

UTILIZAÇÃO DE SUBPRODUTOS INDUSTRIAIS NA OBTENÇÃO DE
BIOMASSAS ATIVAS DE
Bacillus thuringiensis BERLINER.

MARIA HELENA LUZ DA SILVA

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA VETERINÁRIA

UTILIZAÇÃO DE SUBPRODUTOS INDUSTRIAIS NA OBTENÇÃO DE
BIOMASSAS ATIVAS DE
Bacillus thuringiensis BERLINER.

MARIA HELENA LUZ DA SILVA

Sob a orientação do Prof. AURINO FLORENCIO DE LIMA e co-orientação da
Profª Drª ELIANA FLÁVIA CAMPORESE SÉRVULO e Prof. Dr. OSAMU
KIMURA (*in memoriam*).

Tese submetida como requisito parcial
para a obtenção do grau de *Magister*
Scientiae em Microbiologia Veterinária.

SEROPÉDICA, RIO DE JANEIRO
JULHO, 1995

637.1272
S586u
T

UTILIZAÇÃO DE SUBPRODUTOS INDUSTRIAIS NA OBTENÇÃO DE
BIOMASSAS ATIVAS DE
Bacillus thuringiensis BERLINER.

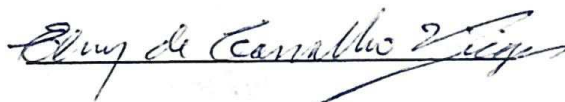
MARIA HELENA LUZ DA SILVA

APROVADA EM : 19/07/1995


AURINO FLORENCIO DE LIMA



ELSON DE CARVALHO VIEGAS



VANIA RITA ELIAS PINHEIRO BITTENCOURT



Aos meus pais, Antonio e Elzira, por todos os esforços
feitos ao longo dos anos, para a
minha formação pessoal
e profissional.

Aos meus irmãos Maria José, Maria Tereza e Wanderley,
por sempre estarem presentes nas horas
mais difíceis, ofereço
este trabalho.

À pequena Maria Cecília e Ronaldo,
pessoas a quem muito
amo, dedico este
trabalho.

Ao Prof. Dr. Osamu Kimura (*in memorian*), a minha admiração,
respeito e gratidão, pois, sem a sua inestimável ajuda,
não seria possível a realização de
grande parte deste
trabalho.

BIOGRAFIA

Maria Helena Luz da Silva, filha de Antonio da Silva e Elzira Luz da Silva, nasceu em 13 de janeiro de 1966, na cidade do Rio de Janeiro, RJ.

Tendo ingressado na Universidade Federal Fluminense em março de 1983, concluiu o Curso de Farmácia em agosto de 1986, e, em janeiro de 1989, o de Habilitação em Farmácia Industrial.

Foi bolsista de Aperfeiçoamento do CNPq, no Projeto “Inseticida biológico de origem bacteriana”, desenvolvido no Laboratório de Fisiologia Bacteriana (LFB), do Departamento de Bacteriologia do Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, no período de março de 1988 a fevereiro de 1989, onde participou do grupo envolvido no pedido de privilégio e garantia de prioridade depositado no INPI. Este, resumidamente, descreve o processo de isolamento e a composição de meio de cultura para a produção de *Bacillus* entomopatogênicos, sob a coordenação do Prof. Dr. Leon Rabinovitch.

Em junho de 1989, foi contratada como Biotecnologista pelo Convênio INPAL Indústrias Químicas - FIOCRUZ, para o desenvolvimento, também no LFB, de processo visando a produção industrial de inseticida de origem bacteriana, atividade na qual permaneceu até março de 1992, quando então ingressou no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Veterinária, do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Entre os anos de 1990 e 1995, foi co-autora de alguns trabalhos apresentados em Congressos e publicados em revistas, versando sobre inseticida de origem bacteriana.

AGRADECIMENTOS

- A Deus, por ter me ajudado a concluir mais uma etapa do meu caminho.
- Aos Professores Aurino Florencio de Lima - UFRRJ, Eliana Flávia Caponese Sérvulo - UFRJ e Osamu Kimura - UFRRJ (*in memorian*), pela orientação, apoio e estímulo para a conclusão desta tese.
- Ao Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária e de Biologia Vegetal da UFRRJ, pelo uso dos laboratórios.
- À Indústria de laticínios “Leite na Vaca” e à Ajinomoto Interamericana Indústria e Comércio, pelo fornecimento das matérias-primas.
- Ao Departamento de Bromatologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal Fluminense, pelas análises preliminares realizadas em soro de leite.
- Ao Prof. Elson de Carvalho Viégas, do Departamento de Fitotecnia da UFRRJ, pela constante ajuda, amizade, carinho e ensinamentos, que forneceram o estímulo necessário para o término deste trabalho.
- Ao Dr. Leon Rabinovitch (LFB-FIOCRUZ), que acompanhou, atenciosamente, o meu início profissional.
- Ao Prof. Dr. José Postali Parra, da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ-USP), pela cessão de ovos de *Anagasta kuehniella* para o início da criação, possibilitando a realização dos bioensaios, e ao Engenheiro Agrônomo Paulo Osório de Carvalho, pela inestimável ajuda na elaboração dos mesmos.

- Ao pesquisador Carlos José P. C. Araujo Coutinho, da Superintendência do Controle de Endemias do Estado de São Paulo (SUCEN), pela realização dos bioensaios em larvas de mosquito.
- À Prof^ª. Dr^ª Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt, do Departamento de Parasitologia da UFRRJ, pelo auxílio e sugestões.
- À Prof^ª Maria Alice Cruz Lopes de Souza, do Departamento de Tecnologia Química da UFRRJ, pelo empréstimo de reagentes e vidrarias.
- À amiga e colega do Curso de Mestrado Clara de Fátima Gomes Cavados, pela amizade, carinho, apoio e auxílio dados durante todas as etapas do Curso.
- A Mario Roberto do Amaral, do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Engenharia Bioquímica da Escola de Química da UFRJ, pelo auxílio prestado nas análises de fósforo.
- A Wilson Pereira de Andrade, do Laboratório de Programa de Análise de Alimentos, do Departamento de Tecnologia da UFRRJ, pelo auxílio prestado nas análises de nitrogênio.
- Ao Engenheiro Agrônomo Júlio César Perruso, pela amizade e auxílio na execução das análises estatísticas.
- À Bibliotecária Maria José da Silva Fernandes, da Divisão de Informação Documental da Biblioteca Nacional, pela normalização das referências bibliográficas.
- A Paulo César Costa de Melo e Ricardo Greco Merola, pelo auxílio prestado na digitação do trabalho.
- Aos colegas de laboratório de Fitopatologia, principalmente Marcelo e Flávio, pela constante ajuda.
- Ao CNPq e à CAPES, pelas bolsas concedidas durante o desenvolvimento desta pesquisa.
- A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
ÍNDICE DE TABELAS	xiv
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xix
1 - INTRODUÇÃO	1
2 - REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1- Microrganismo	5
2.1.1- Características Gerais	5
2.1.2- Histórico.....	6
2.1.2.1- Isolamento	6
2.1.2.2- Taxonomia <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>	7
2.1.3- <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>	8
2.2- Metabólitos tóxicos produzidos por <i>Bacillus thuringiensis</i>	9
2.2.1- Beta-exotoxina	10
2.2.2- Delta-endotoxina	11
2.3- Produção de <i>Bacillus thuringiensis</i>	14
2.3.1- Considerações gerais	14
2.3.2- Microrganismo	15
2.3.3- Meio de cultura	15

2.3.4- pH.....	20
2.3.5- Temperatura	21
2.3.6- Aeração	21
2.3.7- Separação e formulação	22
2.3.8- Padronização	23
2.4- Soro de leite	24
2.5- AMINOFÉRTIL II	25
2.6- <i>Culex saltanensis</i>	27
3- MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1- Microrganismo	30
3.2- Manutenção do microrganismo	30
3.3- Preparo do inóculo	30
3.4- Subprodutos testados	31
3.4.1- Soro de leite.....	31
3.4.2- AMINOFÉRTIL II	32
3.5- Cultivo do <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>	32
3.5.1- Meios de cultura	32
3.5.1.1- Caldo nutriente suplementado com sais e glicose (CNS).....	32
3.5.1.2- Soro de leite (SL)	32
3.5.1.3- Soro de leite diluído (SLD)	33
3.5.1.4- AMINOFÉRTIL II (AMF)	33
3.5.1.5- Soro de leite + AMINOFÉRTIL II (SL + AMF)	33
3.5.2- Produção de biomassa ativa	33
3.5.3- Recuperação de esporos e cristais	34
3.5.4- Determinações quantitativas	35

3.5.4.1- Quantificação celular	35
3.5.4.2- Contagem de células viáveis	35
3.5.4.3- Contagem de esporos viáveis	35
- No cultivo	35
- No produto final obtido	36
3.5.4.4- Determinação do pH	36
3.6- Estudo do consumo de nutrientes	36
3.6.1- Dosagem de lactose	36
3.6.2- Dosagem de fósforo	36
3.6.3- Dosagem de proteína	37
3.7- Determinação da atividade biológica	37
3.7.1- Criações.....	37
3.7.1.1- <i>Culex saltanensis</i>	37
3.7.1.2- <i>Anagasta kuehniella</i>	38
3.7.2- Bioensaios	39
3.7.2.1- <i>Culex saltanensis</i>	39
3.7.2.2- <i>Anagasta kuehniella</i>	39
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1- Cinética do cultivo de <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> em Caldo Nutriente.....	41
4.2- Cultivo do <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> nos meios de cul- tura testados.....	43
4.3- Estudo do consumo de nutrientes.....	49
4.4- Determinação da atividade biológica	52
5- CONCLUSÕES.....	59
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
7- APÊNDICE.....	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma do processo de fabricação de GMS pela Ajunomoto do Brasil	28
Figura 2. Cinética do crescimento de <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> em meio Caldo Nutriente, à temperatura de $32^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e agitação de 180 rpm. Média de três experimentos	42

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Tempo de cultivo, concentrações celulares (ufc/mL e esporos/mL) e pH final no cultivo de <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> em cinco diferentes meios de cultura.....	44
Tabela 2. Consumo de nutrientes (proteína, fósforo e lactose) pela bactéria <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> , cultivada em diferentes meios de cultura.....	50
Tabela 3. Mortalidade corrigida de larvas L3/L4 do mosquito <i>Culex saltanensis</i> , após 24 h de exposição a diferentes concentrações de biomassas ativas de <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> , produzidas em diferentes meios de cultura.....	53
Tabela 4. Mortalidade corrigida de larvas de 3º/4º instares de <i>Anagasta kuehniella</i> , após 7 dias de exposição a diferentes concentrações de biomassa ativa de <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> , produzidas em diferentes meios de cultura.....	55

Tabela 5. Mortalidade corrigida de larvas de 3º/4º ínstaes de <i>Anagasta kuehniella</i> , após 7 dias de exposição a diferentes concentrações de biomassa ativa de <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> , produzida em meio soro de leite (SL).....	55
Tabela 6. Concentração letal 50% (CL50) e intervalos de confiança com 95% de probabilidade das biomassas ativas produzidas a partir do cultivo de <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> , em diferentes meios de cultura, para larvas de 3º/4º ínstaes de <i>Anagasta kuehniella</i>	56
Tabela 7. Concentração de esporos viáveis contidos em um miligrama das biomassas ativas, obtidas a partir do cultivo de <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> , em diferentes meios de cultura.	57

RESUMO

O soro de leite (subproduto da fabricação de queijo) e o AMINOFÉRTIL II (subproduto da indústria de glutamato monossódico) foram utilizados na elaboração de meios de cultura, para se avaliar a viabilidade da sua utilização na produção de biomassas ativas da bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*.

A amostra bacteriana empregada foi isolada a partir do produto comercial DIPEL, e cultivada em cinco meios de cultura diferentes: caldo nutriente suplementado com sais e glicose (CNS), utilizado como meio de referência para fins comparativos; soro de leite (SL), tendo o soro de leite desproteínizado como único componente; soro de leite diluído (SLD), obtido pela diluição 1:1 do soro de leite desproteínizado em água filtrada; AMINOFÉRTIL 4% (AMF), obtido pela diluição a 4% do AMINOFÉRTIL II em água filtrada e soro de leite + AMINOFÉRTIL (SL + AMF), obtido pela combinação de 4% do AMINOFÉRTIL II em soro de leite desproteínizado.

Os experimentos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio teste por frasco, incubado à temperatura de $32^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ sob agitação de 180 rpm, em agitador rotatório, até a obtenção de esporos e cristais. Os frascos foram inoculados com 2% de inóculo, que foi preparado em

frasco Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de meio caldo nutriente e incubado por 4,5 h nas mesmas condições citadas anteriormente.

Quantificações celulares (células e esporos viáveis) foram realizadas, e os resultados analisados estatisticamente. Entre os meios testados, o AMF demonstrou ser o mais favorável para o cultivo da bactéria, embora todos tenham sido capazes de promover o crescimento, esporulação e formação dos cristais de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*.

Ensaaios de atividade biológica foram realizados com as biomassas produzidas, e, para tal fim, utilizaram-se larvas L3/L4 de *Culex saltanensis* (Dyar, 1928) e de 3º e 4º instares de *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879). Verificou-se que não houve influência do meio de cultura na toxicidade da fração mosquitocida (contida nos cristais protéicos do *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*), sendo as biomassas produzidas inativas contra o *C. saltanensis*, nas concentrações usadas nos bioensaaios. Para *A. kuehniella*, verificou-se que os meios AMF e SLD produziram atividade tóxica semelhante à do meio CNS, o mesmo não acontecendo em relação aos meios SL e SL + AMF.

Estudos do consumo de nutrientes foram realizados, e observou-se que a proteína e o fósforo apresentaram consumo diferenciado nos meios de cultura testados. A lactose não foi consumida dos meios contendo soro de leite, apesar do teste bioquímico previamente realizado ter fornecido um resultado fracamente positivo.

Os resultados obtidos demonstraram que, entre os meios testados, o AMF e o SLD produziram as biomassas com maiores atividades. Entretanto, o meio AMF é o mais indicado para estudos mais detalhados, com vistas à otimização, pois produz concentração celular e toxicidade de cristais satisfatórias. O meio SLD não é uma opção adequada para estudos em relação à produção de *B. thuringiensis*

subsp. *kurstaki* devido ao mesmo não consumir lactose, responsável por grande parte do poder poluente do soro de leite.

Desta forma, verificou-se que o soro de leite e o AMINOFÉRTIL II são subprodutos viáveis para a obtenção de biomassas ativas de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*.

ABSTRACT

Whey (byproduct of cheese industry) and AMINOFÉRTIL II (byproduct of monossodium glutamate factory) were used in the elaboration of culture media, in order to evaluate the viability of their utilization in the production of active biomass of the entomopathogenic bacterium *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki*.

The bacterial specimen used was isolated from the commercial product DIPEL, and cultured in five different media: nutrient broth supplemented with salts and glicose (NBSG), used as a parameter; whey (W), having deproteinized whey as unique component; diluted whey (DW), obtained from the dilution 1:1 in filtered water; AMINOFÉRTIL 4% (AMF), obtained from the dilution 4% of AMINOFÉRTIL II in filtered water and whey + AMINOFÉRTIL II (W + AMF), obtained from the combination of 4% of AMINOFÉRTIL II in deproteinized whey.

Experiments were carried through in 500 mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL of test medium per flask, incubated at $32^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ at 180 rpm in a rotatory shaker until spores and crystals attainment. Flasks were seeded with 2% of the inoculum prepared in 250 mL Erlenmeyer flask containing 50 mL of nutrient broth incubated for 4,5 h in the same conditions cited above.

Cellular quantifications (viable cells and spores) were made and the results statistically analysed. Among the tested media AMF was the best for the bacterium

cultivation, although all of them have been capable of promoting growth, sporulation and crystal formation of *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*.

Bioassays were made with the produced biomasses and for this purpose, L3/L4 *Culex saltanensis* (Dyar, 1928) larvae and 3rd/4th instar *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) larvae were used. It was verified that culture medium has exerted no influence on the mosquitocidal fraction's toxicity (enclosed in the *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*'s proteinaceous crystals) being the produced biomass inactive against *C. saltanensis* in the bioassays concentrations used. For *A. kuehniella* it was verified that AMF and DW media produced similar toxic activity in relation of NBSG medium, the same not occurring with W and DW + AMF media.

Nutrients consumption study was made and it was observed that there was a differentiated consumption of protein and phosphorus in the culture media tested. Even though a previous performed biochemical test have resulted in a weak positive response, lactose was not consumed from the whey's media.

The obtained results have demonstrated that among the tested media AMF and DW have produced the most active biomasses. However, AMF medium is the more indicated for intense studies aiming the optimization, because it produces good celular concentrations and crystals toxicity. DW medium is not an adequate option *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*'s production studies, because it doesn't consume lactose, the greater responsible for whey's pollution.

In this way it was verified that whey and AMINOFÉRTIL II are viable byproducts for *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*'s cultivation.

1 - INTRODUÇÃO

O homem, desde a antigüidade, tem procurado uma metodologia eficaz para o combate de insetos causadores de danos à agricultura e vetores de doenças nos homens e animais.

O controle biológico já era utilizado pelos antigos chineses, que faziam o uso de formigas em citros como predadoras de insetos-pragas. A possibilidade de utilização de microrganismos entomopatogênicos para o controle de insetos, no entanto, só foi demonstrada no século XIX por Metschnikoff, em 1879, e por Krassillstschick, em 1888, que produziram e aplicaram o fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) *sorokin* para o controle da broca de grãos e gorgulho da beterraba (IGNOFFO & ANDERSON, 1979). Com o advento da síntese de inseticidas químicos nas décadas de 40 e 50, o interesse pelas formas alternativas de controle de insetos foi relegado a um plano secundário.

Nos últimos vinte anos vem ocorrendo uma grande mudança no uso de inseticidas químicos. A utilização intensa e indiscriminada destes causaram o desequilíbrio biológico devido à inespecificidade (o que pode levar à redução dos antagonistas e ao surgimento de espécies resistentes) e à persistência dos resíduos tóxicos no ambiente, além de possuírem riscos operacionais (RUAS NETO & OLIVEIRA, 1985). Na tentativa de minimizar os efeitos adversos dos inseticidas químicos, as formas alternativas de controle (entre elas o controle biológico), foram, aos poucos, sendo resgatadas.

O controle microbiano vem sendo cada vez mais estudado como forma de substituição ou de uso concomitante aos inseticidas químicos, reduzindo assim a quantidade destes no ambiente. Este tipo de controle utiliza entomopatógenos como fungos, vírus, bactérias, protozoários e nematóides, normalmente isolados de insetos doentes. Duas grandes vantagens dos inseticidas microbianos, segundo (HABIB & ANDRADE, 1986), são a segurança (devido à alta especificidade ao hospedeiro) e a baixa resistência encontrada entre insetos, mesmo expostos por muitos anos. No entanto, a alta especificidade também pode ser considerada uma desvantagem em algumas situações, quando várias espécies de insetos estão presentes simultaneamente. Outra desvantagem é a influência deletéria dos fatores ambientais, como umidade e luz solar, sobre estes inseticidas.

A bactéria *Bacillus thuringiensis* vem sendo cada vez mais utilizada em todo o mundo, pela facilidade de produção e reconhecido potencial larvicida. Sua toxicidade, relacionada à produção de toxinas (principalmente a delta-endotoxina, uma proteína cristalina), atinge diversos insetos, principalmente aqueles das ordens Lepidoptera, Diptera e Coleoptera (de BARJAC, 1981; ERTOLA, 1988; ROWE & MARGARITIS, 1987). As estirpes da bactéria são divididas sorologicamente em variedades, e cada uma delas possui especificidade entomopatogênica própria (de BARJAC, 1981).

O *B. thuringiensis* foi produzido industrialmente pela primeira vez na França, por volta de 1938, e, posteriormente, nos Estados Unidos, no início da década de 50. No entanto, o custo final do produto foi sempre considerado elevado, e, por este motivo, formas de minimizar tal inconveniente são intensamente pesquisadas.

O meio de cultura é um dos fatores que influencia no custo final de produção do *B. thuringiensis*. Por esta razão, há busca por ingredientes mais baratos que possam ser utilizados na produção massal da bactéria, resultando

ainda em um produto de elevada toxicidade aos insetos. Geralmente, estes ingredientes são subprodutos da indústria, normalmente descartados e lançados ao ambiente.

As formulações à base de *B. thuringiensis* inicialmente eram direcionadas para o controle de pragas na agricultura, porém, com o isolamento, em 1977, de uma variedade desta bactéria ativa contra larvas de culicídeos (mosquitos) e simulídeos (borrachudos), vetores de doenças a homens e animais, novas formulações com vistas ao controle destes insetos começaram a ser desenvolvidas.

Os mosquitos são insetos pertencentes à Família Culicidae, que são conhecidos por causarem um grande incômodo aos homens e animais, seja pelas reações alérgicas que provocam ou pela transmissão de viroses, protozooses e filarioses (RUAS NETO & OLIVEIRA, 1985). Os gêneros *Anopheles*, *Aedes* e *Culex* são os mais conhecidos, e se constituem de algumas espécies com importância médico-veterinária vetoras de doenças. No homem, a malária, a dengue e a febre amarela, e a filariose, são exemplos de moléstias transmitidas por estes gêneros, respectivamente. Nos animais, o gênero *Culex* possui um maior destaque, por ser transmissor da filariose canina, malária aviária e de encefalites; o gênero *Aedes* também é vetor de encefalites e o gênero *Anopheles* é vetor em potencial da filariose em cães e em outros animais.

Este estudo teve como objetivo avaliar a viabilidade de utilização de dois subprodutos industriais, o soro de leite (resíduo da indústria de laticínios) e o AMINOFÉRTIL II (resíduo da fermentação glutâmica), na obtenção de biomassas ativas de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. A estirpe bacteriana foi obtida a partir de formulação comercial (DIPEL), e apresenta cristal protéico ativo contra lepidópteros e dípteros. Por esta razão, a toxicidade para larvas do díptero *Culex saltanensis* (Dyar, 1928) (Diptera:Culicidae), o único vetor primário da malária

que acomete as galinhas no Brasil e Américas em geral, foi testada frente às biomassas produzidas. O controle positivo da toxicidade foi feito frente a larvas de *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) (Lepidoptera:Pyralidae), um lepidóptero encontrado em produtos armazenados.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1- Microrganismo

2.1.1- Características Gerais

A espécie estudada é uma bactéria conhecida pela atividade entomopatogênica que possui, e é classificada dentro da Família Bacillaceae, pertencendo a um dos sete gêneros existentes: o gênero *Bacillus*. As espécies deste gênero são representadas por células em formato de bastão, que, após o final da fase exponencial de crescimento formam os esporos, que são células de resistência (CLAUS & BERKELEY, 1986).

As células da espécie *B. thuringiensis* são bastonetes Gram positivos, que medem 1,0-1,2 µm de largura e 3-5 µm de comprimento. São móveis em sua grande maioria, aeróbias ou anaeróbias facultativas e desenvolvem-se a temperaturas entre 10° e 45°C. Entre outros testes bioquímicos, reduzem nitrato a nitrito, são catalase positivas e hidrolisam amido e caseína (CLAUS & BERKELEY, 1986).

Como as outras espécies do gênero, são esporogênicas. Os esporos formados são elipsoidais, e ocupam posição terminal a subterminal em esporângios não deformantes. Durante a esporulação, um ou mais cristais protéicos paraesporais fora do exosporium são formados. A produção destes cristais e a atividade larvívora

que possui para determinadas ordens de insetos são os critérios usados para a diferenciação de *B. thuringiensis* e *Bacillus cereus*, espécies intimamente relacionadas (CLAUS & BERKELEY, 1986).

2.1.2- Histórico

2.1.2.1- Isolamento

Em 1901 e 1902 um bacilo esporogênico foi isolado, no Japão, por Ishiwata, a partir de larvas doentes de *Bombyx mori* (bicho-da-seda), e denominou-o de “sotto disease *Bacillus*”. Este microrganismo não foi objeto de estudos detalhados até 1915, quando Aoki e Chigasaki demonstraram que o bacilo isolado por Ishiwata era patogênico para as larvas de *B. mori* somente quando estas ingeriam culturas esporuladas da bactéria. Observando a sintomatologia da doença, sugeriram ainda que havia a influência de uma toxina. Em 1916, Mitani e Watarai isolaram um filtrado tóxico ativo a partir de *B. thuringiensis* var. *sotto* (de BARJAC & BONNEFOI, 1968; HABIB & ANDRADE, 1986; HANNAY & FITZ-JAMES, 1955; ROGOFF, 1966).

Praticamente ao mesmo tempo, na região de Thuringia, Alemanha, Berliner, em 1911, isolou uma bactéria similar à encontrada por Ishiwata a partir de larvas doentes de *Anagasta kuehniella* (traça das farinhas). Em 1915, ele descreveu o microrganismo e demonstrou a patogenicidade para a traça das farinhas, e o denominou *Bacillus thuringiensis*. Nos estudos que realizou, Berliner observou a presença de um corpo inicialmente esférico e depois rombóide nas células esporulantes, e chamou-o de “Restkörper”. Mattes, em 1927, reisolou o bacilo do mesmo inseto e confirmou as observações de Berliner, sugerindo que esta inclusão fazia parte do sistema nuclear da célula. Smith, Gordon e Clarke, em 1946, demonstraram que o isolado de Mattes era culturalmente e

morfologicamente relacionado ao *B. cereus*, mas diferia deste pela patogenicidade a insetos e pela tendência dos esporos se localizarem obliquamente nas células (de BARJAC & BONNEFOI, 1968; HABIB & ANDRADE, 1986; HANNAY & FITZ-JAMES, 1955; ROGOFF, 1966). Até 1950, os trabalhos realizados com *B. thuringiensis* apenas indicavam a patogenicidade deste para larvas de lepidópteros, sem haver um estudo profundo dos aspectos taxonômicos e patológicos.

2.1.2.2- Taxonomia

Muitas são as semelhanças morfológicas e bioquímicas entre *B. thuringiensis* e *B. cereus*, de forma que a classificação taxonômica a nível de espécies, inicialmente, se tornava um ponto de discussão entre os pesquisadores. Smith, Gordon & Clarke, em 1946, sugeriram que *B. thuringiensis* fosse considerado uma variedade de *B. cereus* (HEIMPEL & ANGUS, 1963).

A questão taxonômica se estabilizou quando de BARJAC & BONNEFOI (1962) e BONNEFOI & de BARJAC (1963), considerando o *B. thuringiensis* como uma espécie isolada, estudaram amostras cristalíferas diferentes e utilizaram testes bioquímicos e sorologia dos antígenos flagelares (antígenos H) como critérios de diferenciação dos isolados. Assim, demonstraram que as amostras poderiam ser divididas em grupos bioquímicos e em grupos sorológicos coincidentes, isto é, para cada sorotipo havia um padrão bioquímico correspondente. No entanto, os sorotipos poderiam ser subdivididos, dependendo da presença de subfatores antigênicos e/ou da presença de diferenças bioquímicas.

NORRIS (1964) e NORRIS & BURGESS (1963), utilizando a análise eletroforética de esterases a partir de células vegetativas das bactérias cristalíferas, observaram a correspondência entre os padrões esterásicos obtidos e os grupos sorológicos já existentes, apenas com pequenas exceções. Assim, NORRIS & BURGESS (1965) propuseram que a análise esterásica também fosse usada como critério de classificação para estas bactérias.

Outros critérios de classificação, como fagotipagem, sorologia de cristal, sequenciamento de DNA, entre outros, foram sendo propostos por pesquisadores, ao longo do tempo, no intuito de se obter um melhor conhecimento e caracterização de diferentes amostras de *B. thuringiensis*. No entanto, a sorotipagem continua sendo a maneira específica mais simples para a classificação destas amostras. Hoje em dia, tem-se conhecimento de trinta e nove subespécies diferentes de *B. thuringiensis*, tendo sido as duas últimas isoladas recentemente (RABINOVITCH *et al.*, 1995).

2.1.3- *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*

O primeiro isolamento de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* foi obtido a partir de *Anagasta kuehniella* por Kurstak, em 1962. Esta e outras amostras similares, isoladas posteriormente, foram classificadas como sorotipo H-3, ou seja, *B. thuringiensis* subsp. *alesti*. No entanto, de BARJAC & LEMILLE (1970) detectaram subfatores antigênicos flagelares neste sorotipo, o que diferenciava as amostras. Assim, o sorotipo H-3 foi dividido em H3a (*B. thuringiensis* var. *alesti*) e H3a3b, denominado, então, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*.

DULMAGE (1970a) isolou, a partir de *Pectinophora gossypiella* (Saunders, 1844), uma estirpe que mostrou possuir uma atividade tóxica superior a dois produtos comerciais e ao padrão utilizado na época, proveniente do Instituto Pasteur de Paris, a qual denominou *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1.

Tendo como base a sorologia de cristal e o espectro de toxicidade a insetos, KRYWIENCZYK *et al.* (1978), estudando amostras da variedade *kurstaki*, demonstraram que o cristal protéico desta poderia ser dividido em dois grupos distintos, os quais denominaram K-1 e K-73. HALL & ARAKAWA (1981), citados por YAMAMOTO & McLAUGHLIN (1981), mencionaram que ambos

os tipos de cristais, K-1 e K-73, são altamente tóxicos para lepidópteros, mas que somente os do tipo K-1 são tóxicos para larvas de mosquito.

YAMAMOTO & McLAUGHLIN (1981) isolaram uma proteína tóxica (P-2) para larvas de *Aedes taeniorhynchus* a partir do cristal tipo K-1, presente em determinados isolados de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* e na subsp. *thuringiensis*. Propuseram, então, que P-2 fosse designada como “fator mosquito”, que difere da delta-endotoxina (cristal protéico) em certas propriedades bioquímicas, como peso molecular e ponto isoelétrico. A demonstração de que P-2 se encontra sob forma de corpo cuboidal inserido no cristal bipiramidal foi feita por YAMAMOTO & IIZUKA (1983).

2.2- Metabólitos tóxicos produzidos por *Bacillus thuringiensis*

As variedades de *B. thuringiensis* são capazes de sintetizar metabólitos tóxicos de naturezas diversas durante o ciclo de crescimento, o que justifica a atividade larvicida frente a determinadas ordens de insetos. Os mais importantes são a proteína cristalina (delta-endotoxina) e a toxina termoestável (beta-exotoxina), que possuem importância comercial. É importante ressaltar que a produção destes metabólitos é influenciada pelo meio de cultura e pelas características da amostra bacteriana (ROGOFF, 1966).

Determinadas exoenzimas, como a fosfolipase C (lecitinase C ou alfa-exotoxina), quitinases, proteases e hemolisina, são produzidas na fase vegetativa. As mesmas podem contribuir na patogenicidade a insetos a partir do momento em que as células vegetativas proliferem no epitélio intestinal após a ação primária da delta-endotoxina, ajudando, assim, a penetração da bactéria na hemocele, causando septicemia letal. Do ponto de vista prático, as exoenzimas possuem papel secundário, já que não estão presentes nas preparações comerciais, e somente aparecem com o desenvolvimento e proliferação de células vegetativas (LÜTHY & EBERSOLD, 1981).

2.2.1- Beta-exotoxina

A beta-exotoxina é um composto extracelular produzido por células vegetativas, que permanece no sobrenadante das culturas esporuladas de *B. thuringiensis* (CANTWELL *et al.*, 1964). Sua presença pode ser detectada nos sobrenadantes de diversas variedades (LÜTHY & EBERSOLD, 1981; NORRIS, 1970; ROGOFF & YOUSTEN, 1969), e, dentro de um mesmo sorotipo, há isolados produtores ou não da beta- exotoxina (OHBA, 1981). Esta difere da delta-endotoxina pela natureza química, termoestabilidade e amplo espectro de ação, sendo ativa contra diversas ordens de insetos. No entanto, quando juntas, as duas toxinas agem sinergicamente (LECADET & de BARJAC, 1981).

A estrutura química da beta-exotoxina é análoga à do ATP, e, assim sendo, a mesma age impedindo a síntese do RNA, através da inibição da RNA-polimerase DNA-dependente (SEBESTA & HORSKÁ, 1968). Ela se liga ao sítio específico do ATP do complexo DNA-enzima, impedindo o passo da polimerização (SEBESTA & HORSKÁ, 1970).

Além de ser tóxica para insetos, a beta-exotoxina também o é para mamíferos, o que foi demonstrado por SEBESTA & HORSKÁ (1968) e de BARJAC & RIOU (1969). MERETOJA *et al.* (1977) verificaram a ação mutagênica da toxina, também em mamíferos. Devido ao mecanismo de inibição enzimática e à potencial ação mutagênica que possui, os produtos contendo linhagens de *B. thuringiensis* produtoras de beta-exotoxina foram banidos dos Estados Unidos e Europa Ocidental, sendo substituídos por outros à base de linhagens não produtoras. No entanto, os países da Europa Oriental continuam a utilizar produtos contendo a beta-exotoxina, aparentemente sem efeitos indesejáveis (HABIB & ANDRADE, 1986; LÜTHY & EBERSOLD, 1981).

2.2.2- Delta-endotoxina

A principal característica das diversas subespécies de *Bacillus thuringiensis*, entre elas o *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, é a produção de uma ou mais inclusões cristalinas, tóxicas para larvas de insetos, durante a fase de esporulação. Cristal protéico, cristal paraesporal, delta-endotoxina ou simplesmente cristal, são as denominações usuais dadas a esta inclusão. Sua existência foi observada por HANNAY (1953), que também a associou com a patogenicidade a insetos, o que foi confirmado por ANGUS (1954; 1956a; 1956b). Na verdade, é uma protoxina constituída de subunidades protéicas que se agregam, incluindo a delta-endotoxina, que é o maior componente do cristal paraesporal. A conversão protoxina-toxina pode ocorrer tanto “in vitro” quanto “in vivo” (intestino dos insetos), através da solubilização do cristal em pH fortemente alcalino e da presença de proteases, que originam os peptídeos tóxicos (LÜTHY & EBERSOLD, 1981; WHITELEY & SCHNEPF, 1986). Desta forma, o espectro de atividade é influenciado pela composição do lúmen intestinal, o que afeta a solubilização e/ou a proteólise, a composição total do cristal e a presença ou não de receptores específicos para a toxina no intestino dos diferentes insetos (HÖFTE & WHITELEY, 1989; HONÉE & VISSER, 1993).

A natureza protéica dos cristais foi primeiramente relatada por HANNAY & FITZ-JAMES (1955). A proteína do cristal é sintetizada a partir da quebra de proteínas intracelulares durante as primeiras fases da esporulação. As subunidades que a formam são então dispostas de forma tal a produzirem uma estrutura cristalina (BULLA Jr. *et al.*, 1977; NORRIS, 1970; ROGOFF, 1966; ROGOFF & YOUSTEN, 1969). Segundo DELAFIELD *et al.* (1968) e SOMERVILLE *et al.* (1968), as proteínas do cristal e da capa do esporo são imunologicamente e bioquimicamente similares, sugerindo que a formação do cristal seja consequência da produção irregular da proteína do esporo. ARONSON

et al. (1982) também encontraram proteína similar à do cristal na capa do esporo, porém em menor quantidade.

Os cristais são formados durante os estágios II e III da esporulação (ARONSON *et al.*, 1986; BULLA Jr. *et al.*, 1977; LÜTHY & EBERSOLD, 1981; SOMERVILLE, 1971), porém MIKKOLA *et al.* (1982) relataram que variações ocorrem, dependendo da subespécie de *B. thuringiensis*. O mesmo acontece no que se refere ao tamanho e à forma dos cristais, que também são afetados pelas condições de cultivo da bactéria (NORRIS, 1970; ROGOFF, 1966). Muitas vezes, a morfologia encontrada é a bipiramidal, mas outras formas, como cuboidais, esféricas e irregulares também já foram relatadas (HEIMPEL & ANGUS, 1963; MIKKOLA *et al.*, 1982). MIKKOLA *et al.* (1982) correlacionaram a morfologia dos cristais ao grupo de insetos aos quais são patogênicos. Assim, cristais bipiramidais afetam lepidópteros; irregulares, afetam os dípteros e quadrados ou rombóides, os coleópteros.

Com base em determinações de peso molecular (PM), BULLA Jr. *et al.* (1977) concluíram que a subunidade do cristal é um dímero de aproximadamente 230.000 daltons, o que foi confirmado por HUBER *et al.* (1981). A unidade monomérica é formada por glicoproteína contendo aproximadamente 95% de proteína e 5% de carboidrato (BULLA Jr. *et al.*, 1977). A glicoproteína que representa a protoxina, possui PM entre 130-140.000 daltons para os cristais lepidóptero-ativos (ARONSON *et al.*, 1986; HÖFTE & WHITELEY, 1989) e 72-135.000 daltons para os díptero-ativos (HÖFTE & WHITELEY, 1989), que, após a proteólise, origina peptídeos tóxicos menores. No caso de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1, a glicoproteína possui o PM de 135.000 daltons e a unidade tóxica de 62.000 daltons ; já a fração mosquitocida, citada anteriormente, possui PM de 65.000 daltons , sendo que o da unidade convertida não foi relatada (YAMAMOTO & McLAUGHLIN, 1981).

Como outras funções bacterianas, a cristalogênese em *Bacillus thuringiensis* sofre regulação genética. Na maioria das variedades, os genes que codificam a proteína cristal se encontram em plasmídeos, mas seqüências cromossômicas também podem ser encontradas (ARONSON *et al.*, 1986; HÖFTE & WHITELEY, 1989; WHITELEY & SCHNEPF, 1986). Os genes da proteína cristal (genes cry) foram agrupados por HÖFTE & WHITELEY (1989) em quatro classes e algumas subclasses, de acordo com a similaridade da seqüência nucleotídica e com o espectro de atividade das proteínas por eles codificadas (proteínas Cry), a saber: Lepidoptera-específico (cry IA (a,b,c), B, C e D e cry IIB); Lepidoptera e Diptera-específico (cry IIA); Coleoptera-específico (cry IIIA) e Diptera-específico (cry IVA, B, C e D). O gen cry IIB não é classificado como cry I devido à similaridade estrutural entre as proteínas por eles codificadas. A classe cyt é designada separadamente para o gen que codifica a proteína citolítica encontrada em *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*. O *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* possui genes das classes cry IA e cry IIA.

Sendo uma protoxina, o cristal protéico necessita de ativação para tornar-se uma toxina capaz de atingir os insetos susceptíveis. O passo inicial para esta ativação é a dissolução do cristal no ambiente alcalino do intestino do inseto. Com isto, há a liberação das unidades protéicas (protoxinas), que, sob a ação de proteases intestinais, são convertidas em fragmentos tóxicos (toxinas) menores protease-resistentes. As toxinas assim ativadas se ligam a receptores específicos, que são glicoproteínas, presentes nas membranas das células colunares do epitélio intestinal. Há então a formação de poros, resultando em lise celular, seja por extravazamento de potássio (K), provocando distúrbios na regulação de pH e absorção de nutrientes, seja por desequilíbrio osmótico, pela penetração de íons, água e pequenas moléculas no interior da célula (GILL *et al.*, 1992; HABIB & ANDRADE, 1986; HONÉE & VISSER, 1993). Com a ruptura intestinal, há a

penetração de esporos, e a morte do inseto é ocasionada pela ação conjunta dos esporos com os cristais (HABIB & ANDRADE, 1986).

2.3- Produção de *Bacillus thuringiensis*

2.3.1- Considerações gerais

O principal objetivo das indústrias visando a produção massal de *B. thuringiensis* é a obtenção de biomassas que tenham altos rendimentos de delta-endotoxina, que é um metabólito sintetizado por esta espécie bacteriana e de interesse comercial. A estirpe do microrganismo e as técnicas utilizadas no cultivo do mesmo, tais como, os ingredientes do meio de cultura e as condições do processo fermentativo, são fatores que influenciam no rendimento do componente ativo (DIAS, 1992).

No cultivo de *B. thuringiensis*, dois processos podem ser utilizados: a fermentação semi-sólida e a fermentação submersa. O primeiro é o mais antigo, e, de forma resumida, utiliza solução nutriente absorvida em partículas de substrato sólido para o cultivo do microrganismo (QUINLAN & LISANSKY, 1983; ROWE & MARGARITIS, 1987). No entanto, esta técnica não é mais utilizada para o cultivo de *B. thuringiensis* em larga escala devido à inabilidade de se conseguir um produto de qualidade. CAPALBO (1989) e QUINLAN & LISANSKY (1983) concordaram que, para produção em pequenas escalas, esta metodologia é apropriada.

A fermentação submersa é o processo empregado para a produção de *B. thuringiensis* em larga escala, e não exige técnicas e materiais diferentes daqueles utilizados em outros processos microbianos (QUINLAN & LISANSKY, 1983). Resumidamente, esse processo requer os seguintes procedimentos: as culturas-estoques são mantidas por liofilização ou por congelamento em nitrogênio

líquido. A partir delas, semeiam-se tubos contendo ágar inclinado, que são utilizados para a semeadura de frascos agitados (Erlenmeyers) contendo meio de cultura líquido que, por sua vez, servirão de inóculo para os tanques de fermentação. É importante ressaltar que o uso dos frascos agitados não está restrito à obtenção de inóculos, pois os mesmos também são usados em estudos de variáveis de fermentação. Ao final do processo fermentativo, os esporos e cristais são separados por centrifugação, filtração ou concentrados por evaporação. Em seguida, são misturados com aditivos e padronizados, quanto à potência, através de bioensaios (DULMAGE, 1983).

2.3.2- Microrganismo

DULMAGE (1971), estudando a produção de delta-endotoxina por isolados de uma mesma subespécie de *B. thuringiensis*, observou que a quantidade produzida da mesma variava dependendo do isolado usado. Assim, um aspecto importante no desenvolvimento, e, conseqüentemente, na produção massal de *B. thuringiensis*, é a procura por novos isolados mais ativos e que se adaptem às condições de utilização do produto final (DIAS, 1992; ERTOLA, 1988).

WAKISAKA *et al.* (1982a; 1982b) relataram a obtenção de mutantes asporogênicos hiperprodutores de delta-endotoxina. Este fato, entre outros, demonstra que o uso de técnicas de manipulação genética pode contribuir na obtenção de estirpes mais produtivas, aumentando o rendimento industrial (ROWE & MARGARITIS, 1987).

2.3.3- Meio de cultura

DULMAGE (1970b; 1971) relatou que a produção de delta-endotoxina variava entre as subespécies de *B. thuringiensis*, entre diferentes isolados da mesma subespécie e entre os meios de cultura nos quais são cultivados, devendo

estes últimos serem formulados de acordo com o isolado a ser utilizado. Como consequência desta observação, tem se procurado reduzir os custos de produção e aumento do rendimento, em termos de esporos e cristais, através da utilização de matérias-primas mais baratas para a formulação do meio de cultura e pela padronização do processo fermentativo (DIAS, 1992; QUINLAN & LISANSKY, 1983).

O *Bacillus thuringiensis* é cultivado em meios de cultura contendo fontes de carbono e nitrogênio e alguns sais minerais. De acordo com DULMAGE (1989), "os cultivos dos diferentes isolados de *B. thuringiensis*, independentemente das variedades, possuem características comuns, como a utilização de glicose, melação e amido; todas produzem ácido a partir de glicose; são similares no uso de proteínas e hidrolisados de proteínas; podem utilizar sais de amônio e são similares no requerimento de sais minerais". Apesar de similares, cada isolado possui características individuais. Desta forma, um meio de cultura que é favorável ao desenvolvimento de um pode não o ser para outro.

A produção de *B. thuringiensis* requer um meio de cultura que permita o crescimento, esporulação e síntese de delta-endotoxina. Há, então, a necessidade de conhecimento dos requerimentos nutricionais do microrganismo usado. ROGOFF & YOUSTEN (1969) e SINGER & ROGOFF (1968), relataram que o *B. thuringiensis* crescia em meio mínimo contendo apenas glicose e sais minerais. No entanto, NICKERSON & BULLA Jr. (1974), estudando os requerimentos nutricionais mínimos de 18 isolados de *B. thuringiensis*, representando 12 diferentes sorotipos, verificaram que havia crescimento somente quando o meio mínimo era suplementado com 0,2% de citrato, aspartato ou glutamato.

NAGAMMA *et al.* (1972) observaram que a xilose estimulava a esporulação de *B. thuringiensis*, o que já havia sido descrito por MAJUMDAR & PADMA (1957) para outras espécies de *Bacillus*.

SMITH (1982), testou diversas fontes de carbono no cultivo de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, e observou que o glicerol aumentava a toxicidade da delta-endotoxina produzida em comparação à glicose, sacarose e óleo de soja. Para o cultivo de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, ARCAS (1985) observou que a glicose era a melhor fonte de carbono, embora o amido também fornecesse bons rendimentos finais.

A influência da glicose na produção de delta-endotoxina foi estudada por SCHERRER *et al.* (1973). Eles observaram que, aumentando a concentração de glicose no meio basal, havia o aumento no tamanho e na potência do cristal paraesporal. A concentração ótima de glicose para atingir o maior rendimento de delta-endotoxina foi estimada entre 6 e 8 g/L, no meio de cultura por eles estudado. No entanto, YUDINA *et al.* (1993) não observaram o aumento de tamanho dos cristais quando o cultivo era feito em diferentes concentrações de amido, mas relataram variações na atividade biológica e na morfologia dos mesmos quando diferentes fontes de carbono eram utilizadas.

A formação de esporos e cristais não foi inibida por baixa concentração de glicose (0,05%), apesar de alterações no tempo de desenvolvimento da cultura, na frequência de formação e no rendimento e qualidade dos esporos e cristais terem sido observados (SAKHAROVA *et al.*, 1984). Com concentrações de glicose variando entre 3 e 10%, a esporulação não foi totalmente inibida, mas houve um forte efeito negativo no crescimento e na formação de esporos (SAKHAROVA *et al.*, 1989). ARCAS *et al.* (1987), variando os níveis de glicose entre 0,8 e 5,6% aumentando proporcionalmente os outros componentes do meio de cultura, obtiveram bons resultados na esporulação e produção de toxina utilizando a maior concentração do carboidrato.

SALAMA *et al.* (1983a; 1983b; 1983c) relataram a viabilidade de utilização de subprodutos agroindustriais com alto teor protéico no cultivo de

diversas variedades de *B. thuringiensis*. O soro de leite promoveu crescimento, esporulação e produção de cristais. A suplementação deste com levedura forrageira e extrato de sementes de leguminosas aumentou o rendimento da delta-endotoxina, assim como a toxicidade, mas não proporcionalmente (SALAMA *et al.*, 1983b). Levedura forrageira se mostrou eficaz como componente único em meio de cultura, e, nas concentrações de 0,5 a 4,0% em água, produziu altos títulos de esporos e cristais com boa atividade biológica (SALAMA *et al.*, 1983c). Outros subprodutos, como as farinhas de peixe e de algodão, sangue bovino e extrato de leguminosas foram citados como sendo ingredientes promissores na elaboração de meios de cultura para o cultivo de *B. thuringiensis* (MUMMIGATTI & RAGHUNATHAN, 1990; OBETA & OKAFOR, 1984; SALAMA *et al.*, 1983a; 1983b; 1983c).

Resultados satisfatórios foram conseguidos por DHARMSTHITI *et al.* (1985), que utilizaram um subproduto da indústria de glutamato monossódico diluído em água e suplementado com fosfato de potássio, para o cultivo de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* e *Bacillus sphaericus*.

VECHT & LIFSHITZ *et al.* (1990) observaram que peptona de peixe promovia crescimento, esporulação e formação de delta-endotoxina. No entanto, para o rendimento de boa toxicidade, a otimização do meio de cultura se fazia necessária.

O requerimento de aminoácidos para o crescimento de *B. thuringiensis* foi observado por PROOM & KNIGHT (1955). No entanto, SINGER & ROGOFF (1968) relataram que leucina, isoleucina, treonina e serina inibiam o desenvolvimento do microrganismo, mas que o espectro de inibição variava entre as amostras do mesmo. ARCAS *et al.* (1984) e RAJALAKSHMI & SHETNA (1977) verificaram que cistina é essencial para o crescimento e formação de cristais de *B. thuringiensis*.

ARCAS *et al.* (1984) propuseram o uso de malte germinado em substituição ao extrato de levedura, ingrediente este que, segundo GOLDBERG *et al.* (1980) e SIKDAR *et al.* (1991), exerce grande influência no crescimento celular e produção de delta-endotoxina, por ser fonte de fatores de crescimento, como aminoácidos e sais minerais. No entanto, o mesmo é dispendioso para a utilização industrial em meios de cultura.

A presença de sais minerais se faz necessária para o desenvolvimento de *B. thuringiensis*. Cinco íons metálicos são considerados importantes para o crescimento de *Bacillus*: magnésio (Mg), manganês (Mn), ferro (Fe), zinco (Zn) e cálcio (Ca), que normalmente estão presentes nas fontes de carbono e nitrogênio usadas (DULMAGE, 1983). No entanto, ARCAS *et al.* (1984) e FALOCI *et al.* (1986) observaram a necessidade de suplementação dos meios de cultura por eles utilizados com Ca, Mn e Mg. O mesmo não aconteceu com Fe, Zn e Cu (cobre), cujas quantidades presentes no extrato de levedura, usado na elaboração dos meios, eram suficientes.

A limitação de Ca reduz a refratilidade e a perda da termorresistência dos esporos. A importância do Ca no crescimento celular e produção de delta-endotoxina em *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* é mencionada por SIKDAR *et al.* (1991).

O Mn é essencial para o crescimento e esporulação de várias espécies de *Bacillus* (CHARNEY *et al.*, 1951). Esta afirmação também é válida para a espécie *thuringiensis*, pois sua ausência afeta a esporulação e formação de cristais (ARCAS, 1985; VASANTHA & FREESE, 1979). ARCAS (1985) também se refere à essencialidade do Mg no desenvolvimento do mesmo microrganismo.

A importância do potássio (K) no desenvolvimento celular e na formação da delta-endotoxina é relatada por ARCAS (1985) e WAKISAKA *et al.* (1982b). FODA *et al.* (1985) observaram que, até a concentração de 0,2M de fosfato de

potássio, o rendimento e a atividade da delta-endotoxina aumentavam, no meio de cultura por eles utilizado.

2.3.4- pH

Para o cultivo de *B. thuringiensis*, o pH inicial do meio de cultura deve estar situado entre 6,8 e 7,2 (DULMAGE, 1983; 1989; QUINLAN & LISANSKY, 1983; ROWE & MARGARITIS, 1987). No entanto, durante a fase de crescimento vegetativo, há acúmulo de ácidos acético e pirúvico, que são produzidos devido ao consumo de glicose (fonte de carbono normalmente utilizada), levando o pH a valores entre 5,0 e 6,0. Nas fases seguintes, os ácidos são metabolizados, chegando à neutralidade e, posteriormente, à alcalinidade (pH próximo a 8,0) (DULMAGE, 1983; 1989; QUINLAN & LISANSKY, 1983; ROGOFF & YOUSTEN, 1969; ROWE & MARGARITIS, 1987).

Em função dessa característica metabólica do microrganismo, o pH do meio de cultura deve ser controlado para não inibir o crescimento. Esse controle pode ser feito através do balanceamento dos ingredientes do meio de cultura: os produtores de ácido (carboidratos) e os produtores de álcalis (proteínas e hidrolisados), ou pela correção através da adição de álcali estéril (DULMAGE, 1983; 1989). Se o balanço na relação carboidrato-proteína for apropriado, o controle do pH não é essencial (DULMAGE, 1983). CAPALBO (1989) não aconselha a correção do pH durante o cultivo de *B. thuringiensis*, pois o número de esporos formados pode ser reduzido, e, além disso, o comportamento do pH no meio de cultura permite o acompanhamento das etapas da fermentação submersa.

2.3.5- Temperatura

A temperatura ótima de crescimento para o *B. thuringiensis* é 30°C. No entanto, o cultivo do mesmo pode ser efetuado entre 28° e 32°C (IGNATENKO *et al.*, 1984; MORAES & CAPALBO, 1986; ROWE & MARGARITIS, 1987).

IGNATENKO *et al.* (1984) observaram que temperaturas mais baixas (ao redor de 20°C) aumentavam o tempo de fermentação. A elevação da temperatura até 35°C diminuía este tempo, além de ter duplicado o título de esporos e aumentado a termorresistência dos mesmos. No entanto, a 40°C a esporulação era inibida.

2.3.6- Aeração

Na fermentação aeróbica, há a necessidade de uma mistura homogênea entre o microrganismo, os nutrientes e o ar. Para tanto, é preciso que haja uma agitação contínua durante a incubação (DULMAGE, 1983).

Sendo o *B. thuringiensis* uma bactéria aeróbica, o oxigênio é importante para o desenvolvimento da mesma. IGNATENKO *et al.* (1984) observaram que havia maior necessidade de aeração na fase vegetativa do que na esporulação, e que a termorresistência dos esporos aumentava com o incremento da aeração até 20 mg O₂/L/min; entre 20-60 mg O₂/L/min não havia alteração significativa; acima de 60 mg O₂/L/min, havia um decréscimo.

A influência da aeração no tamanho e na toxicidade dos cristais foi relatada por SCHERRER *et al.* (1973), que observaram a diminuição do tamanho dos cristais e aumento da toxicidade dos mesmos quando em altas taxas de aeração, enquanto que um suprimento menor levava a formação de cristais maiores com menor toxicidade. FODA *et al.* (1985) observaram a diferença de toxicidade e rendimento em cultivos com diferentes taxas de aeração.

2.3.7- Separação e formulação

Ao final do cultivo, os esporos e cristais obtidos são separados por centrifugação ou filtração (COUCH & ROSS, 1980; DULMAGE, 1983), sendo o primeiro processo o mais comum. A pasta obtida é então processada de forma tal a dar origem a produtos comerciais, que normalmente se apresentam sob forma de emulsões ou de pós molháveis (ERTOLA, 1988).

A formulação é o processo de conversão da pasta em um inseticida de uso corrente (ROWE & MARGARITIS, 1987). Ela deve ser elaborada de forma a melhorar o produto para o uso em campo (COUCH & IGNOFFO, 1981; DULMAGE, 1983), a manter a viabilidade do patógeno preservando ou aumentando as suas propriedades (COUCH & IGNOFFO, 1981) e a evitar a degradação do produto durante o transporte e armazenamento do mesmo (DIAS, 1992), entre outros fatores. Esta etapa é de muita importância, pois, na maioria das vezes, a formulação é que determina o sucesso ou não do produto (COUCH & ROSS, 1980).

ARCAS (1985) e ERTOLA (1988) citaram um processo para a formulação líquida, proveniente de uma patente francesa, no qual o pH da pasta é levado a 3,5-4,5 e a ela são adicionados sais minerais e líquidos oleaginosos para a manutenção da estabilidade. Já (COUCH & ROSS, 1980) relataram que as preparações em pó molhável podem ser obtidas através da secagem por atomização (spray drying) da cultura total ou da pasta resultante da centrifugação, quando então aditivos são adicionados.

DIAS (1992) enfatizou que os tipos de materiais a serem incorporados em uma formulação dependem do ambiente em que a mesma será aplicada. Assim, nas formulações contra mosquitos é necessário que o princípio ativo permaneça em suspensão, de modo a aumentar a probabilidade de ingestão das toxinas. Para tanto, materiais de origem vegetal e mineral são usados como veículo para o bioinseticida.

Na agricultura, é necessário que haja uma camada uniforme do produto nas folhas e frutos a serem protegidos. Os produtos formulados para tal fim contêm vários aditivos, entre eles agentes molhantes, que promovem a dispersibilidade dos pós molháveis e agem como emulsificantes para suspensões líquidas ; dispersantes, que facilitam a dissolução do produto no momento da aplicação; adesivos, que formam um filme na superfície da planta e impedem que o produto seja carregado pela chuva, vento e orvalho; espessantes, que evitam a evaporação total, expondo o princípio ativo aos efeitos da temperatura e radiação; protetor solar e aditivos vegetais, que estimulam a alimentação dos insetos (COUCH & IGNOFFO, 1981; DIAS, 1992; ROWE & MARGARITIS, 1987).

É importante ressaltar que os materiais a serem adicionados às formulações devem ser rigidamente selecionados, pois os mesmos não devem interagir com o patógeno, no caso do *B. thuringiensis*, reduzindo a viabilidade dos esporos e produzindo efeitos desnaturantes sobre a delta-endotoxina (COUCH & IGNOFFO, 1981).

2.3.8- Padronização

Inicialmente, a padronização de inseticidas biológicos contendo *B. thuringiensis* era confusa, pois houve o desenvolvimento de várias metodologias, devido a exigências governamentais para a comercialização dos produtos (HEIMPEL & ANGUS, 1963). O método mais utilizado era o da contagem de esporos viáveis por unidade de peso do produto, o que era errôneo, já que este não era necessariamente um indicador de toxicidade a insetos (HEIMPEL, 1967; ROGOFF, 1966). Os bioensaios eram utilizados para estimar a dose letal 50% (DL50), porém estes não seguiam um protocolo universal, o que dificultava a comparação entre as preparações (ROGOFF, 1966).

A confirmação de que a atividade biológica não poderia ser avaliada pela contagem de esporos, e sim pelo bioensaio, foi feita por DULMAGE (1970b), que observou a influência do meio de cultura, sorotipo e isolado de *B. thuringiensis* usados na toxicidade. Assim, DULMAGE *et al.* (1971) propuseram uma metodologia de padronização dos produtos à base de *B. thuringiensis*, ainda utilizada atualmente. Ela expressava a potência através de bioensaios, comparando-se a DL50 do produto à DL50 de um padrão internacional (preparado no Instituto Pasteur de Paris), ao qual uma potência arbitrária foi designada (1000 UI/mg).

2.4- Soro de leite

O soro de leite é a parte líquida do leite, obtida após remoção de caseína na fabricação de queijo e da própria caseína.

A composição do soro de leite varia de acordo com o tipo de queijo, mas usualmente contém 6,5-7,0% de sólidos, sendo a lactose o principal componente (4,5-5,2%), 0,7-1,0% de proteína e quantidades variadas de ácido láctico, gordura, minerais e vitaminas (OURA, 1983).

Este subproduto pode ser visto sob vários aspectos: como uma fonte protéica de alto valor biológico, como uma fonte de obtenção de lactose e também como um problema de poluição ambiental (WOLFSCHOON & FURTADO, 1977). O descarte do soro em cursos d'água pode provocar a destruição da fauna e da flora, devido, principalmente, ao elevado conteúdo de lactose, estando a demanda bioquímica de oxigênio situada entre 40.000 e 50.000 ppm (AMIEVA, 1974). No entanto, o tratamento do efluente é muito dispendioso, e, assim, processos para a industrialização do soro de leite foram desenvolvidos (AMIEVA, 1974; BYLUND, 1975; OURA, 1983).

O baixo conteúdo de proteínas do soro "in natura" impede a utilização deste como um alimento de alto grau nutritivo, e o uso como bebida não é viável devido à má absorção da lactose pelos adultos. Além disso, o uso como ração para animais é restrito pelos efeitos laxativos que causa (OURA, 1983).

Após a precipitação da caseína, aproximadamente 20% das proteínas do leite permanecem no soro. Estas possuem alto valor nutritivo, podendo ser utilizadas em alimentos. Coagulam-se pelo calor (podendo-se também usar ácidos como precipitantes), e são constituídas de uma fração albumina e uma fração globulina. Outros compostos nitrogenados, as proteoses e peptonas não são coaguláveis pela acidez e calor (BYLUND, 1975).

As proteínas do soro, além do tratamento térmico, podem ser preparadas por precipitação com polifosfatos, eletrodialise, filtração em gel, reversão osmótica e ultrafiltração (BYLUND, 1975; CAL-VIDAL, 1979; WEISBERG & GOLD-SMITH, 1969). A utilização das mesmas em alimentos é vasta (alimentos infantis, bebidas, sopas, salsichas, carnes, etc.), possuindo também funções diversas (enriquecimento protéico, emulsificante, gelificante, estabilizante, etc.) (LORENZEN, 1987). Desproteinizado ou não, o soro também pode ser usado na produção de lactose (BYLUND, 1975).

Uma outra forma de aproveitamento do soro é a utilização da lactose como meio de cultura para a produção de levedura comestível (que dá origem a um alimento nutritivo e de alta qualidade), álcool, ácido láctico e antibióticos (BYLUND, 1975; OLIVEIRA, 1992).

2.5- AMINOFÉRTIL II

O ácido glutâmico é um importante aminoácido componente de diversas proteínas, que adquiriu importância comercial a partir de seu sal sódico, o glutamato monossódico (GMS). Este é um potente enaltecedor de sabor dos alimentos

(YOKOYA, 1970) e é utilizado em diversos produtos alimentícios industrializados, como biscoitos, sopas enlatadas e desidratadas, macarrão, pastas de pescados e carnes, entre outros (SADIR, 1965).

O GMS possui duas formas isômeras, o D-glutamato e o L- glutamato, sendo que apenas o último apresenta a capacidade de realçar o sabor dos alimentos (SADIR, 1965).

Existem três processos de produção do GMS: a hidrólise ácida de proteínas vegetais, o químico e o microbiológico. O primeiro foi o processo inicial, que utilizava o glúten de cereais tratado a quente com ácido clorídrico diluído para a liberação do aminoácido, que era então separado, purificado e neutralizado com hidróxido de sódio (SADIR, 1965). Devido o processo ser oneroso, este não mais apresenta importância econômica (YOKOYA, 1970).

O processo químico permite a síntese do ácido glutâmico a partir de diversos produtos químicos, entre eles alguns produtos da destilação do petróleo. No entanto, o produto resulta na mistura das formas D e L, havendo a necessidade de separação dos isômeros (HUFFMAN & SKELLY, 1963; YOKOYA, 1970).

A produção do GMS por fermentação é o processo mais usual, e possui a vantagem de se obter apenas a forma L- glutâmico. Diversas bactérias podem ser usadas para este fim, e o meio de cultura deve ser composto de fonte de nitrogênio (uréia, amônio, peptona, entre outros) e carboidratos, sendo a glicose, resultante da hidrólise do amido, e a sacarose do melaço as mais usadas (SADIR, 1965; YOKOYA, 1970).

A Ajinomoto Interamericana do Brasil produz GMS por fermentação aeróbica, utilizando a bactéria *Brevibacterium lactofermentum*. O meio de fermentação é composto de melaço de cana de açúcar e amônia líquida. Ao final da fermentação, há a obtenção do GMS e de um resíduo muito semelhante ao melaço de cana de açúcar, no que diz respeito a cor, odor e viscosidade

(AJINOMOTO, 1980, citado por PEREIRA, 1982). Devido ao alto teor de umidade, sais minerais e matéria orgânica, é considerado um resíduo poluente quando lançado em águas de rios.

O processo de fabricação do GMS pela Ajinomoto do Brasil segue a sequência mostrada na Fig. 1, de acordo com AJINOMOTO (1980), citado por PEREIRA (1982). Uma ligeira modificação foi realizada, pois, originalmente, o resíduo AMINOFÉRTIL II não era citado. Na realidade, o AMINOFÉRTIL II é o resíduo bruto da produção de GMS, que é comercializado com este nome e utilizado como fertilizante por plantadores de cana de açúcar (usineiros). O AMINOFERM, que também é comercializado, é obtido a partir da concentração do AMINOFÉRTIL II e utilizado como suplemento em rações de animais. Pesquisas sobre a influência do AMINOFÉRTIL II no desenvolvimento de cultivos agrícolas ainda estão sendo realizadas (AJINOMOTO, comunicação pessoal). Estudos sobre a utilização do resíduo de fermentação glutâmica em rações foram feitos por ARIKI *et al.* (1981) e PEREIRA (1982).

2.6- *Culex saltanensis*

A malária é uma doença infecciosa, não contagiosa e de evolução crônica, que acomete homens, macacos, roedores, aves e répteis. O agente etiológico é um protozoário pertencente ao gênero *Plasmodium* (ALVARADO & FERREIRA, 1982). O ciclo de vida deste organismo envolve um hospedeiro intermediário vertebrado, onde há uma multiplicação assexuada e surgimento de formas sexuais imaturas (gametócitos) e um hospedeiro definitivo, o mosquito, onde há a maturação dos gametas, fecundação e formação de esporozoítos. Estes últimos constituem a forma infectante, que penetra no hospedeiro intermediário através da saliva infectada do mosquito, introduzida durante a picada (ALVARADO & FERREIRA, 1982; LUND, 1972). Os mosquitos são, portanto, os vetores da

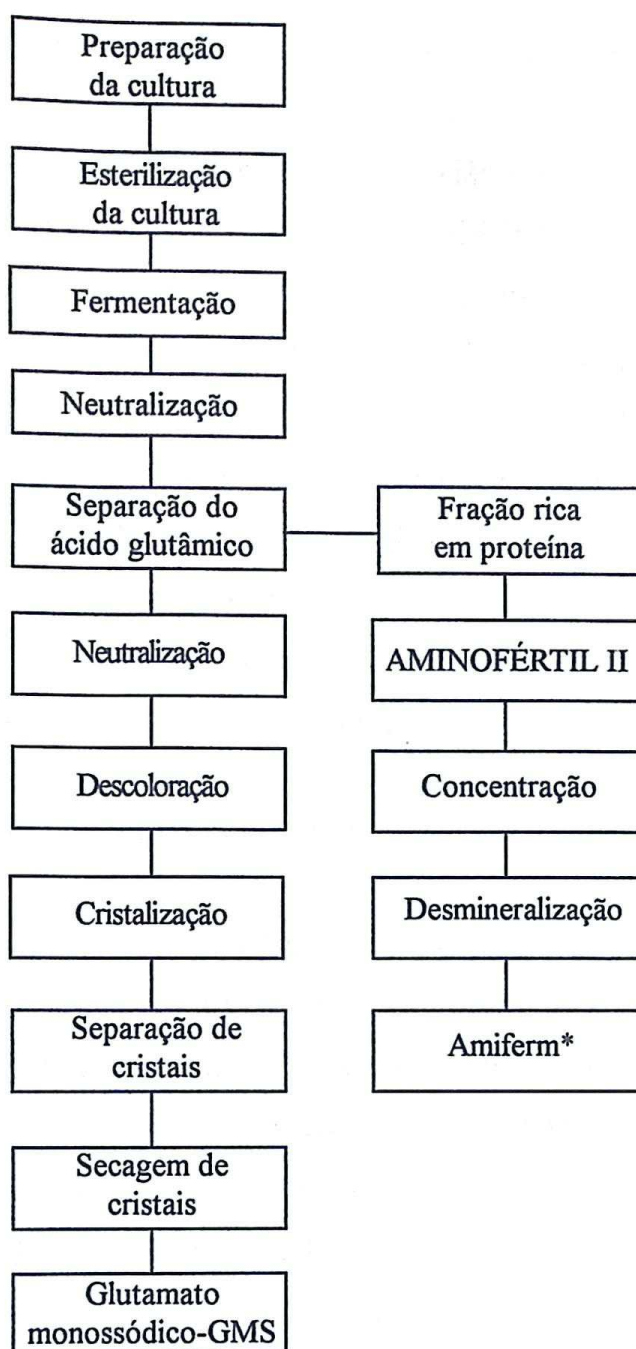


Figura 1. Fluxograma do processo de fabricação de GMS pela Ajinomoto do Brasil, citado por PEREIRA (1982).

* Nome comercial do resíduo final de fermentação de GMS registrado no Ministério da Agricultura como ingrediente para ração animal.

doença, sendo os anofelinos responsáveis pela transmissão ao homem e os culicíneos às aves.

Várias espécies de *Plasmodium* causam a malária aviária. No entanto, a espécie *P. juxtanucleare*, descrita por VERSIANI & GOMES (1941), é a única que parasita naturalmente as aves no Brasil e Américas em geral (PARAENSE, 1949; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA & CASTRO, 1989). No entanto, o vetor natural do referido *Plasmodium* na América Latina permaneceu desconhecido por quase 50 anos, apesar de vários estudos pioneiros terem sido realizados no Brasil (PARAENSE, 1944; PARAENSE, 1949; VERSIANI & GOMES, 1943). Porém, LOURENÇO-DE-OLIVEIRA & CASTRO (1989;1991), consideraram o *C. saltanensis* o vetor primário deste protozoário, por este mosquito ter apresentado alta ornitofilia e densidade populacional suficiente para a manutenção da transmissão. Além disso, esporozoítos foram encontrados nas glândulas salivares deste inseto, e a transmissão pela picada foi demonstrada experimentalmente.

VERSIANI & GOMES (1943) descreveram a doença após inoculação experimental em galinhas. Eles observaram que, durante um período prolongado, não havia sintomatologia característica nos animais inoculados. No entanto, repentinamente ocorria um emagrecimento progressivo e anemia intensa, acompanhados quase sempre de diarreia. As aves mostraram-se tristes, abatidas e com dificuldade de locomoção, quando então sobrevinha a morte. MASSARD (1982) também observou uma redução da postura, afetando a produtividade, o que poderia representar perdas em criações avícolas com fins comerciais.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Microrganismo

Foi utilizada a bactéria *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 (serovar H3a3b), isolada a partir do produto comercial DIPEL suspensão concentrada, produzido pela ABBOTT Laboratórios e distribuído pela ABBOTT Laboratórios do Brasil LTDA - Divisão Agroquímica. O isolamento foi feito por esgotamento do produto em meio Ágar Simples, após incubação a $32^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 18 h.

3.2- Manutenção do microrganismo

A cultura bacteriana foi semeada em tubos de ensaio contendo Ágar Extrato de Solo (AES), de acordo com GORDON *et al.* (1973), e incubada a $32^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por cinco dias, tempo este necessário para a esporulação da cultura, quando então foi mantida sob refrigeração a $6^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

A transferência do microrganismo para novo meio de cultura foi feita a cada seis meses.

3.3- Preparo do inóculo

Um volume de 50 mL de meio Caldo Nutriente (Merck) contido em frasco Erlenmeyer de 250 mL foi inoculado com uma alçada da cultura estoque de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* e, posteriormente, submetido a agitação de

180 rpm em agitador rotatório (Ética Equipamentos Científicos) à temperatura de $32^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 4,5 horas, de acordo com cinéticas de crescimento previamente realizadas.

3.4- Subprodutos testados

3.4.1- Soro de leite

Foi utilizado soro de leite proveniente da Indústria de Laticínios “Leite na Vaca”, situada em Itaguaí-RJ, sendo este derivado do processo de fabricação de queijo Minas do tipo frescal. O soro de leite cedido foi obtido em uma única produção, e, uma vez convenientemente acondicionado, foi conservado por congelamento a -10°C . O processo de fabricação deste tipo de queijo resulta na produção de 70-80% de soro “in natura”.

A composição aproximada do soro utilizado foi de 5,3% em lactose, 6,54% em extrato seco, 0,54% em resíduo mineral fixo, 0,75% em proteína e pH 5,7.

Para ser utilizado, o soro de leite foi submetido a tratamento prévio de desproteinização, no intuito de se evitar a coagulação de proteínas nos frascos durante a esterilização. A técnica utilizada consistiu na acidificação do soro a pH 4,5 com solução de ácido fosfórico concentrado a 85%, seguido de aquecimento a 93°C durante 5 min e remoção das proteínas precipitadas. Após resfriamento, o pH do soro foi ajustado a 6,0 com hidróxido de sódio 40%, e submetido a novo aquecimento para a precipitação das proteínas restantes. A remoção das proteínas foi feita por decantação seguida de filtração à vácuo (CASTILLO & SÁNCHEZ, 1978; OLIVEIRA, 1992).

3.4.2- AMINOFÉRTIL II

O resíduo da fermentação industrial de glutamato monossódico utilizado, denominado comercialmente de AMINOFÉRTIL II, foi procedente da empresa Ajinomoto Interamericana Indústria e Comércio LTDA, situada em Limeira, SP. Este subproduto apresentou teor aproximado de 17% em proteína, 1% em óxido de potássio, 0,00262 g% em fósforo, 30% em matéria orgânica e pH 6,0.

O AMINOFÉRTIL II foi convenientemente acondicionado e mantido sob refrigeração a 4°C.

3.5- Cultivo do *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*

Cinco meios de cultura diferentes foram testados para a produção de biomassas ativas de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*.

3.5.1- Meios de cultura

3.5.1.1- Caldo nutriente suplementado com sais e glicose (CNS)

Este meio, modificado por DHARMSTHITI *et al.* (1985), apresenta a seguinte composição (g/L): Caldo Nutriente (Merck), 8; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,05; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,08; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,005; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,005; glicose, 2. O mesmo foi estudado visando a obtenção de dados de referência, por ser nutricionalmente adequado ao desenvolvimento da bactéria em estudo.

3.5.1.2- Soro de leite (SL)

O soro de leite desproteinizado foi utilizado como componente único do meio de cultura.

3.5.1.3- Soro de leite diluído (SLD)

O soro de leite desproteinizado foi diluído na proporção 1:1 com água filtrada.

3.5.1.4- AMINOFÉRTIL II (AMF)

O AMINOFÉRTIL II foi utilizado como meio de cultura diluído a 4% em água filtrada, de acordo com DHARMSTHITI *et al.* (1985), embora sem qualquer suplementação.

3.5.1.5- Soro de leite + AMINOFÉRTIL II (SL + AMF)

Foi utilizado meio de cultura combinando os dois subprodutos, na concentração de 4% de AMINOFÉRTIL II em soro de leite. Os dois subprodutos foram esterilizados em separado, e misturados no momento do uso.

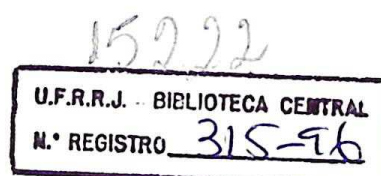
Todos os meios de cultura, após o preparo, tiveram o pH ajustado a 7,0 e foram esterilizados a 121°C por 15 min.

Após a esterilização, alíquotas dos meios foram retiradas para a efetuação de análises quantitativas.

3.5.2- Produção de biomassa ativa

Para cada experimento foram utilizados seis frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio teste.

Após semeadura com 2% do inóculo, os frascos foram incubados à temperatura de $32^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, sob agitação constante de 180 rpm em agitador rotatório (Ética Equipamentos Científicos), até a completa esporulação. O desenvolvimento celular foi visualizado por microscopia óptica de preparações a fresco do cultivo, ao longo do processo.



Com a obtenção máxima de esporos e cristais, o conteúdo dos frascos foi transferido assepticamente para Erlenmeyer estéril de 2000 mL. Após a homogeneização, foram retiradas alíquotas para a contagem de células e esporos viáveis, e determinação do pH final de cultivo.

Os resultados obtidos para cada meio teste foram expressos como a média de três experimentos.

3.5.3- Recuperação de esporos e cristais

O cultivo final de cada meio de cultura teve o pH ajustado a 7,0 com ácido clorídrico a 20%, para evitar a dissolução dos cristais, pois o pH final é normalmente alcalino. O cultivo foi então centrifugado a 4000 rpm por 20 min em centrífuga refrigerada (Damon mod. IEC B-20 A) a 4°C. Após a centrifugação, uma alíquota do sobrenadante foi retirada, para determinações quantitativas posteriores.

O resíduo obtido foi submetido à coprecipitação com lactose, de acordo com DULMAGE *et al.* (1970). Resumidamente, esta técnica consiste na ressuspensão do resíduo em solução 4-6% de lactose e posterior adição de acetona, o que faz com que haja a precipitação da lactose, juntamente com o complexo esporo-cristal. O resultado é uma preparação seca, estável por longo período e que pode ser facilmente ressuspensa na água.

O produto resultante foi acondicionado em frasco de vidro vedado, e colocado sob refrigeração ($6^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$). Posteriormente, quantificou-se o número de esporos viáveis e realizaram-se testes para a determinação da atividade larvícida através de bioensaios.

3.5.4- Determinações quantitativas

3.5.4.1- Quantificação celular

3.5.4.2- Contagem de células viáveis

As amostras foram submetidas a diluições decimais em salina fisiológica estéril, e as células quantificadas pela contagem de colônias em placas de Petri contendo meio Ágar Simples, tendo sido o plaqueamento (em triplicata), feito pela técnica em superfície. A incubação foi feita à temperatura de $32^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 18 h, e o número de células viáveis expresso em unidades formadoras de colônia por mL (ufc/mL).

Para constatar a possível diferença de concentração celular entre os meios, utilizou-se o delineamento estatístico inteiramente casualizado com cinco tratamentos e três repetições, e as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey, de acordo com GOMES (1987). Os valores obtidos nos experimentos foram submetidos à transformação \sqrt{x} para que pudessem ser analisados.

3.5.4.3- Contagem de esporos viáveis

- No cultivo

Foi realizado através da contagem de colônias em placas de Petri, após tratamento térmico, mediante aquecimento a 80°C por 10 min, para a eliminação das células vegetativas existentes, quando então foi feito o plaqueamento conforme descrito anteriormente. Os resultados obtidos foram expressos em esporos por mililitro (esporos/mL), e tratados estatisticamente, conforme já visto para células viáveis.

- No produto final obtido

Um miligrama de cada produto final foi suspenso em 10 mL de água destilada contendo 0,02 mL de solução a 1% de Tween 80, com a finalidade de se evitar grumos, e submetido a tratamento térmico de 65°C por 15 min (MUMMIGATTI & RAGHUNATHAN, 1990). Após este tratamento, foi feito o plaqueamento, sendo o resultado expresso em esporos por miligrama (sp/mg).

3.5.4.4- Determinação do pH

As medidas de pH foram realizadas em potenciômetro da marca Incibrás, ao final de cada cultivo.

3.6- Estudo do consumo de nutrientes

3.6.1- Dosagem de lactose

Foi feita nos meios SL, SLD e AMF + SL e nos sobrenadantes, após centrifugação dos cultivos, de modo a determinar os teores inicial e final de lactose, e, conseqüentemente, permitindo o cálculo de consumo do dissacarídeo.

O método utilizado foi o do ácido pícrico, conforme CARVALHO (1978), que se baseia na oxidação da lactose pelo ácido pícrico em meio alcalino, dando origem a uma reação corada, o que possibilita a dosagem espectrofotométrica a 520 nm. Para a dosagem, empregou-se espectrofotômetro Bausch & Lomb, mod. Spectronic 20.

3.6.2- Dosagem de fósforo

Foi feita nos meios CNS, SL, SLD, AMF e SL + AMF e nos sobrenadantes após centrifugação dos cultivos, de modo a determinar os teores inicial e final de fósforo, e, conseqüentemente, permitindo o cálculo de consumo deste elemento.

O método utilizado foi o de ESTRIN & BOLAND (1970), que se baseia na dosagem espectrofotométrica a 420 nm do complexo corado formado pela reação do fosfato e o reagente molibdato-vanadato de amônio. Para a dosagem, empregou-se espectrofotômetro Bausch & Lomb, mod. Spectronic 20.

3.6.3- Dosagem de proteína

Foi feita nos meios CNS, SL, SLD, AMF e SL + AMF e nos sobrenadantes, após centrifugação dos cultivos, de modo a determinar os teores inicial e final de proteína, permitindo o cálculo do consumo da mesma.

O método usado foi o de microKjeldahl (AOAC, 1984), que se baseia na mineralização do nitrogênio, destilação e dosagem da amônia no destilado por volumetria. Devido o método determinar a porcentagem de nitrogênio total, a concentração de proteína foi obtida multiplicando-se o nitrogênio total por 6,38 para os meios contendo soro de leite, e por 6,25 para os meios que não o continham.

3.7- Determinação da atividade biológica

A atividade bioinseticida dos produtos obtidos através do cultivo de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* nos diversos meios de cultura foi avaliada através de bioensaios. Como insetos- teste, foram utilizados o díptero *Culex saltanensis* para o teste de toxicidade e o lepidóptero *Anagasta kuehniella* como controle positivo de toxicidade.

3.7.1- Criações

3.7.1.1- *Culex saltanensis*

Nos bioensaios, foi utilizada a colônia estabilizada proveniente do Centro de Pesquisa de Caraguatatuba, SP, pertencente à Superintendência do Controle de Endemias (SUCEN), da Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo.

3.7.1.2- *Anagasta kuehniella*

A criação de *A. kuehniella* foi feita no Centro Integrado de Manejo de Pragas (CIMP), da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica - RJ, a partir de ovos provenientes do Departamento de Entomologia da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), da Universidade de São Paulo (USP), situada em Piracicaba - SP. Para se efetuar a criação, tomou-se como base a metodologia proposta por PARRA *et al.* (1985), com modificações para a melhor adaptação às condições existentes no CIMP.

Para a obtenção de larvas, 30-40 mg de ovos foram transferidos para copos plásticos de 7,5 cm de diâmetro por 10,5 cm de altura, contendo 100-150 g de dieta, constando de farinha de trigo integral. Os copos foram cobertos com telas de nylon, presas com elásticos e então colocados em estufa incubadora à temperatura de $27^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$, com $70 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotofase de 12 h.

Após uma semana, tiras de papelão corrugado foram cortadas, enroladas e dispostas de forma a entrarem em contato com a farinha e ocuparem totalmente os copos, e novamente expostos às mesmas condições anteriores. O papelão corrugado tem a função de servir como local de empupação.

Após a emergência dos adultos (35-45 dias), estes foram anestesiados com éter etílico e transferidos para gaiolas feitas da parte superior de garrafas plásticas, cujas aberturas maiores foram cobertas com telas de nylon presas por elásticos, onde houve a oviposição. Os ovos foram coletados diariamente, peneirados em peneira de malha fina, colocados em novos copos de plástico e datados, dando continuidade à criação.

3.7.2- Bioensaios

3.7.2.1- *Culex saltanensis*

Os bioensaios em *C. saltanensis* foram realizados no Centro de Pesquisa de Caraguatatuba, da SUCEN - SP, de acordo com a metodologia proposta por de BARJAC (1983). Esta constou no preparo de uma suspensão-mãe contendo 50 mg do produto em 10 mL de água destilada, e, após homogeneização, uma solução estoque foi preparada, adicionando-se 0,1 mL da suspensão-mãe a 9,9 mL de água destilada (diluição 1:100). A partir desta, alíquotas de 120, 90, 60, 30, 24 e 15 µL foram adicionadas a copos plásticos contendo 150 mL de água destilada e 25 larvas nos estágios L3/L4 por copo, de forma a se obter concentrações de 0,04, 0,03, 0,02, 0,01, 0,008 e 0,005 mg/L, respectivamente, e o controle foi feito utilizando somente água destilada. Não houve adição de alimentos aos copos, e tanto o controle quanto os testes foram feitos em triplicata. A leitura foi realizada em 24 h, quando o número de larvas sobreviventes foram contadas.

A porcentagem de mortalidade foi corrigida de acordo com a fórmula de correção de Abbott, citada por HADDAD (1986).

3.7.2.2- *Anagasta kuehniella*

Para a realização dos bioensaios com *A. kuehniella*, utilizou-se como referência a metodologia proposta por DULMAGE *et al.* (1971), para *Trichoplusia ni*, adaptando-a de acordo com as necessidades exigidas no experimento.

Os bioensaios com *A. kuehniella* foram realizados no CIMP/UFRRJ - RJ, utilizando-se tiras de papelão corrugado de 21 cm de comprimento por 1 cm de largura enroladas e amarradas com elásticos, tendo como base tampas plásticas de 2,5 cm de diâmetro. Estes conjuntos foram colocados em copos plásticos de 3 cm de diâmetro por 4,5 cm de altura, e a cada um deles adicionaram-se 2 g da

diluição a ser testada, e 30 larvas de 3º/4º ínstaes, todas provenientes de ovos coletados no mesmo dia. O controle foi feito utilizando-se somente farinha de trigo integral, e as condições de incubação foram as mesmas usadas para a criação das larvas. As leituras foram realizadas após sete dias, contando-se o número de larvas sobreviventes. Tanto o controle quanto os testes foram feitos em triplicata.

Bioensaios prévios foram realizados com a finalidade de se calcular as diluições a serem usadas nos bioensaios definitivos. Estas diluições foram preparadas utilizando-se o produto a ser testado (biomassa ativa) e a farinha de trigo integral, homogeneizados. As concentrações variaram, em uma razão de dois, entre 8 e 0,0625 mg do produto por grama de dieta. Após os resultados, duas concentrações, uma mínima e uma máxima, foram escolhidas, de forma que a concentração letal média (CL50) se encontrasse entre elas. As concentrações a serem interpoladas foram calculadas de acordo com a fórmula citada por HADDAD (1986). Quando necessário, aproximações foram feitas, de forma a facilitar o passo da pesagem dos produtos.

Desta forma, para os produtos obtidos a partir dos meios CNS, SLD, AMF e SL + AMF, as diluições utilizadas foram 0,0665, 0,1, 0,165, 0,25, 0,4, 0,665 e 1,0 mg de produto por grama de dieta. Para o meio SL, as diluições utilizadas foram 0,5, 0,7, 0,995, 1,415, 1,995, 2,83 e 4,0 mg do produto por grama de dieta.

Os resultados dos bioensaios realizados em *A. kuehniella* foram submetidos à análise de próbites, através do programa MICRO PROBIT 3,0, para a obtenção da CL50 de cada biomassa tóxica.

A porcentagem de mortalidade foi automaticamente corrigida com o uso do referido programa.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Cinética do crescimento de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* em Caldo Nutriente

Inicialmente foi realizada a cinética do crescimento de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, pois sabe-se que o tempo de cultivo é influenciado pela concentração inicial de células. Assim, o objetivo principal da realização da cinética de crescimento para o inóculo, foi o de se determinar o tempo no qual um número quantitativamente adequado de células vegetativas em fase exponencial seria obtido.

Na Figura 2, pode-se observar o crescimento de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* em meio caldo nutriente, à temperatura de $32^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e 180 rpm de agitação.

O *B. thuringiensis*, por ser um microrganismo esporulado, normalmente é assim conservado. Por esta razão, é necessário uma ativação prévia, pois, a inoculação dos esporos diretamente ao meio de produção resultaria num maior tempo de cultivo, decorrente do tempo de germinação dos mesmos e pela quantidade inferior de células inoculadas.

DULMAGE (1983) preconizou dois ou mais estágios de inoculação: um para ativação e o(s) outro(s) para aumento da concentração de células vegetativas, com o intuito de se obter maior reprodutibilidade na semeadura dos meios de produção. No entanto, neste trabalho, apenas um estágio foi utilizado,

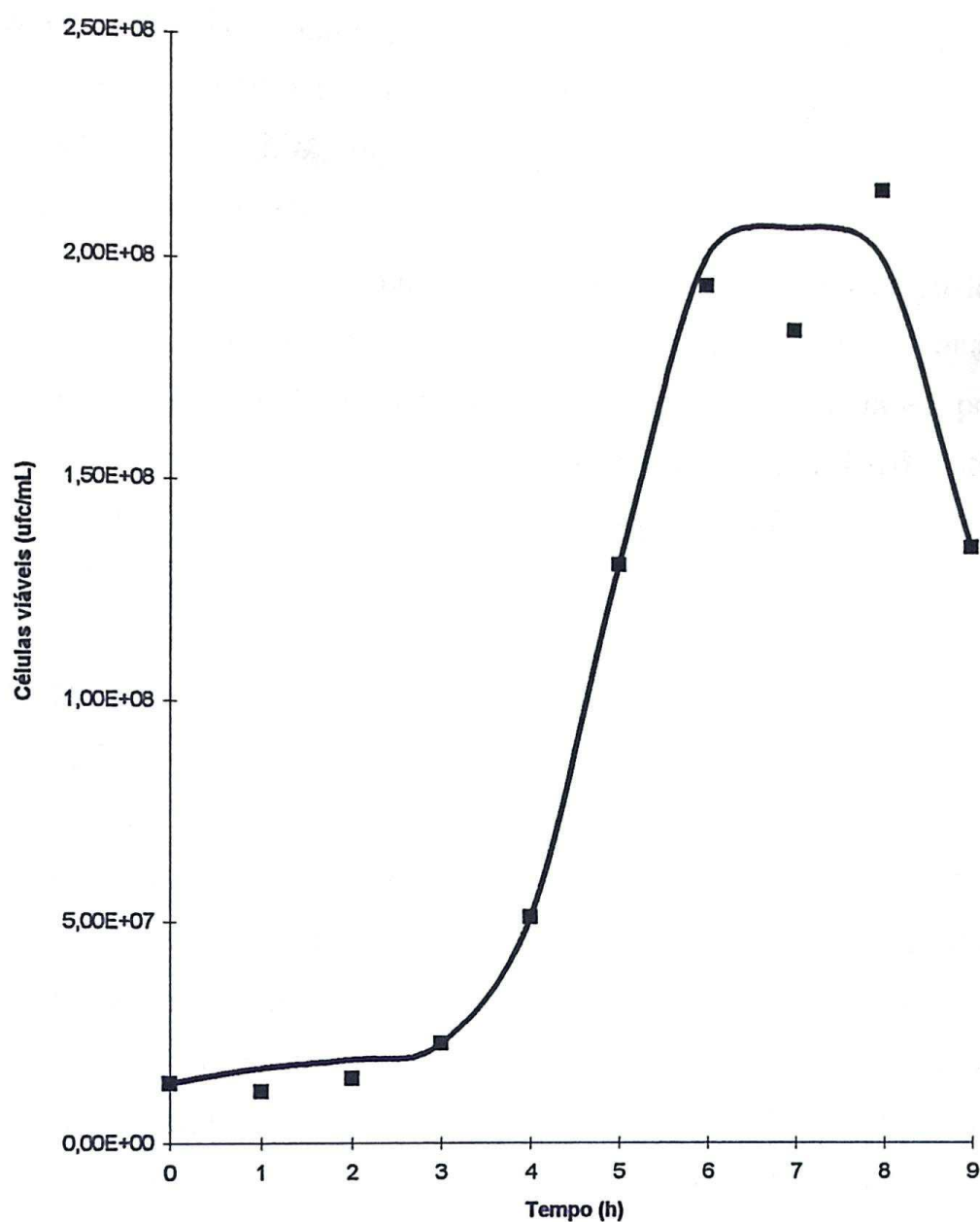


Figura 2. Cinética do crescimento de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* em meio Caldo Nutriente, à temperatura de $32^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e agitação de 180 rpm. Média de três experimentos.

devido à observação de homogeneidade dos resultados obtidos nas cinéticas de crescimento realizadas, e pela diminuição do tempo no processo de produção de biomassas ativas do *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, pelo menor número de etapas a serem realizadas.

Considerando os resultados obtidos, verifica-se que o tempo de 4,5 h é o mais adequado para a obtenção de inóculo, pois proporciona uma quantidade satisfatória de células viáveis metabolicamente ativas, ou seja, em fase exponencial de crescimento. Por isto, os experimentos posteriores foram realizados utilizando como inóculo, células de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* cultivadas em caldo nutriente por 4,5 h.

4.2- Cultivo do *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* nos meios de cultura testados

As contagens de células viáveis (ufc/mL) e esporos viáveis (esporos/mL), variaram de acordo com os meios de cultura utilizados nas condições ensaiadas. Os resultados obtidos em relação ao cultivo do *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* nos meios utilizados, podem ser observados na Tabela 1. Estes assemelharam-se aos encontrados por DULMAGE *et al.* (1970a; 1971), que para um mesmo isolado de *B. thuringiensis* cultivado em diferentes meios de cultura, verificaram a obtenção de concentrações celulares diversificadas.

O tempo de cultivo é extremamente variável, pois depende da velocidade de desenvolvimento dos microrganismos, que, por sua vez, é influenciada pela temperatura, aeração, pH e meio de cultura. Nas condições em que os experimentos foram realizados, houve apenas a influência deste último, havendo uma grande heterogeneidade dos resultados em função de tal fator.

Tabela 1. Tempo de cultivo, concentrações celulares (ufc/mL e esporos/mL) e pH final no cultivo de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* em cinco diferentes meios de cultura.

Meios*	Tempo de cultivo (h)**	Células viáveis (ufc/mL)**	Esporos viáveis (esporos/mL)**	pH Final**
CNS	30-32	$1,85 \times 10^8$ b	$1,41 \times 10^8$ a,b	8,73
SL	72-74	$1,13 \times 10^7$ c	$8,18 \times 10^5$ d	7,83
SLD	24-26	$1,28 \times 10^8$ b	$7,49 \times 10^7$ b,c	7,90
AMF	40-42	$3,53 \times 10^8$ a	$2,81 \times 10^8$ a	8,12
SL + AMF	48-50	$1,20 \times 10^8$ b	$3,21 \times 10^7$ c	8,34

* Meios: CNS (caldo nutriente suplementado com sais e glicose); SL (soro de leite); SLD (soro de leite diluído); AMF (AMINOFERTIL II); SL + AMF (soro de leite + AMINOFERTIL II).

** Média de três experimentos.

Obs.: As médias seguidas pela mesma letra não diferenciaram-se entre si pelo Teste de Tukey com 95% de probabilidade.

O resultado obtido para a concentração de células viáveis em meio CNS, é compatível com o obtido por DHARMSTHITI *et al.* (1985), apesar de algumas diferenças nas condições de cultivo. Estes autores também utilizaram o CNS como meio de referência, e obtiveram uma concentração de células viáveis de $1,6 \cdot 10^8$ células/mL, no cultivo de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, após 48 h.

Observa-se que o meio SL propiciou a menor concentração de células viáveis entre os meios testados, diferindo, estatisticamente, dos demais. Na tentativa de explicar o ocorrido, foram analisados os parâmetros que poderiam ter influência sobre os resultados obtidos, tais como agitação, temperatura, pH antes da esterilização e a forma de preparo do meio de cultura. Os parâmetros utilizados durante os experimentos foram compatíveis com aqueles usados pelos pesquisadores (DHARMSTHITI *et al.*, 1985; DULMAGE, 1970b; 1971; FALOCI

et al., 1986; SAKHAROVA *et al.*, 1986; SALAMA *et al.*, 1983a; 1983b), que empregaram uma agitação de 100 a 280 rpm, o pH antes da esterelização de 7,0 - 7,4 e a temperatura de 26° - 34°C. No entanto, o mesmo não ocorreu quanto à forma de preparo do meio de cultura. SALAMA *et al.* (1983b) desproteinizaram o soro de leite através da autoclavação a 121°C por 10 min, e retiraram as proteínas coaguladas por centrifugação, enquanto a técnica utilizada nos experimentos com o soro de leite, faz uso da acidificação com ácido fosfórico, seguida de aquecimento, para a precipitação das proteínas, o que pode, de alguma forma, ter dificultado o crescimento da cultura. No entanto, nada foi encontrado na literatura que pudesse confirmar esta hipótese. Outra possibilidade é a presença, no soro de leite, de substâncias naturalmente inibidoras, ou que pudessem inibir o desenvolvimento celular, quando em altas concentrações.

A obtenção de maior concentração de células no meio SLD, que foi estatisticamente comparável ao meio CNS, pode ser devido à diluição do(s) fator(es) inibitório(s) presente(s) no soro de leite, propiciando o desenvolvimento do microrganismo.

O meio SL + AMF apresentou maior concentração de células em relação ao meio SL, e foi estatisticamente equivalente ao meio SLD, mas não ao meio de referência (CNS). Isto indica a provável adição de algum componente proveniente do AMINOFÉRTIL II ao meio SL + AMF, que pode ter ocasionado a diminuição dos efeitos de possível(is) inibidor(es) presente(s) no soro de leite.

O meio AMF levou à obtenção de concentração de células viáveis de $3,53 \cdot 10^8$ ufc/mL, que, estatisticamente, diferiu dos meios de cultura restantes, sendo superior aos mesmos.

DHARMSTHITI *et al.* (1985), obtiveram concentrações de células viáveis de $2,2 \cdot 10^8$ células/mL, após 48 h de cultivo de *B. thuringiensis* subsp.

israelensis em 4% de um subproduto hidrolisado da indústria de GMS, suplementado com 0,5% de fosfato de potássio. O resultado por eles relatado foi 38% inferior ao obtido no cultivo de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* em meio AMF. Esta diferença pode estar relacionada tanto ao tipo de subproduto utilizado na elaboração do meio de cultura quanto ao microrganismo cultivado.

Analisando a composição do AMIFERM, produto obtido após a concentração do AMINOFÉRTIL II, PEREIRA (1982) relatou a presença de glicídios (provenientes do melaço de cana), sais minerais (cálcio, ferro, sódio, potássio, fósforo) e aminoácidos livres diversos, estando o ácido glutâmico presente em maior concentração. NICKERSON & BULLA Jr. (1974) demonstraram a importância do ácido glutâmico no cultivo de *B. thuringiensis* em meios mínimos de sais e glicose, pois, segundo estes autores, este aminoácido pode ser convertido em citrato, que parece ser um elemento essencial para o crescimento do microrganismo. Em proporções adequadas, aminoácidos livres podem contribuir para o desenvolvimento do *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (ARCAS, 1985), o que pode estar relacionado com a obtenção de melhores concentrações celulares no meio AMF, comparando-se com os outros meios testados.

A concentração de esporos viáveis obtida com a utilização do meio SL foi bem inferior às obtidas por SALAMA *et al.* (1983a; 1983b), que testaram a viabilidade de produção de biomassas ativas de duas diferentes linhagens de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* e de uma linhagem de *B. thuringiensis* subsp. *entomocidus*. Os autores utilizaram diferentes meios de cultura constituídos de soro de leite de búfalo "in natura", ou tratados, quer seja por desproteinização empregando autoclavação, por diluição ou por suplementação com outros nutrientes (fontes de nitrogênio e sais minerais). As concentrações de esporos por eles obtidas variaram na faixa de 10^7 - 10^8 esporos/mL, de acordo com o meio de cultura e a

subespécie usados, que se aproxima da concentração de esporos obtida com o meio de referência (CNS). Não se sabe se há diferença entre os soros. Além do soro utilizado ser de outro animal, o processamento para a obtenção do mesmo é desconhecido, podendo também haver diferença devido à utilização de microrganismos distintos.

Sabe-se que a concentração de esporos viáveis é influenciada pelo meio de cultura. SAKHAROVA *et al.* (1984) observaram que a limitação de nutrientes, como glicose, extrato de levedura, fósforo, magnésio e potássio exercia influência na duração das fases de desenvolvimento da cultura, na concentração de esporos e de cristais, e na qualidade de ambos (viabilidade e termorresistência dos esporos e toxicidade dos cristais). Por outro lado, SAKHAROVA *et al.* (1989), estudando a influência do excesso de nutrientes no meio de cultura, relataram que o excesso de glicose (30-100 g/L) e/ou extrato de levedura (20 g/L) não inibia a formação de esporos, apesar de aumentar o tempo de formação dos mesmos e de diminuir a taxa de esporulação, em *B. thuringiensis* var. *galleriae*. Desta forma, a baixa concentração de esporos viáveis obtida no meio SL pode estar relacionada à deficiência de alguns nutrientes e/ou ao excesso de outros, causando a diminuição da taxa de esporulação, e, talvez, da termorresistência dos esporos.

Analisando os resultados obtidos para o meio SLD, observou-se que este ofereceu, estatisticamente, maior concentração de esporos, em relação ao meio SL, o que concorda com SALAMA *et al.* (1983b), que obtiveram concentrações de esporos maiores, na ordem de 10^8 esporos/mL no cultivo de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, também em soro de leite diluído 1:1, e observaram que a suplementação deste com fontes complexas de nitrogênio levava a obtenção de maiores rendimentos e atividade biológica maior. Provavelmente, a explicação para tal fato se encontre na diluição dos componentes em excesso, ou então na

adição de sais minerais que pudessem estar em baixas concentrações, e que são de grande importância na esporulação e formação de cristais protéicos, conforme sugerem FALOCI *et al.* (1986) e SIKDAR *et al.* (1991).

O meio SL + AMF proporcionou uma diferença estatística em relação à concentração de esporos, quando comparando-a ao meio SL. Como já foi discutido anteriormente, isto pode ser reflexo da diminuição de algum efeito inibitório presente no soro de leite, como também da adição de nutrientes que favorecem o processo de esporulação, como sais minerais, presentes no AMINOFÉRTIL II. Isto concorda com SALAMA *et al.* (1983a; 1983c), que suplementaram o soro de leite com sais minerais e fontes nitrogenadas complexas, e obtiveram melhorias, tanto na concentração de esporos quanto na toxicidade.

A concentração de esporos viáveis obtida no meio AMF foi estatisticamente equivalente à do meio CNS, porém superior aos outros meios testados, indicando que o meio AMF é nutricionalmente adequado para a formação de esporos.

O pH final de todos os cultivos estão de acordo com os valores encontrados por DHARMSTHITI *et al.*, 1985; MUMMIGATTI & RAGHUNATHAN, 1990; SALAMA *et al.*, 1983a; 1983b; 1983c, sendo todos alcalinos. Esta alcalinização é típica nas fases de formação de esporos e cristais, conforme afirma SAKHAROVA *et al.* (1986), devido à liberação de substâncias alcalinas pelo consumo de aminoácidos, ou para uma nova síntese protéica, ou como fonte de energia e carbono, como defende ROWE & MARGARITIS (1987).

Fazendo-se uma análise geral dos resultados de quantificação celular (ufc/mL e esporos/mL), observa-se que todos os meios de cultura testados foram capazes de promover o crescimento, esporulação e formação de cristais protéicos de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*. Numericamente, apesar dos meios serem

distintos, estatisticamente somente alguns diferenciaram-se entre si. Desta forma, pode-se dizer que, entre os meios estudados, o AMF foi o mais adequado para o desenvolvimento do *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*. Em termos de células viáveis, foi superior ao CNS (meio de referência), não havendo, entretanto, diferença estatística em relação à concentração de esporos/mL.

O meio que mais diferiu do CNS foi o SL, sendo este o pior entre os meios testados para o cultivo de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*. Os meios SLD e SL + AMF são idênticos entre si, porém este último difere do CNS em concentração de esporos, indicando que o SLD é mais favorável à esporulação. Todavia, somente em conjunto com os resultados dos ensaios biológicos, pode-se avaliar qual (ou quais) destes meios são capazes de produzir cristais protéicos com boa toxicidade, fazendo ou não dos subprodutos testados, uma opção de elaboração dos meios de cultura para o microrganismo em questão.

4.3- Estudo do consumo de nutrientes

Os resultados referentes ao consumo de proteína, fósforo e lactose se encontram na Tabela 2. Apenas estes nutrientes foram analisados, por serem importantes para o metabolismo bacteriano como fontes de nitrogênio (podendo, às vezes, suprir o requerimento de carbono e energia), fósforo e carbono, respectivamente, e, em consequência, utilizados na produção de células.

Pelo que se pode observar na referida Tabela, e como previsto, o *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* apresentou consumo diferenciado de proteína e fósforo nos diferentes meios de cultura empregados.

O meio CNS apresentou o maior consumo de proteína, seguido do AMF, que, entretanto, produziu maior concentração de células viáveis. O menor consumo, observado no meio AMF, pode ser devido à presença de aminoácidos livres no meio, que são mais facilmente metabolizados do que as proteínas.

Tabela 2. Consumo de nutrientes (proteína, fósforo e lactose) pela bactéria *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, cultivada em diferentes meios de cultura.

Nutrientes	CNS**	SL**	SLD**	AMF**	SL + AMF**
Proteína inicial (%)*	1,39	0,64	0,32	2,18	2,80
final (%)	0,95	0,38	0,17	1,88	2,61
consumo (%)	0,44	0,26	0,15	0,30	0,19
Fósforo inicial (mg/L)*	0,79	26,18	13,09	1,01	16,57
final (mg/L)	0,45	21,97	11,72	0,62	7,92
consumo (mg/L)	0,34	4,27	4,21	0,39	8,65
Lactose inicial (g%)*	-	5,6	2,8	-	6,67
final (g%)*	-	5,6	2,8	-	4,47
consumo (g%)*	-	φ	φ	-	2,20

* Média de três experimentos.

** CNS (caldo nutriente com sais e glicose); SL (soro de leite); SLD (soro de leite diluído); AMF (AMINOFÉRTIL II); SL + AMF (soro de leite + AMINOFÉRTIL II).

Embora a produção de células viáveis ter sido menor no meio SL, verificou-se um maior consumo de proteína no mesmo, comparando-o aos meios SLD e SL + AMF. O menor consumo no meio SL + AMF, em relação ao meio SL, pode ser devido à adição de aminoácidos adicionados ao soro de leite, provenientes do AMINOFÉRTIL II.

Os meios SLD e SL + AMF foram semelhantes em relação ao consumo de proteína, e também produziram concentração de células similar.

Todos os meios de cultura atenderam às necessidades de fósforo, pois, em nenhum caso, a concentração do mesmo chegou a zero.

Embora as sínteses bacterianas sejam dependentes de energia, sendo o fósforo (sob a forma de fosfato) necessário para a produção de ATP, houve um consumo bastante diferenciado entre os meios que produziram concentrações celulares semelhantes, ou seja, os meios CNS, SLD e SL + AMF. Apesar do meio

AMF ter fornecido concentração celular maior, em termos de consumo de fósforo foi semelhante ao meio CNS; no meio SL, onde a menor produção de células foi obtida, houve um consumo comparável ao meio SLD. Desta forma, os resultados para o consumo de fósforo foram discordantes, sendo difícil uma análise conclusiva. Na literatura, nada foi encontrado com relação ao requerimento de fósforo para *B. thuringiensis*.

É importante ressaltar que, apesar da prova bioquímica de utilização da lactose ter fornecido um resultado fracamente positivo, não houve consumo do referido carboidrato nos meios SL e SLD. Assim, esta observação faz com que haja uma discordância com SALAMA *et al.* (1983b), que enfatizaram a utilização do soro de leite como meio de cultura para o cultivo de diversas subespécies de *B. thuringiensis*, com fins de diminuição da alta taxa de demanda bioquímica de oxigênio (DBO), produzida por este subproduto. No entanto, os autores não citaram se as subespécies consomem ou não a lactose, e um ponto importante a ser observado é que há diferentes subespécies de *B. thuringiensis*, e que talvez uma delas possa se adequar melhor ao cultivo em meios contendo soro de leite, por consumir lactose.

Como não houve o consumo de lactose (principal fator poluente do soro de leite), o cultivo de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* não seria de grande valia como opção para tratamento do soro, com fins de minimizar a poluição ambiental por ele causada. Se o microrganismo em questão tivesse consumido o carboidrato, o soro de leite seria uma excelente opção para estudos de elaboração de meios de cultura para o cultivo do mesmo. Isto porque, associada à produção do bioinseticida, haveria a possibilidade do aproveitamento das proteínas do soro, precipitadas durante o processamento do meio, para consumo humano, além de minimizar o efeito poluente sobre o meio-ambiente.

O consumo de lactose de 2,2 g% verificado quando se adicionou ao soro de leite o AMINOFÉRTIL II foi devido à presença de açúcares redutores na composição deste último.

4.4- Determinação da atividade biológica

Não foram encontradas na literatura pesquisas que abordassem a influência do meio de cultura na toxicidade do *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* a mosquitos, muito embora estudos comparativos de atividade biológica desta subespécie com a *israelensis* (ativa contra larvas de mosquitos e borrachudos), já terem sido realizados (IGNOFFO *et al.*, 1981; TYRREL *et al.*, 1979). Assim, os resultados dos bioensaios com *Culex saltanensis*, utilizando as biomassas ativas de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 obtidas em diferentes meios de cultura, informam não só a toxicidade dos cristais protéicos do microrganismo ao referido inseto, como também a influência do meio de cultura no grau de toxicidade apresentado por estes cristais.

Como pode se observar através dos resultados obtidos nos bioensaios em *Culex saltanensis* na Tabela 3, não houve coerência nas respostas de mortalidade frente às diferentes concentrações das biomassas ativas usadas nos testes. Isto leva a crer que as larvas não foram afetadas pela proteína tóxica do *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, pelo menos nas concentrações preconizadas por de BARJAC (1983), o que está de acordo com TYRREL *et al.* (1979), que obtiveram baixa mortalidade de larvas de mosquito em altas concentrações das preparações contendo cristais de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*. Os autores obtiveram apenas 30% de mortalidade de larvas de *Culex pipiens* em uma concentração de 100 mg/mL de cristais protéicos de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* purificados, 50% em larvas de *Aedes aegypti* em uma concentração de

Tabela 3. Mortalidade corrigida de larvas L3/L4 do mosquito *Culex saltanensis*, após 24 h de exposição a diferentes concentrações de biomassa ativa de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, produzidas em diferentes meios de cultura.

Concentração (mg/L)	% Mortalidade corrigida*				
	CNS**	SL**	SLD**	AMF**	SL + AMF**
Controle	0	18,7	4,0	0	9,3
0,005	13,3	22,9	33,3	4,0	47,1
0,008	4,0	1,6	6,9	6,0	33,8
0,01	34,7	14,8	6,9	6,5	29,4
0,02	8,0	17,9	41,7	4,0	29,4
0,03	36,0	14,8	34,7	12,0	0,04
0,04	13,3	20,4	5,5	10,5	29,4

* Média de três experimentos.

** CNS (caldo nutriente suplementado com sais e glicose); SL (soro de leite); SLD (soro de leite diluído); AMF (AMINOFERTIL 4%); SL + AMF (soro de leite + AMINOFERTIL II).

10 mg/mL e 0% em larvas de *Anopheles albimanus*. Desta forma, consideraram os cristais da subsp. *kurstaki* ineficientes contra as larvas dos mosquitos. IGNOFFO *et al.* (1981), no entanto, consideraram o *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* ativo, embora marginalmente, quando comparado com o *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*. Utilizando preparações contendo esporos e cristais da subsp. *kurstaki*, eles obtiveram CL50 de 210 mg/L para *Aedes aegypti* e >2,2 mg/L para *Culex quinquefasciatus*. Para preparações contendo esporos e cristais da subsp. *israelensis*, obtiveram CL50 de 0,054 mg/L e 0,11 mg/L para os mesmos mosquitos, respectivamente.

Apesar da atividade tóxica do *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* para culicídeos ter sido demonstrada, esta é menor do que a da subsp. *israelensis*. Provavelmente, isto também acontece com relação ao *C. saltanensis*, já que nas concentrações utilizadas não houve uma resposta positiva, mesmo sendo as

biomassas provenientes de meios de cultura diferentes. Concentrações mais elevadas não foram testadas, pois o intuito foi o de se observar se a toxicidade dos cristais da subsp. *kurstaki*, em relação às larvas de mosquito, aumentaria e chegaria em níveis tais que respostas satisfatórias fossem obtidas nas concentrações preconizadas pela técnica utilizada nos bioensaios, que é a recomendada pela Organização Mundial da Saúde. Assim sendo, pode-se dizer que, nas concentrações testadas, não se observou a influência do meio de cultura na toxicidade dos cristais da subsp. *kurstaki* em relação ao *C. saltanensis*. Se este fato ocorresse, talvez esta subespécie pudesse ser mais uma opção para o uso no combate aos culicídeos vetores de doenças a homens e animais. A análise de próbites para a obtenção da CL50 das biomassas ativas de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* para o culicídeo não foi realizada, pois a grande diversidade da porcentagem de mortalidade corrigida acarretaria uma grande margem de erro nos resultados.

Os resultados dos bioensaios com o lepidóptero *Anagasta kuehniella* podem ser observados nas Tabelas 4 e 5, e apresentaram-se coerentes e positivos. As CL50 de cada meio de cultura se encontram na Tabela 6.

Pelas respostas de CL50 obtidas, observa-se que, numericamente, o meio de cultura de referência (CNS) produziu uma maior atividade tóxica às larvas de *A. kuehniella*, em comparação aos outros meios. Porém, analisando-se os intervalos de confiança, pode-se observar que os valores para os meios CNS, SLD e AMF se sobrepõem em quase a totalidade, indicando que os mesmos são equivalentes quanto à atividade tóxica. Para o meio SL + AMF, somente uma pequena parte se sobrepõe em relação aos meios já citados, indicando que há uma diferença significativa na toxicidade do mesmo. No caso do meio SL, em nenhum momento os valores obtidos foram coincidentes, sendo o que mais diferiu do conjunto. Resumidamente, em termos de atividade tóxica das biomassas, pode-se dizer que: $CNS \simeq SLD \simeq AMF > SL + AMF > SL$.

Tabela 4. Mortalidade corrigida de larvas de 3º/4º instares de *Anagasta kuehniella*, após 7 dias de exposição a diferentes concentrações de biomassa ativa de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, produzidas em diferentes meios de cultura.

Concentração (mg/g)	% Mortalidade corrigida*			
	CNS**	SLD**	AMF**	SL + AMF**
Controle	3,3	3,3	3,3	3,3
0,0665	17,2	20,7	10,3	13,8
0,1000	31,0	24,1	24,1	13,8
0,1650	41,3	27,6	27,6	27,6
0,2500	65,5	55,2	65,5	37,9
0,4000	65,5	65,5	65,5	58,6
0,6650	75,9	86,2	86,2	65,5
1,000	86,2	89,6	86,2	89,6

* Média de três experimentos.

** CNS (caldo nutriente suplementado com sais e glicose); SLD (soro de leite diluído); AMF (AMINOFÉRTIL 4%); SL + AMF (soro de leite + AMINOFÉRTIL II).

Tabela 5. Mortalidade corrigida de larvas de 3º/4º instares de *Anagasta kuehniella*, após 7 dias de exposição a diferentes concentrações de biomassa ativa de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, produzida em meio soro de leite (SL).

Concentração (mg/g)	% Mortalidade corrigida*
	SL
Controle	3,3
0,5000	27,6
0,7000	27,6
0,9950	44,8
1,4150	65,5
1,9950	86,2
2,8300	93,1
4,000	96,5

* Média de três experimentos.

Tabela 6. Concentração letal 50% (CL50) e intervalos de confiança com 95% de probabilidade das biomassas ativas produzidas a partir do cultivo de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, em diferentes meios de cultura, para larvas de 3º/4º instares de *Anagasta kuehniella*.

Meios de cultura**	CL50 (mg/g)*	Intervalo de confiança com 95% de probabilidade
CNS	0,2093	0,1584 - 0,2714
SLD	0,2330	0,1846 - 0,2892
AMF	0,2348	0,1906 - 0,2892
SL + AMF	0,3191	0,2567 - 0,3996
SL	0,9864	0,8225 - 1,1493

* Média de três experimentos.

** CNS (caldo nutriente suplementado com sais e glicose); SLD (soro de leite diluído); AMF (AMINOFÉRTIL 4%); SL + AMF (soro de leite + AMINOFÉRTIL II); SL (soro de leite).

Os resultados obtidos com os meios SL e AMF são compatíveis com as observações feitas por DHARMSTHITI *et al.* (1985) e SALAMA *et al.* (1983c), isto é, ambos os meios deram origem a endotoxinas de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* eficientes.

Tudo isto corrobora o que foi observado por DULMAGE (1970b; 1971), MUMMIGATTI & RAGHUNATHAN (1990), SALAMA *et al.* (1983a; 1983b; 1983c), entre outros, de que a toxicidade dos cristais paraesporais de *Bacillus thuringiensis* variam de acordo com o meio de cultura utilizado, devido, provavelmente, à mudança na qualidade da proteína produzida, conforme o valor nutritivo do meio de cultura.

A afirmação feita por DULMAGE (1970b), de que a contagem de esporos não avalia a toxicidade, pode ser ratificada comparando-se os resultados da Tabela 6 com os da Tabela 7. Assim, fazendo-se uma análise conjunta, observa-se que, apesar de possuírem atividades tóxicas idênticas, os meios CNS, SLD e AMF diferiram em termos de número de esporos. O SLD possui,

Tabela 7. Concentração de esporos viáveis contidos em um miligrama das biomassas ativas, obtidas a partir do cultivo de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, em diferentes meios de cultura.

Meios**	Concentração (sp/mg)*
CNS	$4,87 \times 10^7$
SL	$4,29 \times 10^5$
SLD	$2,20 \times 10^7$
AMF	$1,10 \times 10^8$
SL + AMF	$1,09 \times 10^7$

* Média de três experimentos.

** CNS (caldo nutriente suplementado com sais e glicose); SL (soro de leite); SLD (soro de leite diluído); AMF (AMINOFERTIL 4%); SL + AMF (soro de leite + AMINOFERTIL II).

aproximadamente, duas vezes menos esporos que o CNS e cinco vezes menos que o AMF e o AMF possui duas vezes mais esporos que o CNS. Apesar do meio SL + AMF ter originado quatro vezes menos esporos em relação ao CNS, esta proporção não foi mantida na CL50. Esta desproporcionalidade também ocorreu em relação ao meio SL.

Fazendo-se uma análise conjunta dos resultados obtidos, observa-se que todos os meios testados foram capazes de promover o crescimento e a esporulação, com conseqüente formação de cristais, para o *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*. No entanto, os meios que obtiveram os melhores resultados foram o AMF e o SLD, sendo que o primeiro foi superior ao segundo em concentrações celulares. Apesar de serem equivalentes quanto à atividade tóxica, há uma limitação em relação ao meio SLD. Quando se pensa em relação ao aproveitamento do soro de leite para a diminuição do poder poluente do mesmo, o cultivo do *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* no meio SLD não seria vantajoso, pois o microrganismo não consome a lactose presente no soro. Desta forma, o meio AMF se torna o meio mais promissor, sendo, no entanto, necessária a otimização do mesmo para o aumento das concentrações celulares e da toxicidade. Os meios

SL + AMF e SL não se destacaram em relação aos demais, não sendo, portanto, opções adequadas para a produção de biomassas ativas de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*.

Um ponto a ser enfatizado é que o estudo realizado pode ser estendido para a produção de outras subespécies de *B. thuringiensis*, já que, culturalmente, o comportamento das mesmas é similar. Apenas deve-se proceder a adequação do meio à subespécie e à linhagem escolhida, pois, apesar da semelhança cultural, cada uma mantém sua característica individual.

5- CONCLUSÕES

Após a exposição dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- Os subprodutos testados (soro de leite e AMINOFÉRTIL II) mostraram ser viáveis para a elaboração de meios de cultura para o cultivo de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*;
- Todos os meios de cultura promoveram o crescimento, esporulação e formação de cristais de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*. No entanto, o meio AMINOFÉRTIL II (AMF) se mostrou o mais promissor para a produção massal, sendo indicado para estudos de otimização, de forma a se obter maiores concentrações celulares e de toxicidade dos cristais protéicos;
- O meio soro de leite diluído (SLD), apesar de originar biomassa de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* com boa atividade, não se torna uma opção adequada para a produção do microrganismo, devido ao não consumo da lactose (responsável pelo poder poluente do soro de leite) pelo mesmo;
- As diferenças nutricionais entre os meios de cultura não afetaram a toxicidade da fração mosquitocida do cristal protéico de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVARADO, Carlos Alberto, FERREIRA, Marcelo Simão. Malária. In: VERONESI, Ricardo. **Doenças infecciosas e parasitárias**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. Cap. 81, p.753-779.
- AMIEVA, Manoel Ramos. Aproveitamento de soro de queijaria. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Minas Gerais, v.171, p.5-11, jan.-fev. 1974.
- ANGUS, Thomas A. A bacterial toxin paralysing silkworm larvae. **Nature**, Grã-Bretanha, v.173, p.545-546, Mar. 1954.
- . Association of toxicity with protein-crystalline inclusions of *Bacillus sotto* Ishiwata. **Canadian Journal of Microbiology**, Canadá, v.2, p.122-130, 1956a.
- . Extraction, purification, and properties of *Bacillus sotto* toxin. **Canadian Journal of Microbiology**, Canadá, v.2, p.416-426, 1956b.
- ARCAS, Jorge Alfredo. **Producción de bioinsecticidas**. La Plata, 1985, 126p. Dissertação (Doutorado) - Universidade Nacional de La Plata, 1985.
- ARCAS, Jorge Alfredo, YANTORNO, Osvaldo, ARRARÁS, E. *et al.* A new medium for growth and delta-endotoxin production by *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. **Biotechnology Letters**, Grã-Bretanha, v.6, n.8, p.495-500, 1984.

- ARCAS, Jorge Alfredo, YANTORNO, Osvaldo, ERTOLA, Rui. Effect of high concentration of nutrients on *Bacillus thuringiensis* cultures. **Biotechnology Letters**, Grã-Bretanha, v.9, n.2, p.105-110, 1987.
- ARIKI, Joji, BUTOLO, José Eduardo, KRONKA, Rodolfo do Nascimento. *et al.* Líquido final da fermentação do ácido glutâmico em rações de frango de corte. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Minas Gerais, v.10, n.1, 1981.
- ARONSON, Arthur I., BECKMAN, William, DUNN, Peter. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. **Microbiological Reviews**, Estados Unidos, v.59, n.1, p.1-24, Mar. 1986.
- ARONSON, Arthur I., TYRREL, Dana J., FITZ-JAMES, Phillip C. *et al.* Relationship of the synthesis of spore coat protein and parasporal crystal protein in *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Bacteriology**, Estados Unidos, v.151, n.1, p.399-410, July 1982.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 14 ed. Arlington, EUA, 1984. 1141p. Metals and other constituents in baking powders, p.173.
- BONNEFOI, A., DE BARJAC, Huguette. Classification des souches du groupe *Bacillus thuringiensis* par la détermination de l'antigène flagellaire. **Entomophaga**, França, v.8, p.223-229, 1963.
- BULLA Jr., Lee A., KRAMER, Karl J., DAVIDSON, Loren I. Characterization of the entomocidal parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Bacteriology**, Estados Unidos, v.130, n.1, p.375-383, Apr. 1977.
- BYLUND, G. Tratamento e utilização do soro. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Minas Gerais, v.30, n.179, p.29-43, maio-jun. 1975.

- CAL-VIDAL, J. Ultrafiltração de soro láctico e aproveitamento de seus componentes. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Minas Gerais, v.34, n.203, p.29-35, maio-jun. 1979.
- CANTWELL, George E., HEIMPEL, Arthur M., THOMPSON, M. J. The production of an exotoxin by various crystal forming bacteria related to *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner. **Journal of Insect Pathology**, Estados Unidos, v.6, p.466-480, 1964.
- CAPALBO, Deise Maria Fontana. **Desenvolvimento de um processo de fermentação semi-sólida para obtenção de *Bacillus thuringiensis* Berliner**. Campinas, 1989. 159p. Dissertação (Doutorado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1989.
- CARVALHO, Itamar C. Método do ácido pícrico para a dosagem de lactose no leite. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Minas Gerais, v.196, n.33, p.3-9, mar.-abr. 1978.
- CASTILLO, Francisco J., SÁNCHEZ, Susan B. de. Studies on the growth of *Kluyveromyces fragilis* in whey for the production of yeast protein. **Acta Científica Venezolana**, Caracas, n.29, p.113- 118, 1978.
- CHARNEY, Jesse, FISHER, W. P., HEGARTI, C. P. Manganese as an essencial element for sporulation in the Genus *Bacillus*. **Journal of Bacteriology**, Estados Unidos, v.62, p.145-148, 1951.
- CLAUS, D., BERKELEY, R. C. W. Genus *Bacillus* Cohn 1872, 174. In: SNEATH, Peter H. A. (Coord.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore, EUA: Williams & Wilkins, 1986. V.2, seção 13, p.1104-1139.
- COUCH, T. L., IGNOFFO, Carlo M. Formulation of insect pathogens. In: BURGESS, H. D. (Coord.). **Microbial control of pests and plants diseases, 1970-1980**. London: Academic Press, 1981. Cap. 34, p.621-634.

- COUCH, T. L., ROSS, D. A. Production and utilization of *Bacillus thuringiensis*. **Biotechnology and Bioengineering**, Estados Unidos, v.22, p.1297-1304, 1980.
- DE BARJAC, Huguette. Bioassay procedure for samples of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* using IPS 82 standard. WHO report TDR/VED/SWG (5)(81.3), 1983.
- . Insect pathogens in the Genus *Bacillus*. In: DAVIDSON, E. (Coord.). **Pathogenesis of invertebrate microbial diseases**. Totowa, N. J.: Allanheld, 1981. Seção 2, cap. 10, p. 241-250.
- DE BARJAC, Huguette, BONNEFOI, A. A classification of strains of *Bacillus thuringiensis* Berliner with a key to their differentiation. **Journal of Invertebrate Pathology**, Estados Unidos, v.11, p.335-347, 1968.
- . Essai de classification biochimique et sérologique de 24 souches de *Bacillus* du type *B. thuringiensis*. **Entomophaga**, França, v.7, n.1, p.5-31, 1962.
- DE BARJAC, Huguette, LEMILLE, F. Presence of flagellar antigenic subfactors in serotype 3 of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, Estados Unidos, v.15, p.139-140, 1970.
- DE BARJAC, Huguette, RIOU, J. Y. Action de la toxine thermostable de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* administrée à des souris. **Revue de Pathologie Comparee et de Medecine Experimentale**, Paris, v.805, n.6, p.367-374, 1969.
- DELAFIELD, F. P., SOMERVILLE, H. J., RITTENBERG, S. C. Immunological homology between crystal and spore protein of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Bacteriology**, Estados Unidos, v.96, n.3, p.713-720, Sept. 1968.
- DHARMSTHITI, Saovane C., PANTUWATANA, Somsak, BHUMIRATANA, Amaret. 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**, Estados Unidos, v.46, p.231-238, 1985.

- DIAS, José Manuel Cabral de Sousa. Produção e utilização de bioinseticidas bacterianos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.27, p.59-76, abr. 1992.
- DULMAGE, Howard T. **Guidelines for the production of *Bacillus thuringiensis* H-14**: proceedings of consultation. Geneva: UNDP, World Bank, WHO, 1983. 124p. (Special Program for Research and Training in Tropical Diseases).
- . Insecticidal activity of HD-1, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *alesti*. **Journal of Invertebrate Pathology**, Estados Unidos, v.15, p.212-219, 1970a.
- . Production and use of *Bacillus thuringiensis*: perspective from 1989. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.84, supl.3, p.113-122, nov. 1989.
- . Production of δ -endotoxin by eighteen isolates of *Bacillus thuringiensis*, serotype 3, in 3 fermentation media. **Journal of Invertebrate Pathology**, Estados Unidos, v.18, p.353-358, 1971.
- . Production of the spore- δ -endotoxin complex by variants of *Bacillus thuringiensis* in two fermentation media. **Journal of Invertebrate Pathology**, Estados Unidos, v.16, p.385-389, 1970b.
- DULMAGE, Howard T., BOENING, Orlin P., REHNBORG, Carl S. *et al.* A proposed standardized bioassay for formulations of *Bacillus thuringiensis* based on International Unit. **Journal of Invertebrate Pathology**, Estados Unidos, v.18, p.240-245, 1971.
- DULMAGE, Howard T., CORREA, Jose A., MARTINEZ, Adelardo J. Coprecipitation with lactose as a means of recovering the spore-crystal complex of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, Estados Unidos, v.15, p.15-20, 1970.

- ERTOLA, Rui. Production of *Bacillus thuringiensis* insecticides. In: AIBA, S. (Coord.). **Horizons of biochemical engineering**. New York: Oxford University Press, 1988. p.187-202.
- ESTRIN, Ben, BOLAND, Frederick E. Collaborative study of two new methods for the determination of phosphorus in fruits and fruit products. **Journal of the Association of Official Agricultural Chemists**, Estados Unidos, v.53, n.3, p.575-578, 1970.
- FALOCI, Mirta M., ARCAS, Jorge Alfredo, YANTORNO, Osvaldo M. Influencia de algunos iones en la esporulacion y formacion de delta-endotoxina en cultivos de *Bacillus thuringiensis*. **Revista Argentina de Microbiologia**, Buenos Aires, v.18, n.2, p.53-62, 1986.
- FODA, M. S., SALAMA, H. S., SELIM, M. Factors affecting growth physiology of *Bacillus thuringiensis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Alemanha Ocidental, v.22, p.50-52, 1985.
- GILL, Sarjeet, COWLES, Elizabeth, PIETRANTONIO, Patricia V. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. **Annual Review of Entomology**, Estados Unidos, v.37, p.615-636, 1992.
- GOLDBERG, I., SNEH, B., BATTAT, E. *et al.* Optimization of a medium for a high yield production of spore-crystal preparation of *Bacillus thuringiensis* effective against the Egyptian cotton leafworm *Spodoptera littoralis* Boisd. **Biotechnology Letters**, Grã-Bretanha, v.2, n.10, p.419-426, 1980.
- GOMES, Frederico Pimentel. Experimentos inteiramente casualizados. In: —. **Curso de estatística experimental**. 12 ed. Piracicaba, SP: Liv. Nobel, p.61-78, 1987..
- GORDON, Ruth E., HAYNES, W. C., PANG, C. Hor-Nay. **The Genus *Bacillus***. Washington: United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, 1973. 283p. (Agriculture handbook, 427).

- HABIB, Mohamed E. M., ANDRADE, Carlos F. S. Bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, Sérgio B. (Coord.). **Controle microbiano de insetos**. São Paulo: Ed. Manole, 1986. Cap. 7, p.127-170.
- HADDAD, M. L. Análise de próbites. In: ALVES, Sérgio B. (Coord.). **Controle microbiano de insetos**. São Paulo, Ed. Manole, Cap. 21, p.374-383.
- HANNAY, C. L. Crystalline inclusions in aerobic sporeforming bacteria. *Nature*, Grã-Bretanha, v.172, p.1004, Nov. 1953.
- HANNAY, C. L., FITZ-JAMES, P. The protein crystals of *Bacillus thuringiensis* Berliner. **Canadian Journal of Microbiology**, Canadá, v.1, p.694-710, 1955.
- HEIMPEL, Arthur M. A critical review of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner and other crystalliferous bacteria. **Annual Review of Entomology**, Estados Unidos, v.12, p.287-322, 1967.
- HEIMPEL, Arthur M., ANGUS, Thomas A. Diseases caused by certain sporeforming bacteria. In: STEINHAUS, Edward A. (Coord.). **Insect pathology: an advanced treatise**. New York: Academic Press, 1963. v.2, cap. 2, p.21-73.
- HÖFTE, Herman, WHITELEY, H.R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Reviews**, Estados Unidos, v.53, n.2, p.242-255, June 1989.
- HONÉE, Guy, VISSER, Bert. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Holanda, v.69, p.145-155, 1993.
- HUBER, Hans E., LÜTHY, Peter, EBERSOLD, Hans-Rudolf *et al.* The subunits of the parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis*: size, linkage and toxicity. **Archives of Microbiology**, Berlim, v.129, p.14-18, 1981.
- HUFFMAN, C. W., SKELLY, W. G. Glutamic acid: chemical synthesis and resolutions. **Chemical Reviews**, Estados Unidos, v.63, n.6, p.625-640, 1963.

- IGNATENKO, Yu. N., SAKHAROVA, Z. V., KHOVRYCHEV, M. P. *et al.* Effect of temperature and aeration on growth and spore formation in *Bacillus thuringiensis*. **Microbiology**, Washington, v.52, n.5, p.553-556, 1984.
- IGNOFFO, Carlo M., ANDERSON, Ralph F. Bioinsecticides. In: PEPPLER, H., PERLMANN, D. (Coord.). **Microbial technology**. London: Academic Press, 1979. V.1, cap. 1, p.1-28.
- IGNOFFO, Carlo M., COUCH, T. L., GARCIA, C. *et al.* Relative activity of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* and *B. thuringiensis* var. *israelensis* against larvae of *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus*, *Trichoplusia ni*, *Heliothis zea*, and *Heliothis virescens*. **Journal of Economic Entomology**, Estados Unidos, v.74, p.218-222, Apr. 1981.
- KRYWIENCZYK, J., DULMAGE, Howard T., FAST, P. G. Occurrence of two serologically distinct groups within *Bacillus thuringiensis* serotype 3ab var. *kurstaki*. **Journal of Invertebrate Pathology**, Estados Unidos, v.31, p.372-375, 1978.
- LECADET, Marguerite M., DE BARJAC, Huguette. *Bacillus thuringiensis* beta-exotoxin. In: DAVIDSON, E. (Coord.). **Pathogenesis of invertebrate microbial diseases**. Totowa, N.J.: Allanheld, 1981. Seção 2, cap. 11, p.293-321.
- LORENZEN, Peter. What's to be done with whey. **Food Engineering International**, Estados Unidos, v.12, n.6, p.41-42, June 1987.
- LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, Ricardo, CASTRO, Fábio Alves. *Culex saltanensis* Dyar, 1928 - natural vector of *Plasmodium juxtannucleare* in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.86, n.1, p.87-94, jan.-mar. 1991.
- . Ornithophilic mosquito species and the domestic fowl malaria vector in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.84, supl.2, p.143, nov. 1989.

- LUND, Everett E. Protozoa. In: **Diseases of poultry**. 6 ed. Iowa, USA: The Iowa State University Press, 1972. Cap. 31, p.1006-1046.
- LÜTHY, Peter, EBERSOLD, Hans-Rudolf. The entomocidal toxins of *Bacillus thuringiensis*. **Pharmacology and Therapeutics**, Grã- Bretanha, v.13, n.2, p.257-283, 1981.
- MAJUMDAR, S. K., PADMA, M. C. Screening of cabohydrates for sporulation of *Bacilli* in fluid medium. **Canadian Journal of Microbiology**, Canadá, v.3, p.639-642, 1957.
- MASSARD, Carlos Luiz. Caracterização do parasitismo por *Plasmodium juxtannucleare* (Haemosporidea: Plasmodiidae) em criação de *Gallus gallus* da raça Leghorn branca. **Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, v.5, n.2, p.141-146, jul.-dez. 1982.
- MERETOJA, Tytti, CARLBERG, Gunnel, GRIPENBERG, Ulla *et al.* Mutagenicity of *Bacillus thuringiensis* exotoxin. I: Mammalian tests. **Hereditas**, Suécia, v.85, p.105-112, 1977.
- MIKKOLA, A. R., CARLBERG, Gunnel, VAARA, T. *et al.* Comparison of inclusions in different *Bacillus thuringiensis* strains: an electron microscope study. **FEMS Microbiology Letters**, Holanda, v.13, p.401-408, 1982.
- MORAES, Iracema de Oliveira, CAPALBO, Deise Maria Fontana. Produção de bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, Sérgio B. (Coord.). **Controle microbiano de insetos**. São Paulo: Ed. Manole, 1986. Cap. 16, p.297-310.
- MUMMIGATI, S. G., RAGHUNATHAN, A. N. Influence of media composition on the production of δ -endotoxin by *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, Estados Unidos, v.55, p.147-151, 1990.
- NAGAMMA, M. V., RAGHUNATHAN, A. N., MAJUMDAR, S. K. A new medium for *Bacillus thuringiensis* Berliner. **Journal of Applied Bacteriology**, Grã-Bretanha, v.35, p.367-370, 1972.

- NICKERSON, Kenneth W., BULLA Jr., Lee A. Physiology of sporeforming bacteria associated with insects: minimal nutritional requirements for growth, sporulation and parasporal crystal formation of *Bacillus thuringiensis*. **Applied Microbiology**, Estados Unidos, v.28, n.1, p.124-128, July 1974.
- NORRIS, J. R. The classification of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Applied Bacteriology**, Grã-Bretanha, v.27, p.439-447, 1964.
- . Sporeformers as insecticides. **Journal of Applied Bacteriology**, Grã-Bretanha, v.33, p.192-206, 1970.
- NORRIS, J. R., BURGESS, H. D. Esterases of crystalliferous bacteria pathogenic for insects: epizootiological applications. **Journal of Insect Pathology**, Estados Unidos, v.5, p.460-472, 1963.
- . The identification of *Bacillus thuringiensis*. **Entomophaga**, França, v.10, n.1, p.41-47, 1965.
- OBETA, Jason A., OKAFOR, Nduka. Medium for the production of primary powder of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Estados Unidos, v.47, n.4, p.863-867, Apr. 1984.
- OHBA, Michio, TANTICHODOR, Achara, AIZAWA, Keio. Production of heat-stable exotoxin by *Bacillus thuringiensis* and related bacteria. **Journal of Invertebrate Pathology**, Estados Unidos, v.38, p.26-32, 1981.
- OLIVEIRA, Maria Alice Cruz Lopes. **Comportamento de *Kluyveromyces cicerisporus* cultivado em soro de leite**. Rio de Janeiro, 1992. 65p. Dissertação (Mestrado) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1992.
- OURA, Erkki. Biomass from carbohydrates. In: REHM, H. J., REED, G. **Biotechnology**. Weinheim: Verlag Chemie, 1983. V.3, cap. 1, p.1-41.
- PARAENSE, W. Lobato. Infecção experimental do *Culex quinquefasciatus* pelo *Plasmodium juxtannucleare*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.41, n.3, p.535-540, dez. 1944.

- . Um inquérito sobre a ocorrência do *Plasmodium juxtannucleare* em Bambuí (Estado de Minas Gerais). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.47, n.3-4, p.355-359, 1949.
- PARRA, José Roberto Postali, STEIN, César Pagotto, BLEICHER, Ervino *et al.* **Metodologia de criação de *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) para pesquisas em *Trichogramma spp.*** São Paulo: USP, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1985. 9p. (Agricultura e desenvolvimento).
- PEREIRA, José Gonçalves. **Resíduo de fermentação industrial de glutamato monossódico: caracterização e ensaio com ratos, visando sua utilização em rações.** São Paulo, 1982. 71p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 1982.
- PROOM, H., KNIGHT, C. J. G. The minimal nutritional requirements of some species in the Genus *Bacillus*. **Journal of General Microbiology**, Cambridge, v.13, p.474-480, 1955.
- QUINLAN, Raymond J., LISANSKY, Stephen G. Microbial insecticides. In: REHM, H. J., REED, G. **Biotechnology**. Weinheim: Verlag Chemie, 1983. V.3, cap. 2e, p.233-254.
- RABINOVITCH, L., FUCHS DE JESUS, F., CAVADOS, C. F. G. *et al.* *Bacillus thuringiensis* subsp. *oswaldocruzi* and *Bacillus thuringiensis* subsp. *braziliensis*, two novel brazilian strains which determine new serotype H38 and H39, respectively. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.90, n.1, p.41-42, jan.-fev. 1995.
- RAJALAKSHMI, S., SHETNA, Y. I. The effect of aminoacids on growth, sporulation and crystal formation in *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. **Journal of the Indian Institute of Science**, Bangalore, v.59, p.169-176, 1977.
- ROGOFF, Martin H. Crystal-forming bacteria as insect pathogens. **Advances in Applied Microbiology**, Estados Unidos, v.8, p.291-313, 1966.

- ROGOFF, Martin H., YOUSTEN, Allan A. *Bacillus thuringiensis*: microbiological considerations. **Annual Review of Microbiology**, Estados Unidos, v.23, p.357-386, 1969.
- ROWE, Gerald E., MARGARITIS, Argýrios. Bioprocess developments in the production of bioinsecticides by *Bacillus thuringiensis*. **CRC - Critical Reviews in Biotechnology**, Estados Unidos, v.6, n.1, p.87-127, 1987.
- RUAS-NETO, Antonio Leite, OLIVEIRA, Carlos Marcos de. Controle biológico de culicídeos e simulídeos: inseticidas bacterianos. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, Brasília, v.37, p.61-75, 1985.
- SADIR, Ricardo. Processo industrial para se obter glutamato por fermentação. **Boletim do Centro Tropical de Pesquisas e Tecnologia de Alimentos**, São Paulo, n.4, p.25-31, 1965.
- SAKHAROVA, Z. V., IGNATENKO, Yu. N., KHOVRYCHEV, M. P. *et al.* Sporulation and crystal formation in *Bacillus thuringiensis* with growth limitation via the nutrient sources. **Microbiology**, Washington, v.53, n.2, p.221-226, 1984.
- SAKHAROVA, Z. V., IGNATENKO, Yu. N., SHCHUL'TS, F. *et al.* Kinetics of the growth and development of *Bacillus thuringiensis* during batch culturing. **Microbiology**, Washington, v.54, n.4, p.483-488, 1986.
- SAKHAROVA, Z. V., RABOTNOVA, I. L., KHOVRYCHEV, M. P. Growth and spore formation in *Bacillus thuringiensis* at high substrate concentrations. **Microbiology**, Washington, v.57, n.6, p.794-797, 1989.
- SALAMA, H. S., FODA, M. S., DULMAGE, H. T. *et al.* Novel fermentation media for production of δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, Estados Unidos, v.41, n.1, p.8-19, 1983a.
- SALAMA, H. S., FODA, M. S., EL-SHARABY, A. *et al.* A novel approach for whey recycling in production of bacterial insecticides. **Entomophaga**, França, v.28, n.2, p.151-160, 1983b.

- SALAMA, H. S., FODA, M. S., SELIM, M. H. *et al.* Utilization of fodder yeast and agro-industrial by-products in production of spores and biologically-active endotoxins from *Bacillus thuringiensis*. **Zentralblatt fur Mikrobiologie**, Alemanha Ocidental, v.138, p.553-563, 1983c.
- SCHERRER, Peter, LÜTHY, Peter, TRUMPI, Brüno. Production of δ -endotoxin by *Bacillus thuringiensis* as a function of glucose concentrations. **Applied Microbiology**, Estados Unidos, v.25, n.4, p.644-646, Apr. 1973.
- SEBESTA, K., HORSKÁ, K. Inhibition of DNA-dependent RNA polymerase by the exotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *gelechia*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Holanda, v.169, n.1, p.281-282, 1968.
- . Mechanism of inhibition of DNA-dependent RNA polymerase by exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Holanda, v.209, p.357-376, 1970.
- SIKDAR, D. P., MAJUMDAR, M. K., MAJUMDAR, S. K. Effect of minerals on the production of the delta-endotoxin by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Biotechnology Letters**, Grã-Bretanha, v.13, n.7, p.511-514, July 1991.
- SINGER, Samuel, ROGOFF, Martin H. Inhibition of growth of *Bacillus thuringiensis* by aminoacids in defined media. **Journal of Invertebrate Pathology**, Estados Unidos, v.12, p.98-104, 1968.
- SMITH, R. A. Effect of strain and medium variation on mosquito toxin production by *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. **Canadian Journal of Microbiology**, Canadá, v.28, p.1089-1092, 1982.
- SOMERVILLE, H. J. Formation of the parasporal inclusion of *Bacillus thuringiensis*. **European Journal of Biochemistry**, Alemanha Oriental, v.18, p.226-237, 1971.
- SOMERVILLE, H. J., DELAFIELD, F. P., RITTENBERG, S. C. Biochemical homology between crystal and spore protein of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Bacteriology**, Estados Unidos, v.96, n.3, p.721-726, Sept. 1968.

- TYRREL, Dana J., DAVIDSON, L. I., BULLA Jr., Lee A. *et al.* Toxicity of parasporal crystals of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* to mosquitoes. **Applied and Environmental Microbiology**, Estados Unidos, v.38, n.4, p.656-658, Oct. 1979.
- VASANTHA, N., FREESE, Ernst. The role of manganese in growth and sporulation of *Bacillus subtilis*. **Journal of General Microbiology**, Cambridge, v.112, p.329-336, 1979.
- VECHT-LIFSHITZ, S. E., ALMAS, K. A., ZOMER, E. Microbial growth on peptones from fish industrial wastes. **Letters in Applied Microbiology**, Grã-Bretanha, v.10, p.183-186, 1990.
- VERSIANI, Valdemar, GOMES, Breno Furtado. *Plasmodium juxtannucleare*, parasita da galinha doméstica. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v.3, p.113-117, 1943.
- . Sobre um novo hematozoário da galinha - *Plasmodium juxtannucleare*. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v.1, p.231-233, 1941.
- WAKISAKA, Yoshiharu, MASAKI, Emiko, KOIZUMI, Kenzo *et al.* Asporogeneous *Bacillus thuringiensis* mutant producing high yields of δ -endotoxin. **Applied and Environmental Microbiology**, Estados Unidos, v.43, n.6, p.1498-1500, June 1982a.
- WAKISAKA, Yoshiharu, MASAKI, Emiko, NISHIMOTO, Yoji. Formation of crystalline δ -endotoxin or poly- β -hydroxybutiric acid granules by asporogeneous mutants of *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Estados Unidos, v.43, n.6, p.1473-1480, June 1982b.
- WEISBERG, Samuel M., GOLDSMITH, Harold. Whey for foods and feeds. **Food Technology**, Estados Unidos, v.23, p.186-190, Feb. 1969.

- WHITELEY, H. R., SCHNEPF, H. Ernest. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Microbiology**, Estados Unidos, v.40, p.549-576, 1986.
- WOOLFSCHOON, Alan F., FURTADO, Múcio Mansur. Composição média dos soros de queijo prato e minas. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Minas Gerais, v.32, n.194, p.21-23, 1977.
- YAMAMOTO, Takashi, IIZUKA, Toshihiko. Two types of entomocidal toxins in the parasporal crystals of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Estados Unidos, v.227, n.1, p.233-241, Nov. 1983.
- YAMAMOTO, Takashi, McLAUGHLIN, Roy. Isolation of a protein from the parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* toxic to the mosquito larva, *Aedes taeniorhynchus*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Estados Unidos, v.103, n.2, p.414-421, Nov. 1981.
- YOKOYA, Fumio. Produção de L-glutamato monossódico por microrganismos. **Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, São Paulo, n.21, p.35-49, 1970.
- YUDINA, T. G., SALAMAKHA, O. V., OLEKHNOVICH, E. V. *et al.* Effect of carbon source on the biological activity and morphology of paraspore crystals from *Bacillus thuringiensis*. **Microbiology**, Washington, v.61, n.4, p.402-407, Jan. 1993.

APÊNDICE

Apêndice 1. Quadro de análise de variância para a avaliação comparativa das concentrações de células viáveis (ufc/mL), entre os diferentes meios de cultura.

Causa de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F calculado
Tratamentos	4	$2,38181 \times 10^9$	$5,95452 \times 10^8$	364,482
Resíduos	10	16336917	1633691,7	
Total	14	$2,39815 \times 10^9$		

cv = 33%

Apêndice 2. Quadro de análise de variância para a avaliação comparativa das concentrações de esporos viáveis (esporos/mL), entre os diferentes meios de cultura.

Causa de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F calculado
Tratamentos	4	$1,56409 \times 10^9$	$3,91022 \times 10^8$	173,72
Resíduos	10	22508573	22503857,3	
Total	14	$1,5866 \times 10^9$		

cv = 51,76%