, R.W.S.P. Produção de *Bacillus sphaericus* S2 com matérias-primas regionais e avaliação de sua atividade larvicida. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 4., Gramado, 1994. **Resumos**. Pelotas, EMBRAPA/CPATB, 1994. p.99.

GILL, S.S; COWLES, E.A.; PIETRANTONIO, P.V. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, 37: 615-36, 1992.

GOLDBERG, I.; SNEH, B.; BATTAT, E.; KLEIN, D. Optimization of a medium for a high yield production of spore-crystal preparation of *Bacillus thuringiensis* effective against the egyptian cotton leaf worm *Spodoptera littoralis* Boisd. **Biotechnology Letters**, Middlesex, 2(10): 419-26, 1980.

GREENE, G.L.; LEPPLA, N.C.; DICKERSON, W.D. Velvetbean caterpillar: A rearing procedure and artificial medium. *Journal of Economic Entomology*, College Park, 69(4): 487-8, 1976.

HABIB, M.E.M. & ANDRADE, C.F.S. Bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S.B., coord. *Controle microbiano de insetos*. São Paulo, Manole, 1986. p. 125-70.

HAJI, F.N.P. Histórico e situação atual da traça do tomateiro nos perímetros irrigados do submédio São Francisco. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 3., Águas de Lindóia, 1992. *Anais*. Jaguariúna, EMBRAPA/CNPMA, 1992. p. 57-63.

HERTLEIN, B.C.; HORNBY, J.; LEVY, R., MILLER Jr., T.W. Prospects of spore-forming bacteria for vector control with special emphasis on their local production potencial. In: GENERAL MEETING OF THE SOCIETY FOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY, 37., Flagstaff, 1980. *Proceedings*. Arlington, Society for Industrial Microbiology, 1981. p. 53-60.

- IGNATENKO, Y.N.; SAKHAROVA, Z.V.; KHOVRYCHEV, M.P.; SHEVTSOV, V.V. Effect of temperature and aeration on growth and spore formation in *Bacillus thuringiensis*. *Microbiology*, New York, 52(5): 553-6, 1983.
- LAMBERT, B. & PEFEROEN, M. Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*. *Bioscience*, Washington, 42(2): 112-22, 1992.
- LÜTHY, P.; CORDIER, J.L.; FISCHER, H.M. *Bacillus thuringiensis* as a bacterial insecticide: basic considerations and application. In: KURSTAK, E., ed. *Microbial and viral pesticides*. New York, Marcel Dekker, 1982. p. 35-74.
- MAJUNDER, S.K. & PADMA, M.C. Screening of carbohydrates for esporulation of bacilli in a fluid medium. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, 3: 639-42, 1957.
- MARQUES, I.M.R. Ação de *Bacillus thuringiensis* Berliner var. *kurstaki* sobre *Scrobipalpuloides absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) e sua interação com o parasitóide *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Piracicaba, 1994. 75p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/ USP).

MORAES, I.O. Obtenção de inseticidas bacterianos por fermentação submersa. Campinas, 1973. 69p. (Mestrado - Faculdade de engenharia de Alimentos/ UNICAMP).

MORAES, I.O. & CAPALBO, D.M.F. Agroindustrial as a medium for growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis*. In: SIMPÓSIO ANUAL DA ACADEMIA DE CIÊNCIAS DO ESTADO DE SÃO PAULO, 11., São Paulo, 1986a. **Anais**. São Paulo, Academia de Ciências do Estado de São Paulo, 1986a. p. 195-202.

MORAES, I.O. & CAPALBO, D.M.F. Produção de bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S.B. coord. **Controle microbiano de insetos**. São Paulo, Manole, 1986b. p. 297-310.

MORAES, I.O.; SANTANA, M.H.A.; HOKKA, C.O. The influence of oxygen concentration on microbial insecticide production. In: INTERNATIONAL FERMENTATION SYMPOSIUM, 6., London, 1980. **Proceedings**. London, Pergamon Press, 1980. p. 75-9.

- MUMMIGATTI, S.G. & RAGHUNATHAN, A.N. Production of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* by three different methods and its relative toxicity to *Bombyx mori*. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 51(2): 115-8, 1988.
- MUMMIGATTI, S.G. & RAGHUNATHAN, A.N. Influence of media composition on the production of δ - endotoxin by *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 55(2): 147-51, 1990.
- MURREL, W.G. Spore formation and germination as a microbial reaction to the environment. In: SYMPOSIUM OF THE SOCIETY FOR GENERAL MICROBIOLOGY, 11., Cambridge, 1961. *Proceedings*. Cambridge, Society for General Microbiology, 1961. p.100-50.
- NAGAMA, M.V.; RAGUNATHAN, A.N.; MAJUNDER, S.K. A new medium for *Bacillus thuringiensis* Berliner. *Journal of Applied Bacteriology*, London, 35: 367-70, 1972.
- NICKERSON, K.W. & BULLA Jr., L.A. Physiology of spore forming bacteria associated with insects: minimal nutritional requirements for growth, sporulation and parasporal crystal formation of *Bacillus thuringiensis*. *Applied Microbiology*, Berlin, 28(1): 124-8, 1974.

- OBETA, J.A.N. & OKAFOR, N. Production of *Bacillus sphaericus* strain 1593 primary powder on media made from locally obtained Nigerian agricultural products. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, 29: 704-9, 1983.
- PANTUWATANA, S.; PANBANGRED, W.; BHUMIRATANA, A. Novel simple production and formulation techniques for *Bacillus thuringiensis* in Thailand. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON *Bacillus thuringiensis* AND ITS APPLICATION AS IT RELATES TO DEVELOPING COUNTRIES, 1., Cairo, 1993. *Proceedings*. Cairo, NCR/Cairo. p. 213-19.
- PEARSON, D. & WARD, O.P. Effect of culture conditions on growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and development of media for production of the protein crystal endotoxin. *Biotechnology Letters*, Middlesex, 10(7): 451-6, 1988.
- PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E.C.S. *Microbiologia*. Vol. 1. São Paulo, McGraw-Hill, 1980. v.1, 566p.
- PEREZ, M. & GONZALEZ, F. Estudio comparativo de los medios líquidos para la reproducción de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. *Protección de plantas*, La Habana, 7(1): 75-80, 1984.

- PRASERTPHON, S. Development of production and application of *Bacillus thuringiensis* Berliner in Thailand. s.l., Plant Protection, 1975. 26p. (Technical Bulletin, 34). Apud Review of Agricultural Entomology, Wallingford, 65(8): 1243, Ago, 1977. (Resumo)
- ROGOFF, M.H. & YOSTEN, A.A. *Bacillus thuringiensis*: microbial considerations. Annual Review of Microbiology, Palo Alto, 23: 357-86, 1969.
- ROGOFF, M.H.; IGNOFFO, C.M.; SINGER, S.; GARD, I.; PRIETO, A.P. Insecticidal activity of thirty-one strains of *Bacillus* against five insect species. Journal of Invertebrate Pathology, New York, 14: 122-9, 1969.
- SAKHAROVA, Z.V.; RABOTNOVA, I.L.; KHOVRYCHEV, M.P. Growth and spore-formation in *Bacillus thuringiensis* at high substrate concentrations. Mikrobiologiya, Moscow, 57(6): 992-5, 1988.
- SALAMA, H.S. & SHARABI, A. Histopathological changes in *Heliothis armigera* infected with *Bacillus thuringiensis* as detected by electron microscopy. Insect Science and its Application, Nairobi, 6(4): 503-11, 1985.

SALAMA, H.S.; FODA, M.S.; DULMAGE, H.T.; EL-SHARABY, A.
Novel fermentation media for production of δ - endotoxin
from *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Invertebrate
Pathology*, New York, 41: 8-19, 1983a.

SALAMA, H.S.; FODA, M.S.; EL-SHARABY, A.; SELIM, M.H. A
novel approach for whey recycling in production of
bacterial insecticides. *Entomophaga*, Paris, 28(2): 151-
60, 1983b.

SALAMA, H.S.; FODA, M.S.; SELIM, M.H.; EL-SHARABY, A.
Utilization of fodder yeast and agro-industrial by-
products in production of spores and biologically active
endotoxins from *Bacillus thuringiensis*. *Zentralblatt
für Mikrobiologie*, Jena, 183: 553-63, 1983c.

SANCHES, E.G.; SANTOS, Z.F.; PINHEIRO, E.S. Desenvolvimento
de formulações para meios alternativos de fermentação,
específicos para biomassas entomopatogênicas. In:
SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 4., Gramado, 1994.
Resumos. Pelotas, EMBRAPA/CENARGEN, 1994. p.75.

SCHERRER, P.; LÜTHY, P.; TRUMPI, B. Production of δ -
endotoxin by *Bacillus thuringiensis* as a function of
glucose concentrations. *Applied Microbiology*, Berlin,
25(4): 644-6, 1973.

SIKDAR, D.P.; MAJUNDAR, M.K.; MAJUNDAR, S.K. Effect of minerals on the production of the delta-endotoxin by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Biotechnology Letters*, Middlesex, 13(7): 511-4, 1991.

SINGER, S.; GOODMAN, N.S.; ROGOFF, M.H. Defined media for the study of bacilli pathogenic to insects. *Annals of the New York Academy of Sciences*, New York, 139: 19-29, 1966.

SMIRNOFF, W.A. The formation of crystal in *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* before sporulation, at low-temperature incubation. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 5(2): 242-50, 1963.

SMITH, R.A. Effect of strain and medium variation on mosquito toxin production by *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, 28(9): 1089-92, 1982.

SUTTER, G.R. & RAUN, E.S. Histopathology of european corn borer larvae treated with *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, 9: 90-103, 1967.

- TANADA, Y. & KAYA, H.K. *Insect pathology*. San Diego, Academic Press, 1993. 666p.
- TIANJIAN, X.; TIANLIAN, M.; XINZHU, X.; ZIWEN, Y. Metabolic characteristics of *Bacillus thuringiensis* during submerged fermentation. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON *Bacillus thuringiensis* AND ITS APPLICATION AS IT RELATES TO DEVELOPING COUNTRIES, 1., Cairo, 1993. *Proceedings*. Cairo, NCR/Cairo. p. 213-19.
- VENTOSILLA, P.; SNYDER, M.; VELEZ, J.; GUERRA, H.; NOVAK, P. Community biological control of malaria using coconut-produced *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*) H-14 in Piura, Peru. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 4., Gramado, 1994. *Resumos*. Pelotas, EMBRAPA/CPATB, 1994. p.124.
- VILELLA, P.O.; HONDA, C.S.; DIAS, J.C.M.S. Estudos preliminares da utilização de glicerol como fonte de carbono para *Bacillus sphaericus*. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 2., Brasília, 1990. *Resumos*. Brasília, EMBRAPA/CPATB, 1990. p.102.
- WEINBERG, E. The effect of Mn^{+2} and antimicrobial drugs on sporulation of *Bacillus subtilis* in nutrient broth. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, 70: 289-96, 1955.