

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Attest

Este exemplar corresponde a redação final da Tese defendida por Deise Maria Fontana Capalbo e aprovada pela comissão julgadora em 20.12.89.
Campinas, 20 de dezembro de 1989.

Iracema de Oliveira Moraes

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Engenharia de Alimentos

Desenvolvimento de um processo de fermentação semi-sólida para obtenção de *Bacillus thuringiensis* Berliner.

DEISE MARIA FONTANA CAPALBO

37/89

Engenheira de Alimentos - F.E.A./ UNICAMP, 1978.
Mestre em Engenharia de Alimentos - F.E.A./ UNICAMP, 1982.

ORIENTADOR: Dra. IRACEMA DE OLIVEIRA MORAES

- 1989 -

BANCA EXAMINADORA

Iracema de Oliveira Moraes

Dra. Iracema de Oliveira Moraes
(Orientadora)

Zuleide Alves Ramiro

Dra. Zuleide Alves Ramiro
(membro)

Maria Helena Andrade Santana

Dra. Maria Helena Andrade Santana
(membro)

Tobias Jose Barreto de Menezes

Dr. Tobias Jose Barreto de Menezes
(membro)

Manoel Monte Alegre

Dr. Manoel Monte Alegre
(membro)

Suplente

Dra. Lucia Regina Santos Jafelice
(membro)

Suplente

Dr. Charles Frederick Robbs
(membro)

Campinas, 20 de *dezembro* de 1989

Ao Roberto, meu marido,
Aos meus filhos Raquel e Renato,
Aos meus pais.

INDICE GERAL

	Pág.
RESUMO	XII
SUMMARY	XIV
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1. Considerações gerais	5
3.2. Bacillus thuringiensis	5
3.3. Produção de Bacillus thuringiensis	9
3.3.1. Produção de B.thuringiensis por fermentação submersa	12
I. Variáveis do processo	14
a. Linhagem	14
b. Substrato	16
c. Temperatura	24
d. pH	25
e. Aeração e agitação	27
II. Acompanhamento das fermentações	30
III. Atividade biológica	32
3.3.2. Produção de Bacillus thuringiensis por fermentação semi-sólida	33
3.4. Fermentação semi-sólida	34
3.4.1. Definição	34
3.4.2. Tipos de processo	36
a. Bandejas	36
b. Esteira rolante	37
c. Tubular horizontal	38
d. Tubular vertical	40

	Pág.
3.4.3. Aspectos da fermentação semi-sólida ..	43
I. Variáveis do processo	43
a. Substrato	43
b. Umidade	49
c. Temperatura	52
d. pH	54
e. Aeração e transferência de oxigênio	55
f. Agitação	58
II. Acompanhamento do processo	59
III. Vantagens e desvantagens	60
4. MATERIAL E MÉTODOS	63
4.1. Microrganismo	63
4.2. Inóculo	63
4.3. Substratos	65
4.4. Meios de cultura semi-sólidos	70
4.5. Condições de crescimento	76
4.6. Variação de escala	77
4.7. Acompanhamento das fermentações	80
4.7.1. pH	80
4.7.2. Esporos	80
4.7.3. Umidade	81
4.7.4. Atividade biológica	82
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	90
5.1 Experimentos preliminares	90
5.2. Meio de cultura composto por um único substrato	93

	Pág.
5.3. Combinação de substratos	96
5.4. Umidificação intermediária	103
5.4.1. Umidificação com água	103
5.4.2. Umidificação combinada	108
5.5. Variação de escala	113
5.6. Avaliação biológica	117
6. CONCLUSÕES	121
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125
APÊNDICE 1	161
APÊNDICE 2	180
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS - Apêndices	198
AGRADECIMENTOS	215

INDICE DOS APÊNDICES

	Pág.
APÊNDICE 1 - Resíduos e subprodutos agroindustriais	161
1. Resíduos sólidos	161
2. Resíduos líquidos	171
3. Seleção de subprodutos	178
APÊNDICE 2 - Resíduos e subprodutos utilizados: características de produção e composição.	180
1. Resíduo sólido da indústria de sabões	180
2. Resíduo sólido da indústria de papel e celulose	182
3. Farinha de vísceras	185
4. Farinha de penas	188
5. Resíduo sólido de cervejaria	190
6. Suplemento mineral de algas	193
7. Farelo de batatas e doces	175
8. Água de côco	196

ÍNDICE DE TABELAS

	Pág.
TABELA 1. Sorotipos de <i>Bacillus thuringiensis</i> registrados até 1981.	15
TABELA 2. Tamanho de cristal, conteúdo proteico e atividade da delta-endotoxina, de inclusões para-esporais de <i>Bacillus thuringiensis</i> cultivados em diferentes concentrações de glicose.	19
TABELA 3. Produção de esporos de <i>Rhizopus oligosporus</i> sobre diferentes substratos, em tres níveis de umidade.	50
TABELA 4. Composição do meio de cultura da pré-fermentação.	64
TABELA 5. Substratos testados como componentes de meio de cultura semi-sólido, para obtenção de esporos de <i>Bacillus thuringiensis</i>	67
TABELA 6. Composição química, aproximada, dos subprodutos selecionados como substratos para fermentação semi-sólida com <i>Bacillus thuringiensis</i>	69
TABELA 7. Composição do meio semi-sólido para fermentação de <i>Bacillus thuringiensis</i> , descrita por DULMAGE & RHODES (1971).	71
TABELA 8. Observação qualitativa do efeito do nível de adição de água sobre as características dos diferentes substratos.	72
TABELA 9. Combinação de substratos, utilizada para compor o meio de cultura da fermentação semi-sólida para esporulação de <i>Bacillus thuringiensis</i>	76
TABELA 10. Características dos frascos utilizados na variação de escala do processo semi-sólido com <i>Bacillus thuringiensis</i>	79
TABELA 11. Acompanhamento da fermentação semi-sólida com <i>Bacillus thuringiensis</i> , em diferentes substratos.	94
TABELA 12. Avaliação das fermentações de <i>Bacillus thuringiensis</i> em meios semi-sólidos compostos por dois substratos distintos.	97

	Pág.
TABELA 13. Influência da umidificação do meio de cultura na produção de esporos de <i>Bacillus thuringiensis</i> por processo de fermentação semi-sólido. Substrato utilizado: resíduo sólido de indústria de papel e celulose.	106
TABELA 14. Influência da umidificação do meio de cultura a cada 48 horas, na produção de esporos de <i>Bacillus thuringiensis</i> em processo de fermentação semi-sólido. Substrato utilizado: Farelo de malte.	108
TABELA 15. Efeito da adição de água de côco (apenas em substituição à solução de glicose) sobre a fermentação de <i>Bacillus thuringiensis</i> em processo semi-sólido.	109
TABELA 16. Efeito da adição de água de côco (em substituição à solução de glicose e à água de umidificação) sobre a fermentação semi-sólida de <i>Bacillus thuringiensis</i>	110
TABELA 17. Fermentação semi-sólida com <i>Bacillus thuringiensis</i> em meio de cultura composto pelo resíduo sólido de indústria de papel e celulose, em frascos de 2 500 ml, com e sem adição periódica de água.	114
TABELA 18. Fermentação semi-sólida com <i>Bacillus thuringiensis</i> em meio de cultura composto apenas pelo resíduo sólido da indústria de papel e celulose, em frascos de 2 800 ml, com e sem adição periódica de água.	115
TABELA 19. Fermentação semi-sólida com <i>Bacillus thuringiensis</i> em meio de cultura composto apenas pelo farelo de malte, em frascos de 2 500 ml, com e sem adição periódica de água.	115
TABELA 20. Fermentação semi-sólida com <i>Bacillus thuringiensis</i> em meio de fermentação composto apenas pelo farelo de malte, em frascos de 2 800 ml, com e sem adição periódica de água.	116
TABELA 21. Avaliação da atividade inseticida de <i>Bacillus thuringiensis</i> (isolado de produto comercial à base desta bactéria), produzido por fermentação semi-sólida, contra lagarta da soja (<i>Anticarsia gemmatilis</i>).	119

ÍNDICE DE FIGURAS

		Pág.
FIGURA 1.	Alterações morfológicas durante a esporulação e formação do cristal em <i>Bacillus thuringiensis</i>	6
FIGURA 2.	Ciclo evolutivo da <i>Bacillus thuringiensis</i> em uma lagarta susceptível.	8
FIGURA 3.	Fermentação semi-sólida de <i>Bacillus thuringiensis</i>	10
FIGURA 4.	Fermentação submersa de <i>Bacillus thuringiensis</i>	11
FIGURA 5.	Cinética de utilização da glicose e variação do pH em fermentação submersa de <i>Bacillus thuringiensis</i>	26
FIGURA 6.	Variação da concentração de oxigênio dissolvido durante a fermentação submersa de <i>Bacillus thuringiensis</i>	28
FIGURA 7.	Esquema de um fermentador de bandeja rotatória com agitação.	37
FIGURA 8.	Esquema de um fermentador tipo esteira rolante para processos de fermentação semi-sólida.	38
FIGURA 9.	Esquema de um fermentador rotativo tubular para fermentações semi-sólidas.	39
FIGURA 10.	Esquema de um fermentador tubular horizontal com agitação interna.	39
FIGURA 11.	Esquema de um fermentador tubular vertical, ou de coluna.	41
FIGURA 12.	Influência da temperatura sobre o crescimento fúngico.	53
FIGURA 13.	Floxoograma simplificado das etapas incluídas no preparo do meio de cultura semi-sólido utilizado.	74
FIGURA 14.	Acompanhamento das fermentações semi-sólidas em cinco diferentes meios de cultura (resíduo sólido de indústria de papel e celulose (substrato 2); farelo de bolachas e doces (substrato 7); e suas combinações (A, B e C - TABELA 9)), através das contagens de esporos viáveis (UFC/g).	98

	Pág.
FIGURA 15. Acompanhamento das fermentações semi-sólidas em cinco diferentes meios de cultura [resíduo sólido de indústria de papel e celulose (substrato 2); farelo de bolachas e doces (substrato 7); e suas combinações (A, B e C - TABELA 9)], através da medida do pH.	99
FIGURA 16. Acompanhamento das fermentações semi-sólidas em quatro diferentes meios de cultura [farelo de malte (substrato 5); farelo de bolachas e doces (substrato 7); e suas combinações (D e E - TABELA 9)], através da contagem de esporos viáveis (UFC/g).	100
FIGURA 17. Acompanhamento das fermentações semi-sólidas em quatro diferentes meios de cultura [farelo de malte (substrato 5); farelo de bolachas e doces (substrato 7); e suas combinações (D e E - TABELA 9)], através da medida do pH.	101
FIGURA 18. Influência da umidificação periódica do meio de cultura (cada 48 horas), sobre o desenvolvimento da fermentação semi-sólida de <i>Bacillus thuringiensis</i> , acompanhada pela avaliação do pH. (Substrato utilizado: resíduo da indústria de papel e celulose).	107
FIGURA 19. Influência da umidificação periódica do meio de cultura (cada 48 horas), sobre o desenvolvimento da fermentação semi-sólida de <i>Bacillus thuringiensis</i> , acompanhada pela avaliação do pH. (Substrato utilizado: farelo de malte)	107
FIGURA 20. Variação do pH do meio de cultura constituído pelo resíduo sólido de indústria de papel e celulose, em função da adição ou não de água de côco em substituição à água de umidificação.	111
FIGURA I. Análises de pH, densidade ótica (DO), concentração de glicose, e esporos formados em fermentação submersa com água de côco fresca, para <i>Bacillus thuringiensis</i>	174

ÍNDICE DE FOTOS

		Pág.
FOTO 1.	Aspecto dos resíduos ou subprodutos sólidos utilizados nos experimentos de fermentação semi-sólida.	68
FOTO 2.	Frascos Fernbach utilizados para fermentação semi-sólida.	78
FOTO 3.	Aspecto do frasco de criação das lagartas da soja (<i>Anticarsia gemmatalis</i>), para fins de bioensaio, em dieta artificial.	83
FOTO 4.	Gaiola para acasalamento.	84
FOTO 5.	Gaiolas de ovoposição.	85
FOTO 6.	Frascos para desenvolvimento da fase larval.	85
FOTO 7.	Aspecto da manutenção de soja (<i>Glicine max</i>) para utilização de suas folhas em bioensaios.	86
FOTO 8.	Aspecto da preparação das folhas de soja para execução do bioensaio com <i>Bacillus thuringiensis</i>	87
FOTO 9.	Transferência de lagartas da soja (<i>Anticarsia gemmatalis</i>) da dieta artificial para a folha tratada para bioensaio.	89
FOTO 10.	Aspecto da cultura de <i>Bacillus thuringiensis</i> em meio de pré-fermentação, após 10 horas de incubação.	90
FOTO 11.	Aspecto da cultura de <i>Bacillus thuringiensis</i> após 14 horas de fermentação em meio de pré-fermentação.	91
FOTO 12.	Aspecto da cultura de <i>Bacillus thuringiensis</i> após 20 horas de fermentação em meio de pré-fermentação.	92
FOTO 13.	Aspecto da cultura de <i>Bacillus thuringiensis</i> após 48 horas de fermentação em meio de pré-fermentação.	93
FOTO 14.	Aspecto das folhas de soja e lagartas durante e ao final do bioensaio.	120
FOTO 15.	Aspecto das lagartas da soja ao final do bioensaio.	120

	Pág.
FOTO I. Aspecto característico do resíduo sólido de indústria de papel e celulose, utilizado nos trabalhos experimentais de fermentação semi-sólida.	185
FOTO II. Aspecto característico da farinha de vísceras utilizada nos experimentos de fermentação semi-sólida.	187
FOTO III. Aspecto característico da farinha de penas utilizada nos experimentos de fermentação semi-sólida.	189
FOTO IV. Aspecto característico do resíduo sólido de cervejaria utilizado nos experimentos de fermentação semi-sólida.	192
FOTO V. Aspecto característico do suplemento mineral de algas utilizado como suplemento de alguns meios de cultura para fermentação semi-sólida.	194

ÍNDICE DE QUADROS

		Pág.
QUADRO I.	Composição aproximada de alguns subprodutos da agroindústria brasileira.	163
QUADRO II.	Composição aproximada de alguns produtos e subprodutos agrícolas, resumidos a partir de dados de GOMES (1976).	164
QUADRO III.	Composição química (g/l) da água de côco anão e de praia.	171
QUADRO IV.	Vitaminas e aminoácidos presentes na água de côco.	172
QUADRO V.	Contagem em placas, de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>thuringiensis</i> Berliner/ ml de meio, pH não ajustado.	173
QUADRO VI.	Composição aproximada do melão cítrico.	175

RESUMO

O uso de inseticidas químicos no controle de pragas da agricultura e grãos armazenados nem sempre se mostrou adequado. Como alternativa, vem sendo sugeridos métodos biológicos, como o uso de microrganismos entomopatogênicos, altamente específicos. Entre esses, a bactéria *Bacillus thuringiensis* tem se destacado tanto pelo volume de trabalhos publicados, como pelo interesse comercial que representa.

As possibilidades de obtenção de produto à base de *Bacillus thuringiensis* dependem principalmente do custo de produção massal desta bactéria. No Brasil, novas tecnologias de fermentação e novos meios de cultura devem ser estudados para que se obtenha um produto em condições econômicas para o mercado. A utilização deste entomopatógeno só é possível se sua produção puder ser desenvolvida até escala industrial.

Na busca de novos processos fermentativos, estudou-se a produção de esporos e toxinas de *B. thuringiensis* em meio de cultura de baixo custo (utilizando-se subprodutos e resíduos agroindustriais) pelo processo de fermentação semi-sólido em frascos.

O malte fermentado e o resíduo sólido de indústria de papel e celulose podem ser usados como substrato para o crescimento e esporulação desta bactéria. A umidificação do meio de cultura semi-sólido, bem como a complementação destes meios com sais minerais de baixo custo (que auxiliam no enriquecimento de alguns substratos) aumentou o rendimento em esporos do *B. thuringiensis*.

Concluiu-se que o processo de fermentação semi-sólido pode ser utilizado com sucesso na produção de esporos de *Bacillus thuringiensis*.

SUMMARY

Recently it has been recognized that the chemical insecticides are by no means, the ideal solution for the control of insects that inflict the heaviest losses on agricultural crops. Thus, the introduction of highly specific biological means for insect control has offered a sound alternative to chemical insecticides. Among the best studied species is the commercially important *Bacillus thuringiensis*.

The feasibility of *B. thuringiensis* production depends to a large degree, on the cost at which this product can be obtained. In Brazil, fermentation technology has to aim the production of new fermentation media and new fermentation processes, to get such economical level. Practical use of this entomopathogenic microorganism for crop protection is possible if an industrial scale production of this organism is developed.

In the search for new fermentation process, and based on the few works in this area, it was studied the production of *B. thuringiensis* spores and toxins, in a low cost medium (using agroindustrial by-products) by the semi-solid fermentation process in flasks.

The fermented malt and the solid residue from pulp and paper industry could both be used as complete medium for growth and sporulation of this bacterium. Furthermore, the humidification or the supplementation of the culture media with a low price mineral salt source (that provides feasible enrichment), increases the yield of the spores production.

It was concluded that the semi-solid fermentation can be successfully used for *Bacillus thuringiensis* spores production.

1. INTRODUÇÃO

A busca de métodos alternativos para o controle de insetos-praga da agricultura e de grãos armazenados, levou a pesquisa a detectar microrganismos patogênicos a esses insetos (esses microrganismos são denominados entomopatógenos). Os entomopatógenos são capazes de provocar doenças e/ou a morte dos insetos, mantendo a praga em um nível que não cause dano à produção e mantendo o equilíbrio ecológico do ambiente.

Desde cedo alguns desses microrganismos se mostraram inofensivos ao ser humano, e desta forma seguros para aplicação.

De todos os microrganismos pesquisados para o controle biológico de insetos, tem-se destacado a bactéria *Bacillus thuringiensis* pela facilidade de produção em meios artificiais, por sua eficiência contra insetos e sua inocuidade ao ecossistema.

A metodologia de produção desta bactéria costuma se firmar entre as técnicas de fermentação submersa, e recentemente vem-se observando uma concentração de pesquisas sobre alternativas para este processo, buscando formas de baratear o custo do produto final que costuma ser elevado e restringe seu uso aos países de maior poder econômico.

No Brasil, a utilização de *B. thuringiensis* vem sendo praticada com sucesso no controle de diversas espécies de lagartas pragas de florestas, hortaliças e outras culturas econômicas, principalmente a soja, e mais recentemente no controle de insetos vetores de doenças humanas. Com os

resultados promissores que tem sido alcançados, espera-se uma demanda crescente por este produto, que atualmente é totalmente importado.

Buscando formas de baratear o produto final, tem-se procurado pesquisar os seguintes aspectos :

- processo fermentativo - o processo tradicional é a fermentação submersa, que exige equipamentos caros e mão de obra especializada; a opção seria utilizar um processo semi-sólido, lançando mão de equipamentos simples desenvolvidos no país; o processo semi-sólido é considerado simples, de fácil acompanhamento, e que pode ser realizado em escalas pequenas;
- meio de cultura - uma vez que o meio de cultura líquido costuma ser constituído por subprodutos industriais de baixo custo, pode-se empregar também subprodutos sólidos de baixo custo, para viabilizar o processo semi-sólido;
- equipamentos de controle - o processo submerso costuma ser monitorado através de equipamentos acoplados ao fermentador; o processo semi-sólido, por sua natureza, tem acompanhamento simplificado, exigindo controles de fácil construção e baixo custo de aquisição, porém ainda não disponíveis;

- distribuição/comercialização - num país tão grande como o Brasil, com culturas diversificadas espalhadas por todo o território, a escolha da localização de uma única indústria de grande porte para produzir *Bacillus thuringiensis* seria difícil, pois o custo de distribuição seria elevado. Além disso, a demanda do produto é sazonal, o que leva a picos de consumo. Ao mesmo tempo, uma indústria de fermentação para ser viável precisa funcionar o ano todo, produzindo um volume elevado.

A alternativa de produção por processo semi-sólido parece atrativa, visto que as plantas de fermentação semi-sólida costumam ser apropriadas para pequenas produções. Pequenas indústrias teriam facilidade de utilizar subprodutos regionais, atenderiam principalmente a demanda da região e poderiam até utilizar variedades de *B. thuringiensis* mais adequadas aos insetos das lavouras a que atenderiam. Desta forma o custo de transporte seria bastante reduzido, e o emprego de mão de obra local seria um fator social muito importante a ser considerado.

2. OBJETIVOS

Constituem objetivos específicos deste trabalho:

- * estudar a viabilidade de produção de *B. thuringiensis* por processo de fermentação semi-sólido, em substratos constituídos por subprodutos ou resíduos agroindustriais da região de Campinas, SP;
- * avaliar o potencial dos subprodutos ou resíduos agroindustriais, separadamente e em combinação dois a dois, como substrato para crescimento e esporulação de *B. thuringiensis*;
- * estudar a umidificação mais adequada ao processo proposto, nos substratos mais promissores (isolados ou combinados).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Considerações gerais

Para desenvolvimento do trabalho, foi necessária uma ampla revisão bibliográfica a respeito não só do desenvolvimento do *B. thuringiensis*, suas aplicações e entraves na sua produção, como também uma pesquisa sobre o processo semi-sólido e seu estágio de desenvolvimento. A busca por substratos adequados e de baixo custo, gerou um trabalho sobre resíduos e subprodutos, principalmente nacionais, com características adequadas ao processo de fermentação semi-sólido.

3.2. *Bacillus thuringiensis*

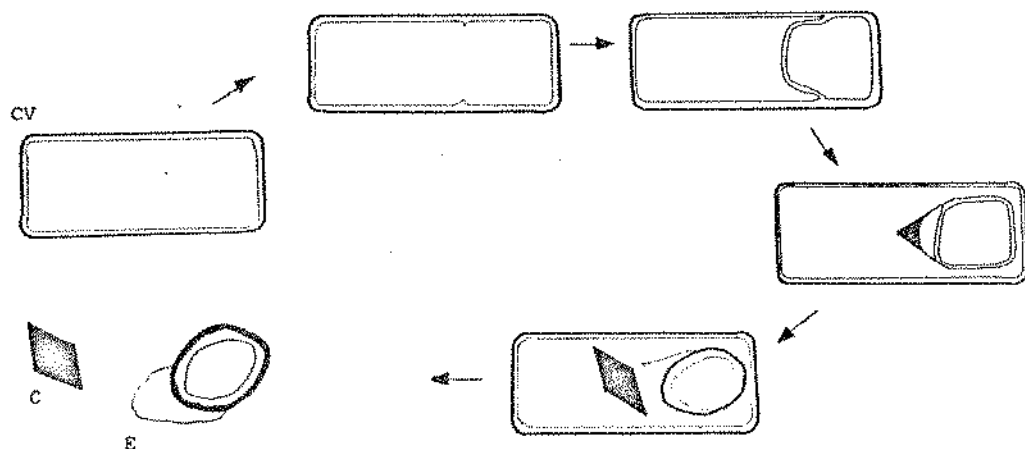
Patógenos de insetos, utilizados como agentes de controle biológico, tem sido utilizados em escala cada vez maior no combate a pragas da agricultura e vetores de doenças. Muitos resultados promissores obtidos com a bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* (Bt) tem levado a pesquisa a concentrar esforços para elucidar uma série de fenômenos que acompanham o controle de insetos por ela exercido.

O primeiro isolado de Bt, posteriormente denominado *B. thuringiensis* var. *sotto*, foi obtido por Ishiwata, no Japão, em 1902, de uma lagarta de bicho-da-seda (*Bombix mori*) (ANGUS, 1965; BULLA Jr. et al, 1980; DULMAGE et al, 1971a; HEIMPEL & ANGUS, 1963;

MORAES, 1973). Em 1915, na Alemanha, Berliner isolou uma bactéria de *Anagasta kuhniella* - traça das farinhas - à qual denominou *Bacillus thuringiensis* (HABIB & ANDRADE, 1986). Entretanto, apenas em 1953 foi demonstrada a presença de um corpo paraesporal na célula esporulada desta bactéria, o qual foi associado à sua atividade inseticida (ANGUS, 1948, 1971; BULLA Jr. et al, 1980; DULMAGE et al, 1971a; ROGOFF & YOUSTEN, 1969). Esse corpo paraesporal (também denominado cristal, cristal protéico, endotoxina, deltaendotoxina ou protoxina), de natureza protéica, é formado durante o processo de esporulação (BULLA Jr. et al, 1980).

As mudanças morfológicas associadas com a formação do cristal ocorrem de forma similar às da esporulação de outras bactérias formadoras de esporos (LECADET, 1970; RIBIER & LECADET, 1973). O esquema destas transformações foi sugerido e esquematizado por SOMMERVILLE (1971, 1978) conforme apresentado na FIGURA 1.

FIGURA 1. Alterações morfogênéticas durante a esporulação e formação de cristal em *Bacillus thuringiensis*. E: exosporo; C: cristal; CV: célula vegetativa. (apud SOMMERVILLE, 1978).

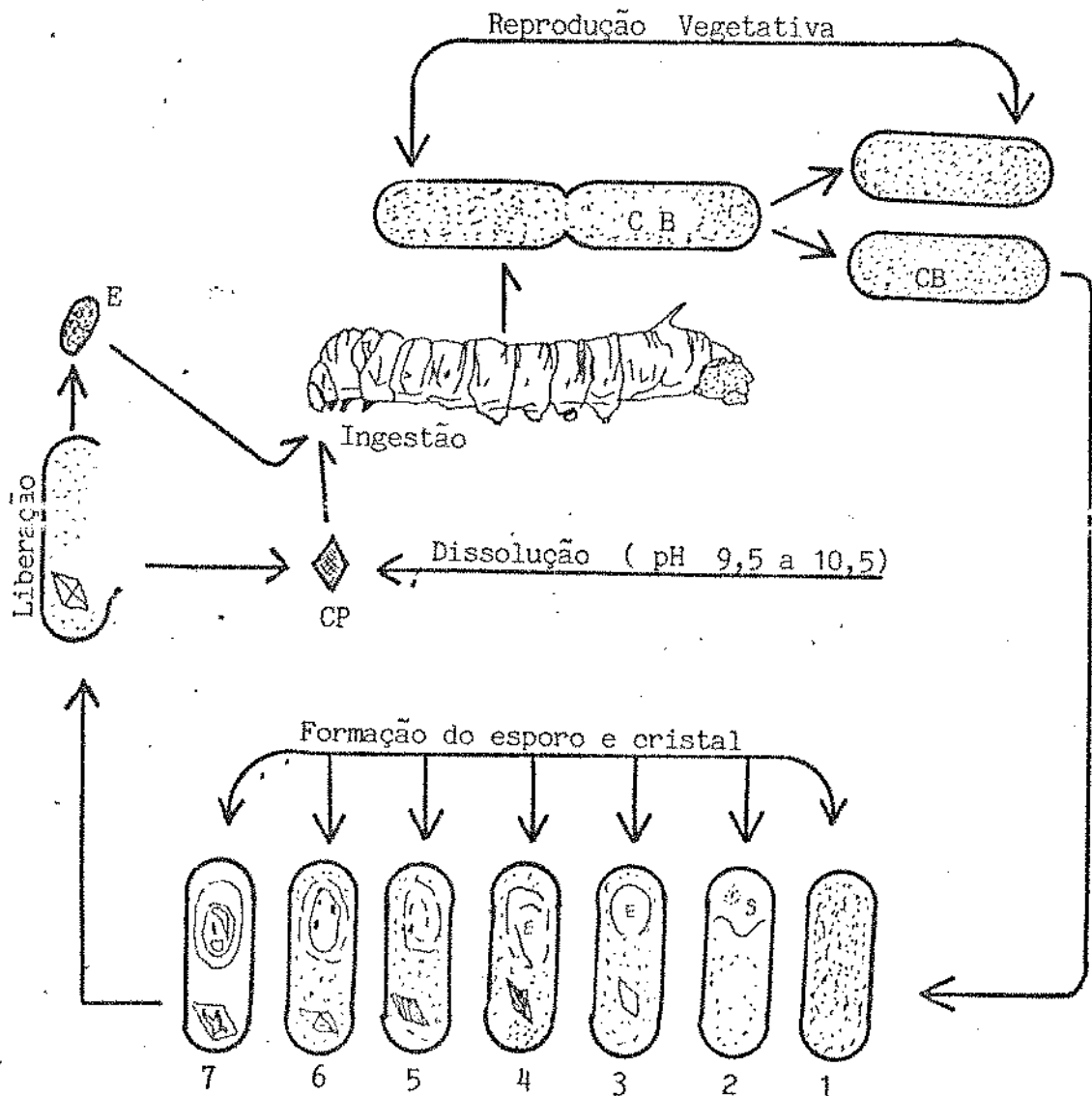


Diversos pesquisadores reviram detalhadamente o efeito deste cristal sobre as larvas de lepidópteros (BURGERJON & BRISON, 1959; BURGESS, 1969; BURGESS & BAILEY, 1968; COOKSEY, 1973; DULMAGE, 1981; DULMAGE et al, 1971b, 1978; FAST, 1972, 1981; FAST & DONAGHUE, 1971; FAUST & DOUGHERTY, 1969; FIGUEIREDO et al 1960). Segundo os vários autores pode-se dizer que este cristal é hidrolisado por enzimas e pelo pH alcalino característicos do trato digestivo de certas lagartas. As subunidades do cristal atuam então sobre o inseto como toxinas, causando a paralisia. O esporo também atua no controle dos insetos quando penetra a parede do tubo digestivo destes, e pode se reproduzir em seu interior. Neste caso, o inseto morrerá com características de septicemia e não de toxemia como no caso de morte pelo cristal (HABIB & ANDRADE, 1986). Esquemáticamente, o ciclo do Bt em uma lagarta susceptível é apresentado na FIGURA 2.

Outras toxinas são igualmente produzidas por diferentes variedades de Bt na fase vegetativa, e tem sido demonstradas suas atividades contra diferentes insetos (HABIB & ANDRADE, 1986; HEINPEL, 1971; HEINPEL & ANGUS, 1960; LUTHY, 1980; MORAES, 1973).

A ampla gama de insetos susceptíveis, a inocuidade à fauna e flora, bem como aos vertebrados, e a possibilidade de produção "in vitro", foram aspectos positivos para a indústria se interessar pela produção deste inseticida em grande escala (BENZ & ALTWEGG, 1975; BURGESS, 1982; BURGESS & HALL, 1982; MORAES & CAPALBO, 1986a).

FIGURA 2. Ciclo evolutivo do *Bacillus thuringiensis* em uma lagarta suscetível. CB: célula bacteriana; S: mesosoma; E: esporo; CP: cristal protéico (apud HABIB & ANDRADE, 1986).



3.3 Produção de *Bacillus thuringiensis*

O interesse comercial no desenvolvimento de produtos para controle microbiano de insetos iniciou-se em torno de 1950, quando se percebeu a possibilidade de manipular microrganismos para causar epizootias em insetos suscetíveis, a velocidades próximas àquelas dos produtos químicos, sem contudo causar danos às espécies benéficas (BRIGGS, 1963; MORAES & CAPALBO, 1986a).

Primeiramente, foram as empresas de fermentação que, na procura por novos mercados se lançaram no estudo da produção de Bt, que se apresentava viável para crescimento "in vitro". A seguir, as indústrias de produtos químicos já estabelecidas na produção e venda de inseticidas sintéticos, demonstraram interesse devido à potencialidade que o inseticida bacteriano representava na facilidade de produção, à viabilidade e eficácia para o controle de insetos. A produção em escala comercial iniciada nos Estados Unidos em 1958, se espalhou pelo mundo, sendo hoje produzido nos mais diversos países, inclusive União Soviética e China (BULLA Jr. & YOSTEN, 1979)

Inicialmente os produtores se preocuparam em proteger seus interesses financeiros através da obtenção de "patentes de processo", relativas às técnicas utilizadas na produção. Algumas, datadas de 1963, descrevem a utilização de fermentação submersa para produção de Bt, enquanto outras descrevem o processo semi-sólido utilizando basicamente trigo integral como substrato (BRIGGS, 1963; BULLA Jr. & YOSTEN, 1979; DULMAGE & RHODES, 1971). Um esquema de ambos os processos é apresentado nas FIGURAS 3 e 4.

FIGURA 3. Fermentação semi-sólida de *Bacillus thuringiensis* (apud DULMAGE & RHODES, 1971).

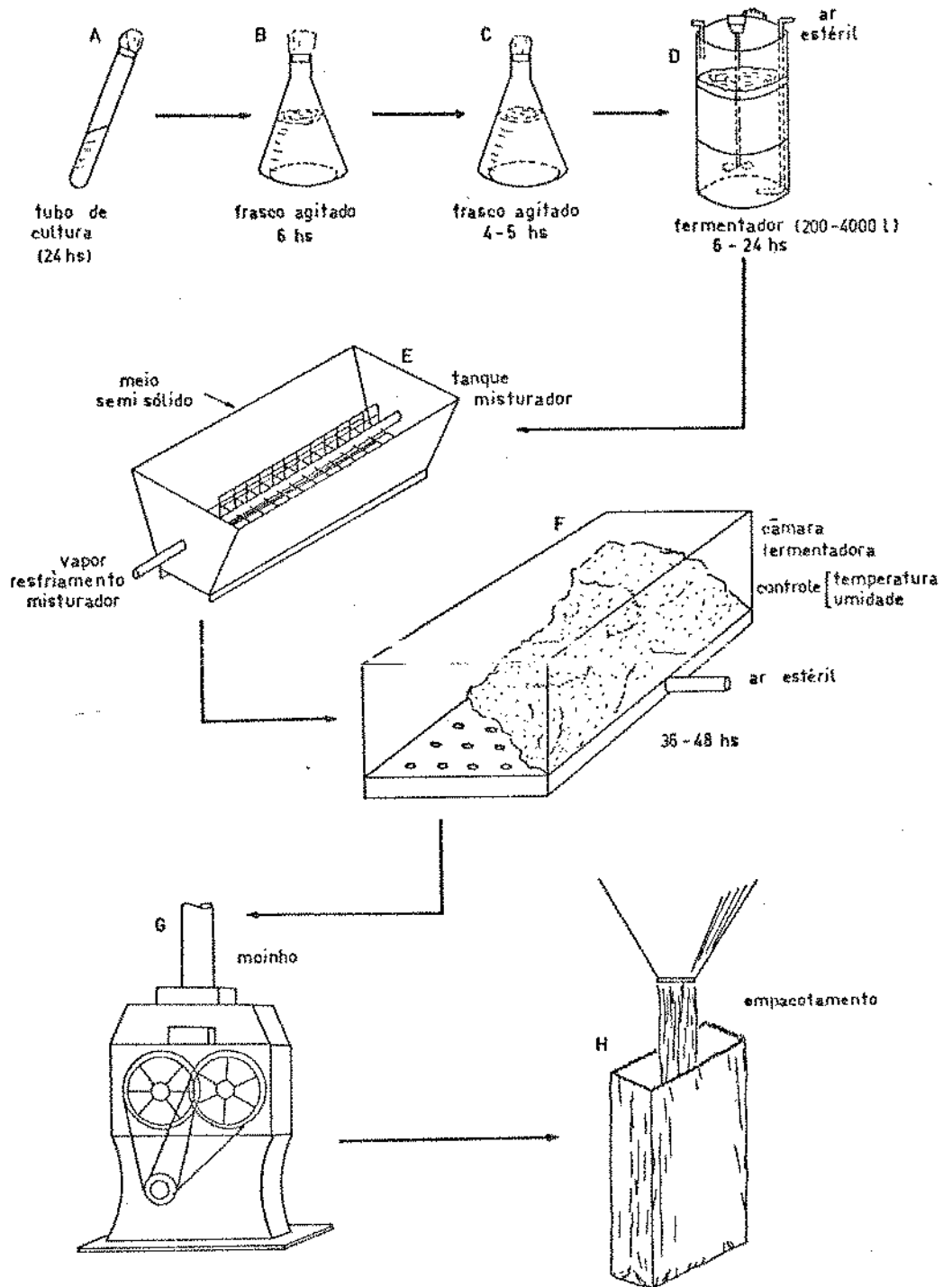
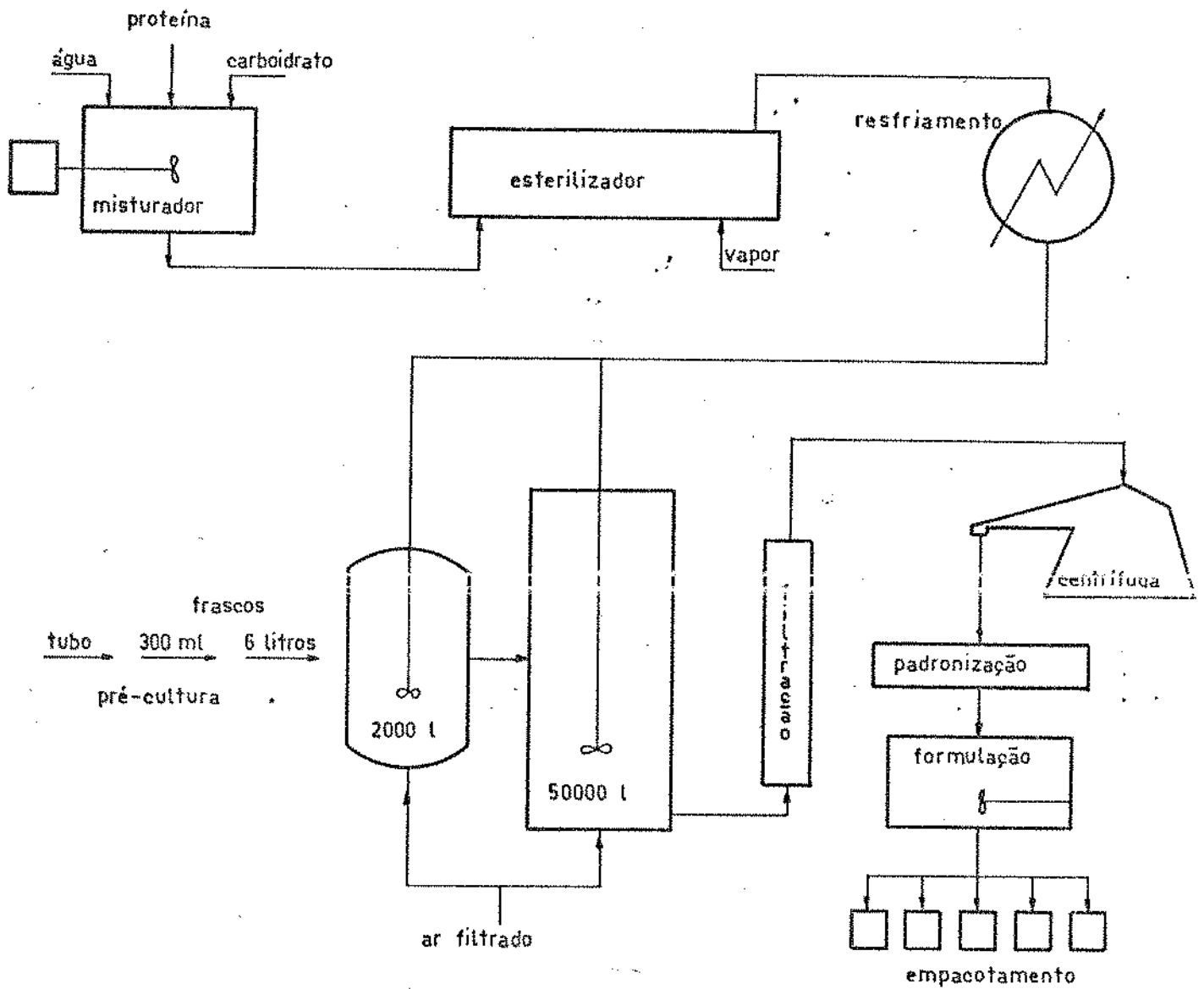


FIGURA 4. Fermentação submersa de *Bacillus thuringiensis* (apud DULMAGE & RHODES, 1971).



Fundamentais nesses processos, são as condições de fermentação ótimas para:

- 1) - obter-se grande número de células que por sua vez possuam grande quantidade de toxinas;
- 2) - recuperar-se a maior quantidade possível de células com toxinas não degradadas;
- 3) - formular-se o produto final de modo que ele seja estável e eficiente.

3.3.1. Produção de *Bacillus thuringiensis* por fermentação submersa

A produção de Bt por fermentação submersa não envolve técnicas diferentes daquelas utilizadas tradicionalmente para produção de enzimas, antibióticos e outros produtos fermentados. Algumas culturas-estoque de uma variedade particular em uso são mantidas por liofilização, secas sobre suporte inerte, ou em nitrogênio líquido. O preparo do inóculo envolve a transferência de uma quantidade desta cultura para tubos contendo meio de cultivo, e desses para frascos agitados, e a seguir para tanques de fermentação que variam de 50 000 até 125 000 litros (BULLA Jr. & YOUSSTEN, 1979; DULMAGE & RHODES, 1971).

O meio de cultura consiste de fontes de carbono e nitrogênio, além de alguns sais minerais. Como regra geral pode-

se afirmar que a temperatura costuma variar entre 28 °C e 30 °C (visto que o Bt é bactéria mesofílica), o pH inicial costuma ser ajustado ao redor de 7,0, e a aeração e agitação sendo indispensáveis (pois o Bt é aeróbico) geralmente devem ser elevados para se obter um bom rendimento (COUCH & ROSS, 1980; DUBOIS, 1968; DULMAGE, 1971; DULMAGE & RHODES, 1971; SALAMA et al, 1983a, 1983b, 1983c).

Ao final do processo, que geralmente dura de 20 a 60 horas, são obtidos cerca de 10^8 - 10^9 esporos / ml de meio fermentado, que é então filtrado e centrifugado ou concentrado por evaporação (ARCAS et al, 1987; BULLA Jr. & YOSTEN, 1979; DHARMISTHITI et al, 1985; GOLDBERG et al, 1980; IGNATENKO et al, 1983; LEE et al, 1986; PEARSON & WARD, 1988; PEREZ & GONZALEZ, 1984).

A formulação do produto final envolve o ajuste da concentração em um nível adequado de unidades internacionais (UI)/miligrama, e a adição de adjuvantes, fotoprotetores, espalhantes e adesivos, de forma a garantir uma boa cobertura das superfícies a serem tratadas (ANGUS & LUTHY, 1971; COUCH & IGNOFFO, 1981).

O valor 1 000 UI é equivalente a atividade inseticida de 1 mg de mistura padrão de esporos e endotoxina de Bt, preparação F-61 fornecida pelo Instituto Pasteur, Paris (DE BARJAC & BONNEFOT, 1972). O valor 18 000 UI/mg é utilizado quando o padrão é o HD-1-S-1971, fornecido pelo U.S. Department of Agriculture (USDA), Estados Unidos (BURGES et al, 1966).

I - Variáveis do processo

a. Linhagem

As variedades, também denominadas linhagens, de Bt utilizadas nas formulações comerciais, variam de uma para outra companhia, e são substituídas quando novas variedades com maior atividade inseticida são obtidas. A maioria dos trabalhos iniciais sobre Bt foram desenvolvidas com a variedade thuringiensis (sorotipo I; os sorotipos são baseados em análises sorológicas dos antígenos flagelares H (BUCHER et al, 1966) conforme método desenvolvido por DE BARJAC & BONNEFOI (1968), e comentado por DE BARJAC (1981)). Esse sorotipo produz uma toxina termestável e hidrossolúvel (também denominada beta-exotoxina) além do cristal. Os produtos obtidos por fermentação submersa não possuem tal toxina devido ao processo de centrifugação a que a cultura é submetida para recuperação da endotoxina.

A variedade kurstaki (sorotipo III, antígeno H 3a,3b) não é produtora de exotoxina e seu nível de toxidez é superior ao de muitas outras variedades testadas (SAIAMA, 1984).

Assim, segundo o processo de fermentação utilizado e/ou o produto final desejado (delta ou beta toxina), se deverá optar pela variedade mais adequada.

As variedades e sorotipos de Bt registrados até 1981 são apresentadas na TABELA 1.

TABELA 1. Sorotipos de *Bacillus thuringiensis* registrados até 1981. (apud HARTB & ANDRADE, 1986)

SOROTIPO	VARIEDADE	ISOLADA DE	ENCONTRADA
H-1	thuringiensis	Anagasta kuhniella	Europa
H-2	finitimus	Malacossoma disstria	América N
H-3	alesti	Bombyx mori	Europa
H-3a	alesti	Bombyx mori	Europa
H-3a:3b	kurstaki	Anagasta kuhniella	Europa
H-3a:3b	kurstaki, HD-1	Pectinophora gossypiella	América N
H-3a:3b-K1	kurstaki	Anagasta kuhniella	Europa
H-3a:3b-K73	kurstaki	Anagasta kuhniella	Europa
H-4a:4b	sotto	Bombyx mori	Ásia
H-4a:4b	dendrolimus	Dendrolimus sibiricus	África
H-5a:5b	galleriae	Galleria mellonella	Ásia
H-5a:5c	canadensis	Diparopsia sp.	América N
H-6	subtoxicus	Paralipsa gularis	América N
H-7	aizawai	Ephestia cautella	Ásia
H-8a:8b	morrisoni	Galleria mellonella	Europa
H-8a:8c	ostriniae	Ostrinia nubilalis	Ásia
H-9	toloworthi	Plodia interpunctella	Europa
H-10	darmstadtensis	Galleria mellonella	Europa
H-11a:11b	toumanoffi	Galleria mellonella	Europa
H-11a:11c	kyushuensis	Bombyx mori	Ásia
H-12	thompsoni	Galleria mellonella	América N
H-13	pakistani	Cydia pomonella	Ásia
H-14	israelensis	Solo (mosquito)	Oriente M
H-15	dakota	Solo (plantação)	América N
H-16	indiana	Solo (plantação)	América N
H-17	tohokuensis	Viveiros de B. mori	Ásia
H-18	kumamotoensis	Viveiros de B. mori	Ásia
H-19	tochigiensis	Viveiros de B. mori	Ásia

Além desse aspecto, SOLIMAN et al (1970) apud SALAMÁ (1984), mostraram que os esporos de Bt tem papel primordial na atividade inseticida contra *Pieris rapae* nos estádios iniciais, ao passo que os cristais tem maior atuação quando o mesmo inseto está em seu quinto estágio larval. SUTTER & RAUN (1966) mostraram que a combinação de esporo e cristal de Bt var. *thuringiensis* contra *Ostrinia nubilalis* é mais efetiva do que quando cada um dos componentes é utilizado separadamente. O esporo e o cristal quando testados isoladamente tem eficiência muito semelhante, entretanto dos insetos que sobrevivem ao bioensaio, cerca de 20% morrem no estágio de pupa quando o esporo foi testado, ao passo que 100% de eclosão é observada quando o cristal foi adicionado à dieta. ANGUS (1956) apud SCHERRER et al (1973), sugere em seu trabalho, que a atividade inseticida do Bt é baseada principalmente no cristal, e que o esporo desempenha papel secundário.

b. Substrato

Uma vez que a atividade inseticida do Bt está relacionada principalmente ao cristal e ao esporo bacteriano, o que se deseja ao final da fermentação é um alto rendimento desses elementos. A produção de metabólitos microbianos pode ser favorecida pela escolha correta das condições de cultura utilizadas, bem como pela escolha da variedade do microorganismo (KNAYSI, 1945a; MORAES et al, 1980).

MURREL (1961) em uma revisão sobre a formação de esporos bacterianos, confirmou a importância dos nutrientes presentes no meio de cultura, anteriormente comentada por KNAYSI (1945a). Comentou que a natureza das fontes de carbono e nitrogênio é determinante na formação do esporângio, e que o balanço carbono: nitrogênio (C:N) pode determinar quando ocorrerá a formação do esporo. Verificou que altas concentrações de nutrientes orgânicos podem retardar a formação do esporo e reduzir a porcentagem de células em estado de esporulação. Comentou ainda que esses efeitos estão relacionados ao aumento do crescimento vegetativo e mudanças do ambiente relacionadas a este fato, tais como redução do oxigênio disponível, variação do pH, e aumento da concentração de alguns inibidores. Ele afirmou que os efeitos variam de acordo com a concentração do produto em estudo, e com a bactéria que esteja sendo utilizado. Desta forma, destacou que glicose, lactose e amido, além do acetato e tartarato, aumentam a termorresistência dos esporos de *Bacillus subtilis*; também observou que a ausência de ácido fólico reduz a esporulação de *Bacillus coagulans*, o mesmo ocorrendo com ácido para-amino-benzóico em relação ao *Bacillus cereus*. Entre outros fatos, destacou ainda que a presença de asparagina (2% peso/volume) em meio contendo caseína hidrolisada, inibe quase totalmente a esporulação de várias bactérias aeróbicas.

DULMAGE (1970a, 1970b), ROGOFF & YOSTEN (1969) e YOSTEN & ROGOFF (1969) comentaram a influência que o meio de cultura pode exercer sobre a produção do cristal de Bt. DULMAGE & RHODES (1971) citaram que conforme a relação C:N do meio, pode ocorrer esporulação incompleta, rompimento celular, germinação de

esporos e/ou autólise, que alterará o produto final obtido, além do processo para recuperação deste produto ficar prejudicado. DULMAGE (1971) concluiu que a produção da endotoxina pode variar entre isolados de um mesmo sorotipo de Bt, e que não há um único substrato ou meio de cultura que seja o melhor. Este deve ser selecionado para cada isolado com que se vai trabalhar (DULMAGE, 1971; DULMAGE & RHODES, 1971). Essas afirmações foram confirmadas por NAGAMMA et al (1972), estudando produção de Bt em meio sólido, e por GALLEGOS et al (1984), utilizando fermentação submersa. Eles trabalharam com diferentes isolados de Bt, meios de cultura e processos diversos dos de DULMAGE (1971). SMITH (1982) trabalhando com Bt var. israelensis observou também variação na esporulação e atividade biológica decorrentes da variação na constituição do meio.

BUCHER et al (1966) verificaram quais os açúcares utilizados pelo Bt, e SCHERRER et al (1973) estudaram a influência da concentração de glicose sobre a endotoxina de Bt, utilizando Bt var. thuringiensis e um meio definido acrescido de extrato de levedura. Eles determinaram que a concentração ótima de glicose estava entre 6 e 8 g/l, e verificaram correlação direta entre a concentração de glicose e o tamanho do cristal, além da alteração na potência tóxica. Tal correlação está transcrita na TABELA 2.

TABELA 2. Tamanho do cristal, conteúdo protéico e atividade da delta-endotoxina de inclusões parasporais de *Bacillus thuringiensis* cultivados em diferentes concentrações de glicose (apud SCHERRER et al, 1973).

Concentração de glicose no meio (g/l)	Tamanho do cristal (um)	Proteína (*)	Número de cristais (**)
0	0,5	0,12	9 000
1	0,5	0,21	8 000
3	1,0	0,45	7 200
6	2,0	0,91	5 000
8	2,0	1,10	2 200
15		1,0	2 400

8

(*) - mg de proteína obtida a partir de 5×10^8 cristais.

(**) - número de cristais/larva para inibição total da alimentação.

NICKERSON & BULLA Jr. (1974) verificando algumas exigências nutricionais mínimas para dezoito diferentes sorotipos, visando a produção de Bt, realçaram o fato de que o Bt não se desenvolve em meio mínimo glicose-sais minerais como havia sido afirmado por ROGOFF & YOSTEN (1969) e SINGER et al (1966), a menos que o meio seja suplementado com citrato, aspartato ou glutamato em concentrações de aproximadamente 0,2%. Além disso, observaram para alguns isolados, que a ausência de glicose gerou esporulação incompleta. Observaram também que os meios sugeridos por CONNER & HANSEN (1967) e SINGER et al (1966) eram inadequados pois permitiam apenas um crescimento restrito de uns poucos isolados.

ARCAS et al (1984) e FODA(1985) apud SALAMA (1984), confirmaram que a presença de glicose até 2,5% aumentava o rendimento em esporos de Bt. Em outro trabalho, ARCAS et al (1987) chegaram a utilizar uma concentração de 5,6% de glicose com bons resultados. SALAMA (1984) afirmou que a glicose poderia ser substituída por sódio, sem afetar a obtenção do produto desejado.

MAJUMDER & PADMA (1957) estudaram diferentes carboidratos em meio líquido, visando a esporulação de *B. subtilis*, *B. cereus* e *B. megaterium*. Observaram que a esporulação foi estimulada pela D-xilose. Posteriormente, NAGAMMA et al (1972) fizeram a mesma observação em seu estudo com Bt.

SMITH (1982) estudando a produção de Bt var. *israelensis* observou que o glicerol se mostrou a fonte de carbono mais indicada para obtenção do produto com alto poder tóxico. Também o *B. subtilis* esporula na presença de glicerol e malato, segundo afirmação de VASANTHA & FREESE (1979).

A presença de nitrogênio no meio de cultura para produção de Bt é considerada importante na biossíntese do cristal tóxico (PFARSON & WARD, 1988; SALAMA et al, 1983c; SOMERVILLE (1978). Conforme observado por GOLDBERG et al (1980), a adição de 1 a 5 g/l de extrato de levedura aumentou sensivelmente o crescimento do Bt, além de conduzir a um consumo praticamente total da glicose.

SALAMA et al (1983b), estudando a viabilidade de produção de Bt em soro de queijo, observaram que a adição de levedura e de

Levedura forrageira aumentava a produção de esporos. Resultados semelhantes foram relatados por PEREZ & GONZALEZ (1980b), com a adição entre 5 e 10 g/l de levedura forrageira aos meios líquidos estudados. SALAMA et al (1983c) chegaram a utilizar levedura forrageira como único componente do meio de cultura líquido (0,5 a 4%, em água) obtendo ainda uma ótima esporulação acompanhada de resultados positivos de ação inseticida. Esses autores acrescentaram que a adição de 1% de dextrina auxiliou no aumento do rendimento de esporos tóxicos.

HERTLEIN et al (1981a, 1981b) baseados na premissa de que ótimos resultados puderam ser alcançados produzindo Bt var. israelensis em meios de cultura contendo apenas fontes de proteína, testaram diferentes proteínas de origem animal (carne cozida, sangue, leite em pó) e vegetal (soja, restos e detritos agrícolas), obtendo resultados variáveis de acordo com a fonte de nitrogênio utilizada. O mesmo efeito havia sido observado por ROGOFF et al (1969).

Já em 1955, PROON (1955) apud FERNANDEZ et al (1975) detectou a necessidade da presença de vários aminoácidos para produção de *B. cereus* var. *thuringiensis*: L-asparagina, L-prolina, L-leucina, DL-alanina, ácido glutâmico, DL-serina e DL-metionina. Em estudos mais recentes, VEERWALL & RANA (1981) comentaram que a ametoerina (cuja estrutura é análoga à do ácido fólico), inibe o crescimento e favorece a esporulação do Bt quando em uma concentração de 1×10^{-5} M.

DHARHISTHITI et al (1985), estudando a produção de Bt var. israelensis e *Bacillus sphaericus* observaram que o licor

hidrolisado proveniente da indústria de glutamato monossódico (rico em ácido glutâmico e L-tirosina) quando adicionado de fosfato de potássio, era suficiente para promover o crescimento e esporulação das duas bactérias, sendo que o produto final possuía atividade inseticida. FOSTER & HELIGMAN (1949) observaram que a esporulação de *B. cereus* era efetiva em meios contendo glutamato e 0,1 - 0,2% de glicose. O glutamato sozinho era suficiente para o crescimento, porém a esporulação era muito reduzida. ARCAS et al (1984) observaram que a cisteína era indispensável na obtenção de esporos de *Bt.* FOSTER & HELIGMAN (1949) observaram que a alanina inibia a esporulação de *B. cereus* sem alterar a fase de crescimento vegetativo.

CHARNEY et al (1951), LEE & WEINBERG (1971) apud NICKERSON & BULLA Jr. (1975), e SLEPECKY & FOSTER (1959) observaram que as exigências nutricionais em relação a íons, para *B. megaterium* e alguns outros bacilos, eram maiores para esporulação do que somente para o crescimento. A presença de íons manganês (Mn), cálcio (Ca), zinco (Zn) e ferro (Fe) tem sido recomendada com frequência, para esporulação de diferentes bactérias (ARCAS et al, 1984; BRIGGS, 1963; CROSBY, 1971; CURRAN & EVANS, 1954; FOSTER, 1956; MURREL, 1961; NICKERSON & BULLA, 1975; SINDER et al, 1966; STEWART & HALVORSON, 1953). A presença de Mn foi considerada essencial para o crescimento e esporulação em *B. subtilis*, *Bt* e outros bacilos (CHARNEY et al, 1951; CROSBY et al, 1971; KOLODZIEJ & SLEPECKY, 1964; LEWIS & PAPAVIDAS, 1983; MURREL, 1961; VASANTKA & FREESE, 1979; WEINBERG, 1955), o mesmo acontecendo com o magnésio (Mg) (KNAYSI, 1945a; STEWART & HALVORSON, 1953).

CROSBY et al (1971), MURRELL (1961) e SLEPECKY & FOSTER (1959) salientaram a importância do cálcio na esporulação e termestabilidade das bactérias. ARCAS et al (1984) comentaram que quando o crescimento do Bt está limitado pelo cálcio, os esporos são menos refráteis, confirmando o mesmo efeito observado sobre *B. megaterium* por KOLODZIEG & SLEPECKY (1964). Além disso os sais de cálcio podem auxiliar na regulação ou correção do pH do meio, conforme salientado por SALAMA et al (1983a).

SLEPECKY & FOSTER (1959) afirmaram que o grande acúmulo de Zn, Mn e níquel (Ni) nas células do esporo de *B. megaterium* diminui a termorresistência do esporo. Entretanto, ressaltaram que a sensibilidade à radiação ultra-violeta e resistência à dessecação, não se relacionavam com a concentração dos íons metálicos. BOUDREFAUX & SRINIVASAN (1981) observaram que flutuações muito pequenas nas concentrações de Zn e Mn, alteravam o metabolismo das células vegetativas de *B. cereus*, alterando sua capacidade de utilização dos substratos.

KRISHNA-HURTY & HALVORSON (1957) observaram que a presença de ferro (Fe), cobre (Cu), cromo (Cr) e mercúrio (Hg) inibiu a germinação de esporos de *B. cereus*.

O potássio (K) também é importante no crescimento, esporulação e formação da endotoxina de Bt, conforme salientado por KNAYSI (1945b), SALAMA et al (1984) e WASINAKA et al (1982). WASINAKA et al (1982) chegaram ainda a determinar que a concentração de 330 microgramas de K/ml promove a esporulação do Bt, acompanhada da formação de um cristal efetivamente tóxico.

PEREZ & GONZALEZ (1984) e PEREZ et al (1983), observaram que mesmo quando meios diferentes apresentavam igual rendimento em esporos, o produto final deles obtido variava em virulência. MOHD-SALLEH et al (1980) estudando a produção de exotoxinas de Bt, verificaram que variedades produtoras destas toxinas podiam não produzi-la em função do meio de cultura onde se desenvolvia a fermentação.

c. Temperatura

Alguns autores observaram que a redução da temperatura de incubação poderia promover a formação de células e esporos anormais (IGNATENKO et al, 1983; MURREL, 1961; SMIRNOFF, 1963), bem como a termestabilidade dos esporos bacterianos podia ser afetada. Segundo IGNATENKO et al (1983) e MURREL (1961), esporos formados a temperaturas elevadas (da ordem de 35-40 C), são mais termorresistentes.

Para Bt, a temperatura ótima de crescimento se situa entre 30 e 35 C (BULLIÁ Jr. & YOSTEN, 1979; DULMAGE & RHODES, 1971; IGNATENKO et al, 1983; MORAES, 1973; SALAMA et al, 1983b, 1983c, 1983d; SMIRNOFF, 1963). IGNATENKO et al (1983) sugeriram em seu trabalho, que se mantivesse a temperatura de 30 C durante o crescimento de Bt, até o estágio estacionário, e a seguir a temperatura fosse elevada até 35 C (estágio de esporulação); agindo desta forma os autores afirmaram que se obterá um maior rendimento em esporos termestáveis viáveis. Os mesmos autores testando outras faixas de temperatura para crescimento e esporulação de Bt, detectaram que temperaturas de 20 C ou

inferiores, aumentavam o tempo de fermentação, e temperaturas de 40 C ou superiores, inibiam sempre a esporulação.

d. pH

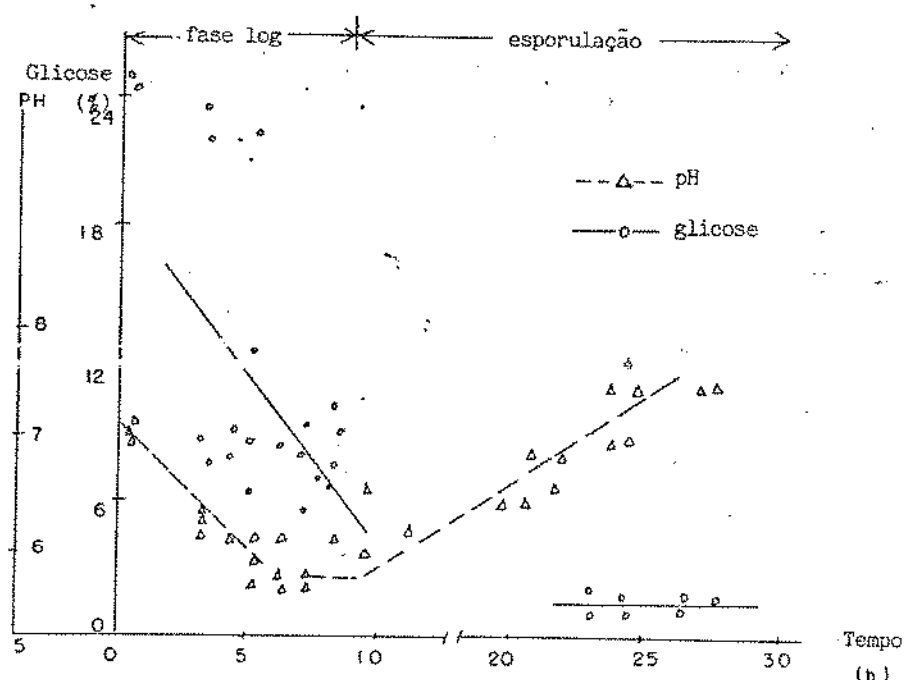
Valores de pH do meio de cultura que promovem o crescimento vegetativo de algumas bactérias, podem limitar a formação de esporos, conforme observado por MURRELL (1961).

MORAES & CAPALBO (1986b) e ROGOFF & YOSTEN (1969), trabalhando com Bt, e MURRELL (1961) e YAZDANY & LASHKARY (1975) utilizando B. cereus e B. subtilis, observaram que o pH do meio de cultura inicialmente ajustado para o valor 7,0, diminuiu rapidamente até valores entre 5,0 e 5,5 nas primeiras duas a três horas no processo fermentativo. Essa queda no valor do pH foi explicada pela utilização da glicose presente no meio de cultura, resultando num acúmulo de ácido acético e pirúvico. Nos estágios seguintes, estes ácidos sendo metabolizados, provocam um retorno do pH à sua neutralidade, chegando mesmo a atingir valores ao redor e acima de 8,0 nas fases de esporulação e lise (DUBOIS, 1968; ROGOFF & YOSTEN, 1969). Assim, o pH se mostra indicador da extensão do uso dos nutrientes presentes no meio de cultura (KNAYSI, 1945a).

Observações feitas em laboratório (CAPALBO, 1984) indicaram que o controle do pH do meio de cultura durante a fermentação do Bt não promove o aumento da esporulação, chegando em alguns casos a reduzir o número de esporos formados.

CAPALBO & MORAES (1984) e MORAES & CAPALBO (1986b) apresentaram de forma bastante clara que o acompanhamento do desenrolar de uma fermentação submersa com Bt pode ser realizado de forma simples e rápida, através do comportamento do pH do meio de cultura. Esse fato pode ser observado na FIGURA 5.

FIGURA 5. Cinética da utilização da glicose e variação do pH em fermentações submersas de *Bacillus thuringiensis* (apud MORAES & CAPALBO, 1986b).



Desta forma, o pH do meio de cultura costuma ser monitorado, mas não corrigido, durante as fermentações envolvendo BT (BULLA Jr. & YOSTEN, 1979). Entretanto, o valor inicial do pH do meio é sempre ajustado para valores próximos à neutralidade para favorecer o início do crescimento bacteriano (CAPALBO, 1984; MORAES, 1973; ROGOFF & YOSTEN, 1969).

e. Aeração e agitação

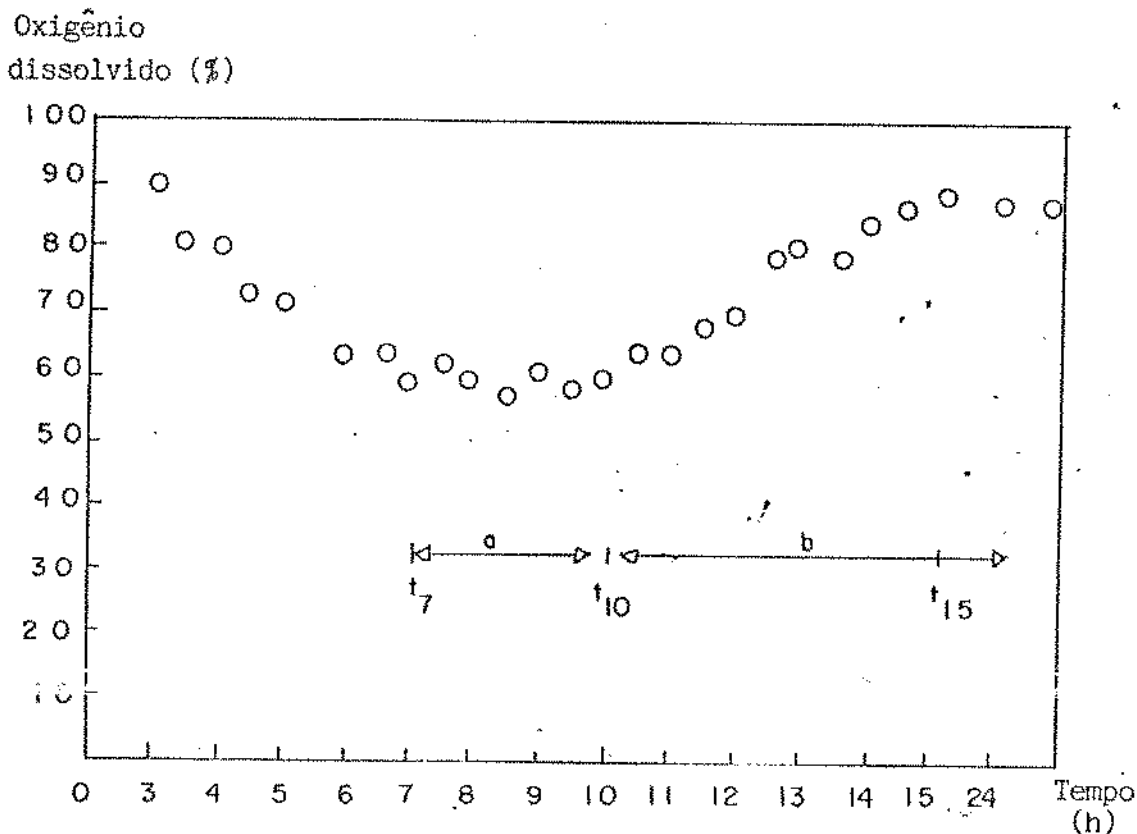
As finalidades da aeração e agitação nas fermentações aeróbicas são: suprir oxigênio aos microrganismos; misturar o meio de cultivo, de forma a permitir uniformidade na suspensão dos microrganismos; e acelerar a velocidade da transferência de massa (AIBA et al, 1971).

Sendo o Bt uma bactéria aeróbica, o oxigênio é importante no seu desenvolvimento, auxiliando também na utilização efetiva dos nutrientes presentes no meio de cultura (KNAYSI, 1945a), porém essa necessidade é menor nos estágios de esporulação do que durante as etapas de germinação e crescimento (CAPALDO & MORAES, 1984; IGNATENKO et al, 1983; MORAES et al, 1980; MURREL, 1961; PEARSON & WARD, 1982; SANTANA, 1980). MORAES & CHAIB (1978) relacionaram a utilização de O_2 com as etapas de desenvolvimento e esporulação do Bt, como se pode observar na FIGURA 6.

FIGURA 6. Variação da concentração de oxigênio dissolvido durante a fermentação submersa de *Bacillus thuringiensis*.

a - fase de crescimento logarítmico

b - fase de esporulação e formação do complexo esporo-cristal. (apud MORAES & CHAIB, 1978).



IGNATENKO et al (1983) observaram que a termorresistência dos esporos aumentava rapidamente com o aumento da taxa de aeração, até $20 \text{ mg O}_2 / \text{l} \cdot \text{minuto}$. Porém valores entre 20 e $60 \text{ mg O}_2 / \text{l} \cdot \text{minuto}$, não aumentaram o rendimento, sendo que valores superiores a $60 \text{ mg O}_2 / \text{l} \cdot \text{minuto}$, provocaram uma redução deste mesmo rendimento.

SCHERRER et al (1973) em experimentos preliminares tentaram relacionar a taxa de aeração do processo de produção do Bt com a toxidez do produto final obtido, e notaram que taxas

maiores geravam cristais menores, porém com alta atividade tóxica. Quando o suprimento de O₂ era reduzido, os cristais formados eram de maior tamanho, porém de baixa toxidez. A explicação encontrada foi que o cristal protéico não seria constituído por um único tipo de proteína e deste modo as características do processo fermentativo afetavam de maneira diversa a formação das diferentes proteínas que compunham o cristal. Assim, a delta-endotoxina seria depositada no cristal em menor quantidade do que as demais, sob determinadas condições não muito favoráveis, gerando um produto menos tóxico.

Fica bastante evidente que a capacidade tóxica da célula esporulada do Bt é grandemente afetada pelas condições de cultura. A seleção do meio e escolha da variedade adequada se destacam pelo volume de trabalhos já realizados, entretanto igualmente importantes são as condições do processo fermentativo (ARCAS et al, 1984, 1987; CONNER & HANSEN, 1967; COUCH & ROSS, 1980; DULMAGE, 1970b, 1971; FERNÁNDEZ et al, 1975; MORAES & CAPALBO, 1986a; NICKERSON & BULLA, 1974; SALAMA et al, 1983a, 1983c; SCHERRER et al, 1973; SMITH, 1982; VEERWAL & RANA, 1981).

Para sua produção em escala comercial, deve-se observar não apenas o alto rendimento em esporos de Bt, mas ao mesmo tempo deve-se certificar que os componentes do meio de cultura estejam bem balanceados para que se atinja a maior atividade tóxica por volume de fermentação (DULMAGE, 1970b, 1971, 1973; MORAES & CAPALBO, 1986c).

II - Acompanhamento das fermentações

A amostra de material sendo fermentado, coletada assepticamente, é diluída convenientemente para medida do crescimento microbiano, por diferentes métodos. Os vários autores utilizam-se das metodologias revisadas a seguir:

- leitura da absorbância ou densidade ótica da amostra, em espectrofotômetro, utilizando comprimento de onda entre 540 e 625 nm (DHARMSTHITI et al, 1985; DUBOIS, 1968; IGNATENKO et al, 1983; MORAES, 1976; PEARSON & WARD, 1988; SINGER et al, 1966; VEERVAL & RANA, 1981);

- medida da massa celular obtida após centrifugação (6000 a 10 000 G), por 10 a 20 minutos, resfriada e armazenada (KNAYSI, 1945a; NAGANATSU et al, 1978; SCHERRER et al, 1973) ou seca em estufa até peso constante (ARCAS et al, 1987; MORAES, 1976; ZAHOLA et al, 1981);

- observação e contagem direta ao microscópio, em câmara de Neubauer ou similar, com contraste de fase; as células são observadas e contadas em diferentes estágios de desenvolvimento. A presença do cristal também pode ser notada (DIETZ, 1981). Através de cálculos são avaliadas as respectivas proporções (BULLA Jr. et al, 1969; DUBOIS, 1945; IGNATENKO et al, 1983; PEARSON & WARD, 1988; PEREZ & GONZALEZ, 1984; PEREZ et al, 1982, 1983; SALANA et al, 1983a; SINGER et al, 1966);

- contagem por plaqueamento; realizada pela avaliação da concentração celular por contagem de colônias formadas após plaqueamento em meio agar-nutritivo; contagem total (número total de células capazes de desenvolver colônias, denominadas frequentemente de células viáveis ou unidades formadoras de colônia - UFC), e a contagem de esporos (representada pela quantidade de UFC após tratamento térmico - 50 a 80 °C - por um intervalo determinado de tempo - 5 a 40 minutos) (ARCAS et al, 1987; BUSTA, 1984; DHARMSHITI et al, 1985; DUBOIS, 1968; DULMAGE, 1971; FERNANDEZ et al, 1975; FISHER, 1963; GOLDBERG et al, 1980; IGNATENKO et al, 1983; NAGAMMA et al, 1972; PEREZ et al, 1983; SCHERRER et al, 1973; VEERWAL & RANA, 1981);

- observação ao microscópio, auxiliada por coloração diferenciada para esporos, cristais e células vegetativas (BARTHOLOMEW & MITTNER, 1950; BENZ & BORUSIEWICZ, 1963; SMIRNOFF, 1962; VEERWAL & RANA, 1981);

- avaliação da quantidade de complexo esporo-cristal produzido, através do processo sugerido por DULMAGE et al (1970): a amostra ou o caldo da fermentação, é submetido a centrifugação e lavagens sucessivas, com auxílio de acetona e lactose. O material precipitado representará praticamente todo o complexo tóxico produzido durante a fermentação (DULMAGE, 1971; MORAES, 1973; SALAMA et al, 1983a, 1983b).

Em alguns experimentos onde a influência da aeração sobre a produção está sendo observada, o acompanhamento da concentração de oxigênio e gás carbônico, tanto no meio de cultura como no espaço livre acima do meio de cultura, costuma ser analisado através de equipamentos específicos (ARCAS et al, 1987; ZAMOLA et al, 1981).

III- Atividade biológica

Quanto ao potencial tóxico do produto recuperado na fermentação, quase todas as análises costumam ser realizadas através de bioensaios que consistem de teste da atividade tóxica do produto, contra um inseto específico (BIOASSAY, 1976; BURGESS, 1966, 1967; DE BARJAC & BURGERJON, 1972; DULMAGE, 1973; FISHER, 1963; PEARSON & WARD, 1987; RUSSEL et al, 1977; UNDEEN & LACEY, 1982).

O inseto a ser utilizado é definido pela sua importância como praga, ou pela sua facilidade de criação em laboratório, ou ainda por sua suscetibilidade à variedade de Bt em teste. O inseto costuma ser alimentado com doses conhecidas de Bt e a taxa de mortalidade obtida é comparada com um controle (insetos que não receberam dieta com Bt), e com um padrão internacional (insetos que ingeriram um padrão pré-estabelecido de Bt (BURGES et al, 1982; DULMAGE, 1971; DULMAGE & RHODES, 1971; GOLDBERG et al, 1980; PAPAIVIZAS et al, 1984; PEREZ & GONZALEZ, 1984; PEREZ et al, 1983; REICHELDELFER, 1985; SALAMA et al, 1983a, 1983c, 1983d; ZAMOLA et al, 1981). O resultado será então apresentado

como concentração letal (CL) ou dose letal (DL) necessária para matar 50% dos insetos (CL₅₀ ou DL₅₀), ou como unidades internacionais de atividade (UI) por unidade de massa (mg) de produto utilizada.

Várias tentativas tem sido realizadas no sentido de avaliar o potencial inseticida dos produtos à base de Bt, através de métodos químicos ou bioquímicos mais simples e rápidos que os bioensaios, entretanto todos tem apresentado problemas, seja com a sua condução ou com o tempo exigido para obter os resultados. Uma alternativa que tem-se mostrado interessante é a determinação do potencial inseticida através de imuno-eletroforese (ANDREWS et al, 1980; WINKLER et al, 1971), que apresenta resultados bastante satisfatórios. Entretanto a dificuldade de se obter antiserum para sua execução tem limitado seu uso mais amplo.

3.3.2. Produção de *Bacillus thuringiensis* por fermentação semi-sólida

Os primeiros trabalhos de produção de Bt por processo fermentativo semi-sólido foram realizados por MECHALAS (1962) apud BRIGGS (1963), BURGESS et al (1966) e DULMAGE & RHODES (1971), entretanto, segundo DULMAGE & RHODES (1971), ele foi abandonado, nos Estados Unidos, pela competitividade apresentada pelo processo submerso.

3.4. Fermentação semi-sólida

3.4.1 - Definição

O processo de fermentação semi-sólido (abreviadamente FSS), assim denominado por DULMAGE & RHODES (1971), HAN & ANDERSON (1975), MCCOY & COUCH (1978), SOPER & WARD (1981), THIEMANN (1985) e outros autores, é também conhecido como fermentação de substrato sólido (HALL & PAPIEROK, 1982; LAUKEVICS et al, 1984; TENGEDY, 1985) ou mais frequentemente denominado fermentação em estado sólido (CHAHAL, 1985; HANG & WOODANS, 1987; HESSELTINE, 1972, 1977a, 1977b; LONSANE et al, 1985; PAMMENT et al, 1978; PEKIN, 1983; RAMESH & LONSANE, 1987; RAO et al, 1983).

HANG & WOODANS (1987) e HESSELTINE (1972, 1977a) definiram o processo FSS como sendo qualquer fermentação na qual o substrato não é líquido. Outros autores afirmam que a FSS é um processo microbiológico de transformação de materiais biológicos em seu estado sólido, suficientemente umedecidos, na ausência de água livre (CANNFL & MOO-YOUNG, 1980; CHAHAL, 1985; FOGARTY & WARD, 1974; LAUKEVICS et al, 1984; LONSANE et al, 1985; PAMMENT et al, 1978; RAO et al, 1983; TENGEDY, 1985; THIEMANN, 1985). PAMMENT et al (1978) complementaram esta definição, acrescentando que numa FSS cerca de 20 a 30% (peso/volume) da fermentação, são sólidos.

Como qualquer definição, as apresentadas pelos diferentes autores é discutível, principalmente porque o conceito de " água

livre " é flexível, e é uma característica variável com a temperatura, umidade e principalmente com as características de cada sólido (LAUKEVICS et al, 1984; NORTHOLT & BULLERMAN, 1982; RAMSTACK et al, 1979).

De forma geral, entretanto, a denominação envolvendo o termo "sólido" se faz necessária para diferenciar este processo da fermentação líquida (ou submersa) que se desenvolve em soluções diluídas, e da fermentação em "lodos" ou "lamas" que contém não mais que 5% (peso/volume) de material seco, não solúvel (MOO-YOUNG et al, 1980; PAMMENT et al, 1978; TENGERTY, 1985). O termo "semi" diferencia o processo FSS da que se observa na superfície de meios sólidos agar-nutritivos.

O teor de umidade nas FSS pode variar entre 18 e 85%, sendo que ele é estipulado em função do poder de absorção do substrato (CANNEL & MOO-YOUNG, 1980; THIEMANN, 1985). Como exemplo de uma FSS podemos citar o processo KOJI (cultura de fungos sobre arroz cozido), onde o substrato é moderadamente umedecido durante o cozimento pelo vapor (35 a 40% de água), e mantido úmido pela passagem de ar com 80 a 90% de umidade relativa, para desenvolvimento de determinados fungos na sua superfície (TAKAMINE, 1914). Para produção de metabólitos secundários por FSS, HESSELTINE (1977a, 1977b) e SILMAN et al (1979), apontaram uma umidade de apenas 18 a 30%, enquanto que para FSS com lignocelulose os níveis variaram entre 70 e 80% (ABDULLAH et al, 1985; BAJRACHARYA & MUGGETT, 1980; LAUKEVICS et al, 1984; UINER et al, 1981; VJESTRUS et al, 1981). Quando o microorganismo utilizado é uma bactéria, a umidade costuma ser

sempre superior a 60% (ARDULLAH et al, 1985; BECKORD et al, 1945; PAMMENT et al, 1978; RAMESH & LONSANE, 1987).

3.4.2. Tipos de processo

A FSS encontra ainda hoje sua principal aplicação em escala industrial, na produção de enzimas (fúngicas e bacterianas), na produção de alimentos fermentados, além dos processos de panificação, silagem e compostagem (HESSELTINE, 1965). Os diversos tipos de reatores que tem sido utilizados na condução das FSS podem ser divididos de acordo com a sua concepção, em quatro tipos fundamentais: bandeja, esteira rolante, tubular horizontal, e tubular vertical (THIEMANN, 1985).

a. Bandejas

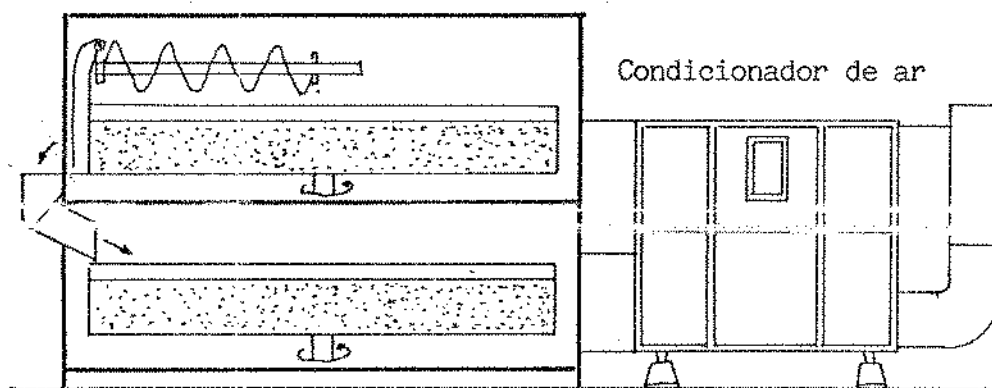
Neste processo, bandejas construídas em estruturas de madeira ou metal, de tamanhos diversos, com fundo perfurado para permitir uma adequada circulação de ar e reter as partículas do substrato, são carregadas com substrato em quantidade que gere uma camada pré fixada (geralmente 2 a 6 cm). Esse substrato é aspergido com solução de inóculo e levado a câmaras com temperatura e umidade controladas, e circulação de ar forçada geralmente com 95 a 97% de umidade (FOGARTY & WARD, 1974; THIEMANN, 1985).

Instalações deste tipo requerem um elevado número de trabalhadores, além do número de bandejas manipuladas diariamente

ser igualmente elevado, mesmo em processos mecanizados (LONSANE et al, 1985).

Em alguns casos, as bandejas podem ser giratórias além de dotadas de um agitador helicoidal. Neste caso a espessura do substrato pode chegar a 60 cm, e o processo é inteiramente automatizado. Um esquema deste tipo de fermentação está representado na FIGURA 7.

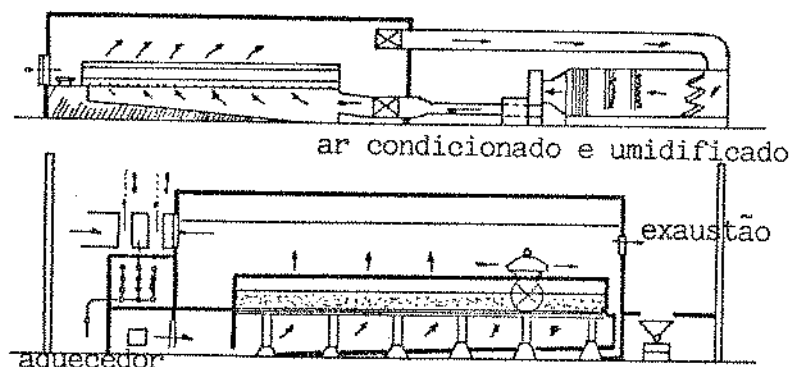
FIGURA 7. Esquema de um fermentador de bandeja rotatória com agitação. (apud THIEMANN, 1985)



b. Esteira rolante

O sistema denominado de esteira rolante, representado na FIGURA 8, é uma variante do fermentador de bandejas. Neste sistema o material esterilizado é inoculado e incubado em longas esteiras de fundo perfurado por onde circula ar úmido; a agitação ocasional é feita de acordo com as necessidades de cada produto.

FIGURA 8. Esquema de um fermentador tipo esteira rolante, para processos de fermentação semi-sólida. (apud THIEMANN, 1985)



c. Tubular horizontal

O processo tubular horizontal, também denominado tambor rotativo, é apresentado esquematicamente na FIGURA 7. Neste tipo, o substrato semi-sólido é esterilizado e resfriado diretamente no tambor (TAKAMINE, 1934). A sua movimentação ocorre pela rotação do tambor montado sobre roletes. A rotação pode variar de 1 até 1800 rotações por minuto (rpm) (LONSANE et al, 1985).

A agitação do substrato pode ser realizada por agitador central contendo número variável de pás; neste caso é denominado " fermentador tubular com agitação interna ". Seu esquema simplificado é mostrado na FIGURA 10.

FIGURA 9. Esquema de um fermentador rotativo tubular para fermentações semi-sólidas. (apud THIEMANN, 1985)

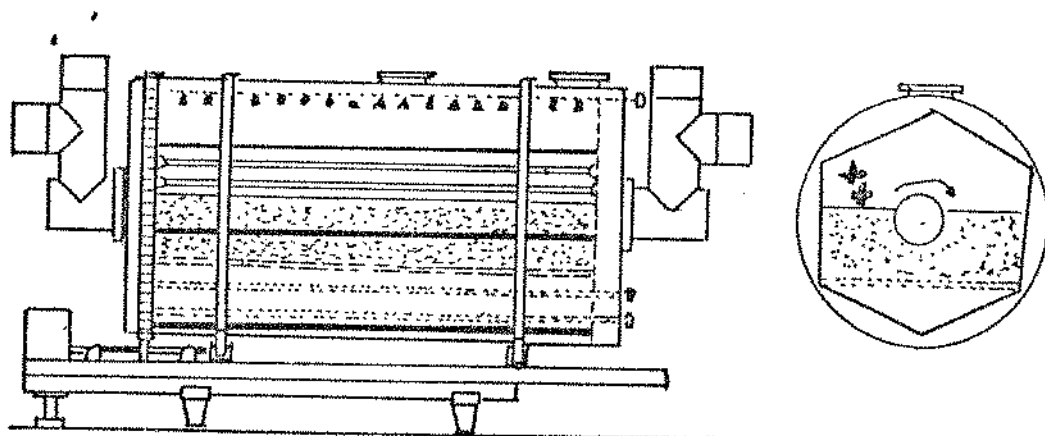
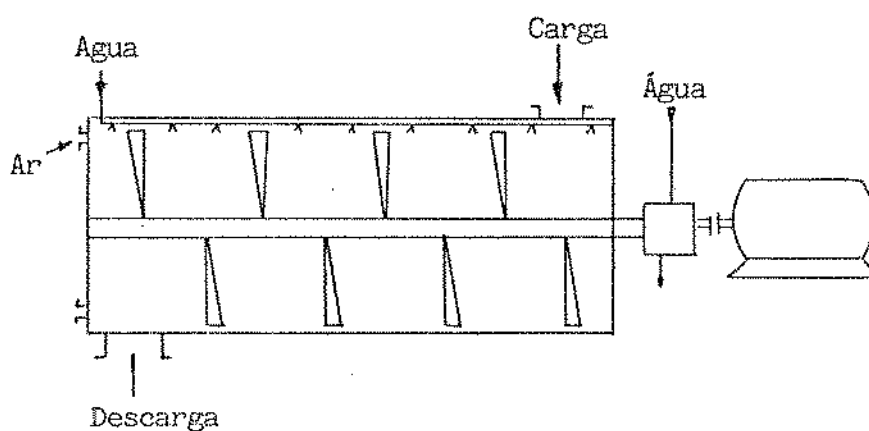


FIGURA 10. Esquema de um fermentador tubular horizontal com agitação interna. (apud THIEMANN, 1985).



A aeração se dá pela passagem de ar esterilizado e umidificação através do reator, ou pela sucção do ar interno (LONSANE et al, 1985; TAKANINE, 1944; UNDERKOFER et al, 1947).

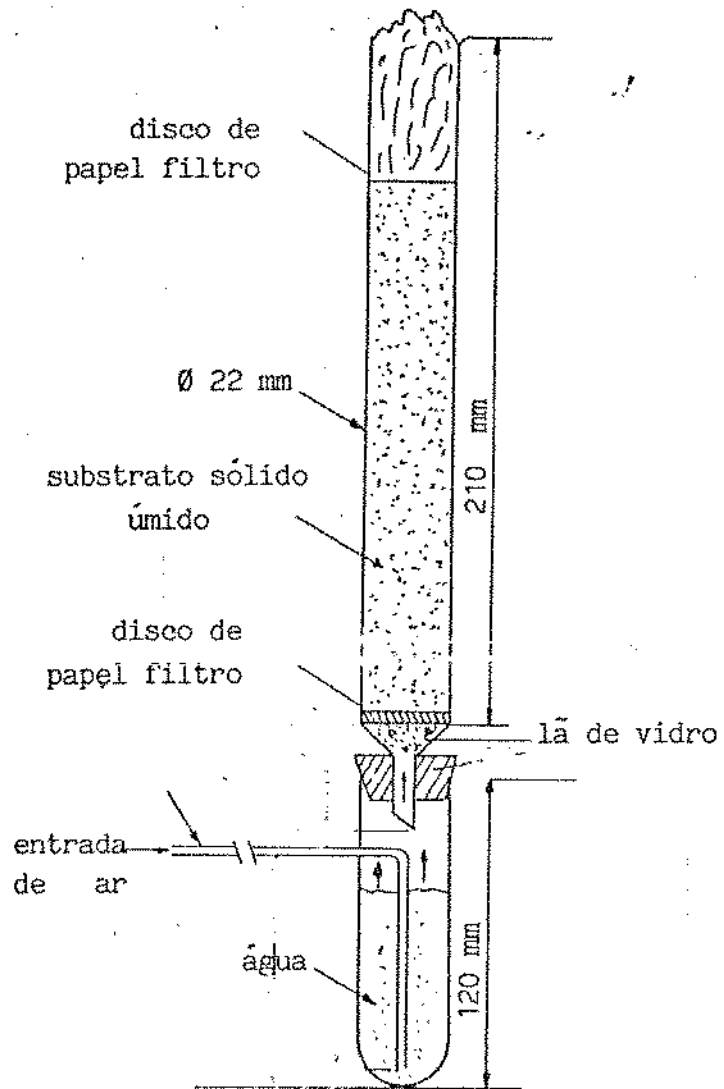
A temperatura pode ser controlada pela aspersão de água diretamente sobre a massa em fermentação ou sobre as paredes externas do tambor (THIEMANN, 1985).

Os maiores inconvenientes do sistema são: seu custo relativamente elevado para o volume de material produzido; a manutenção da integridade do micélio quando o microrganismo utilizado for um fungo; e as dificuldades de escalonamento do processo (LONSANE et al, 1985; THIEMANN, 1985).

d. Tubular vertical

Este tipo de fermentador consiste numa coluna de vidro ou plástico, contendo entradas no topo e no fundo para aeração. A temperatura é mantida ou pela conservação da coluna em uma câmara de temperatura controlada, ou pela passagem de água numa camisa de resfriamento. Um esquema simplificado deste tipo de fermentador é apresentado na FIGURA 11.

FIGURA 11. Esquema de um fermentador tubular vertical, ou de coluna (adaptado de RAIMBAULT & ALAZARD, 1980).



Este tipo de fermentador é bastante adequado para pequenas unidades ou escala de laboratório, pois requer espaço reduzido, apresentando uma relação volume total/volume útil, muito próxima de 1,0. Suas desvantagens se encontram na compactação da massa, na dificuldade de dissipação do calor em caso de aumento de escala, e na dificuldade de uniformizar a unidade quando unidades de maior volume forem utilizadas (THIEMANN, 1985).

Algumas destas concepções tem sido utilizadas e estudadas em nível de laboratório e escala piloto (LONSANE et al, 1985; TOYANA, 1976; UNDERKOFFER et al, 1946) apresentando uma série de variações mais ou menos acentuadas (NISHIO et al, 1979; PAINMENT et al, 1978; RATHRUN & SHULFR, 1983; SILMAN et al, 1979; WINDISH MHATRE, 1965).

O sistema mais simples, econômico e rápido de FSS em escala de laboratório, é o processo estático em bandejas ou frascos de vidro contendo substrato umedecido, em quantidade suficiente para formar uma camada de 1 a 4 cm de espessura. Este processo é amplamente utilizado no estudo de viabilidade do processo FSS para obtenção de diferentes produtos (AQUINO et al, 1975, 1977; BECKORD et al, 1945; BUDIATMAN & LONSANE, 1987; CHANDRASEKARAN & SHANTHMA, 1969; HALL & PAPIEROK, 1982; HAN & ANDERSON, 1975; ICHISHIMA et al, 1973; KRISHNASWAMY, 1976; KUMAR & LONSANE, 1987; LEWIS & PAPAIVIZAS, 1983; PERALOZA et al, 1985; PRELTHINARY, 1976; RAMAKRISHNA et al, 1982; SALA & BURGOS, 1972; SALAMG, 1984; SHOTWELL et al, 1966; STUBBLEFIELD et al, 1967), bem como na análise de um grande número de variáveis importantes do processo (ABDULLAH et al, 1985; ARSECULERATNE et al, 1969;

HANG & WOODAMS, 1987; HESSELTINE, 1972; KARAPINAR & WORGAN, 1983; KENNETH et al, 1979; LATGE et al, 1977; LINDENFELSER & CIEGLER, 1975; MACRIS et al, 1987; MENFZES et al, 1983; RAMESH & LONSANE, 1987; THONTIN et al, 1980; WANG et al, 1975; ZADRAZIL & BRUNNERT, 1981).

Estudos mais recentes tem explorado o sistema FSS pelo uso de suporte inerte impregnado com meio de cultura líquido (BARRIOS-BONZÁLEZ et al, 1988; LAKSHMINARAYANA et al, 1975; ORIOL et al, 1988; RAINBAULT & ALAZARD, 1980). LAKSHMINARAYANA et al (1975) utilizaram o bagaço de cana como inerte, impregnado com meio de cultura líquido, para obter ácido cítrico, através do fungo *Aspergillus niger*. Seu rendimento foi até 7 vezes superior ao observado em cultura submersa.

3.4.3. Aspectos da fermentação semi-sólida

I - Variáveis do processo

a. Substrato

A FSS se desenvolve em substratos sólidos. Os mais comumente usados são os grãos de cereais, subprodutos gerados na transformação desses grãos, substratos lignocelulósicos ou amiláceos. Todos eles são fonte natural de polímeros de carbono, são caracteristicamente insolúveis em água e possuem capacidade de promover o crescimento microbiano com ou sem acréscimo de outros nutrientes (LONSANE et al, 1985).

A seleção do substrato é crítica para o sucesso de uma FSS. Por exemplo, o trigo se mostra melhor que o arroz na produção de determinadas toxinas fúngicas, pelo fato de os grãos de trigo terem menor tendência de aderirem uns aos outros do que os grãos de arroz (HESSELTINE, 1972).

Muitas vezes emprega-se um pré-tratamento, mecânico ou químico, do substrato para:

- melhorar sua permeabilidade (HESSELTINE, 1962; HESSELTINE et al, 1968; LEWIS & PAPAVIDAS, 1983; LINDENFELSER & CIEGLER, 1975; RATHBUN & SHULER, 1983);

- destruir fatores de inibição presentes no substrato (FOGARTY, 1974);

- promover a formação de sítios de fácil ataque microbiano (HESSELTINE et al, 1968; LINDENFELSER & CIEGLER, 1975; RAINBAULT & ALAZARD, 1980; SATO et al, 1982; SRINIVASAN, 1977);

- quebrar algumas estruturas fibrosas ou de cadeia longa (CHAHAL, 1985; CHAHAL & MOO-YOUNG, 1981; HAN & ANDERSON, 1975; HESSELTINE, 1972; LAKSHMINARAYANA et al, 1975; MENEZES et al, 1983; PAMMENT et al, 1978; RAO et al, 1983);

- promover a gelatinização de amidos (CARRIZALEZ et al, 1981; HESSELTINE, 1972; MENEZES et al, 1983; PARK & RIVERA, 1982; RAINBAULT & ALAZARD, 1980);

- ou simplesmente favorecer o crescimento microbiano pela correção do pH, umidade e/ou solubilização de alguns compostos essenciais (ABDULLAH et al, 1985; ARSECULEBATNE et al, 1969; CHAHAL & MOO-YOUNG, 1981; GIBBONS et al, 1984; HESSELTINE, 1977a; KARAPINAR & WORGAN, 1983; PENALOZA et al, 1985; RAIMBAULT & ALAZARD, 1980; SHOTWELL et al, 1966; STTUBLEFIELD et al, 1967; UNDERKOFER et al, 1939; VIFSTRUS et al, 1981).

Também as alterações físicas e químicas que ocorrem com a esterilização são muito importantes, pois se assemelham a um pré-tratamento. Certos substratos, durante ou após a esterilização, formam uma massa compacta, enquanto outros formam grumos ou aderem às paredes do fermentador, prejudicando o processo fermentativo (LONSANE et al, 1985).

O pré-tratamento pode ser moderado ou drástico incluindo cozimento sob pressão, limpeza e processos abrasivos, descascamento, moagem e tratamentos com álcalis ou ácidos (ABDULLAH et al, 1985; CARRIZALEZ et al, 1981; CHAHAL, 1985; CHAHAL & MOO-YOUNG, 1981; HESSELTINE, 1972; LONSANE et al, 1985; RAIMBAULT & ALAZARD, 1980; RAO et al, 1983; ZADRAZIL & BRUNNERT, 1981).

Apesar do uso corriqueiro de certos pré-tratamentos com finalidades definidas, muito pouco se conhece sobre os fatores que regem a capacidade do microrganismo se desenvolver a partir de substâncias sólidas.

Nos últimos anos foram investigados mecanismos de utilização de substratos não permeáveis, como hidrocarbonetos

(VELANKAR et al, 1975; MODZINSKI & COYLE, 1974), celulose (BERG & PETERSON, 1977; NESSE et al, 1977), ligninas (OGLESBY et al, 1967), enxofre (BEEBE & UMBREIT, 1971), proteínas (COSTERTON et al, 1974), queratina (MARTIN & SO, 1969), quitina (STOLP & STARR, 1965) e agar (DAY & YAPHE, 1975). Apesar de terem sido estudados em condições de cultura líquida, muitos deles poderiam ser aplicados aos substratos utilizados em FSS. Segundo esses trabalhos, o estímulo ou a limitação da assimilação de substratos a partir de substâncias sólidas, pelos microrganismos, pode ser influenciado por vários fatores químicos e físicos, entre os quais: forma e tamanho das partículas; porosidade; relação massa/área superficial; amorfismos; espessura; grau de polimerização; natureza hidrofílica ou hidrofóbica; propriedades eletroquímicas e químicas (POWELL & SLATER, 1983).

Além desses fatores, há que se considerar os fatores que governam a atuação dos microrganismos sobre o substrato e produção de enzimas, facilidades de transferência de material através da interface microrganismo/substrato, hidrólise do produto, difusão das enzimas através dos sólidos, heterogeneidade da superfície do sólido, indução ou inibição da formação de produtos, entre outros (ERICSON, 1978; MAXHAM & MAIER, 1978; SUGA et al, 1975).

De forma abrangente, na literatura se observa que o crescimento é atribuído à ação de enzimas que quebram ou transformam certos componentes em formas capazes de serem permeadas para dentro das células microbianas. A porosidade e compactação do meio de cultura (definidas em SCHULZE, 1962), se

destacam como principais fatores que governam a relação substrato:microrganismo no desenrolar da FSS, sendo que a primeira garantirá a fácil troca de nutrientes e a segunda permitirá a circulação mais eficiente de oxigênio pelos espaços intersticiais (ABDULIAH et al, 1985; HESSELTINE, 1972; LAUKEVICIS et al, 1984; ORIOL et al, 1988; SATO et al, 1982; ZADRAZIL & BRUNET, 1981).

Embora entre os substratos mais utilizados destaquem-se o farelo de trigo integral e o arroz polido, justificado pelo fato de terem sido estes os materiais utilizados nas primeiras FSS, outros substratos são amplamente testados, tais como:

- milho, cevada, centeio, aveia, amendoim e soja (CAMARGO, 1983; DULMAGE & RHODES, 1971; GUAGLIUMI et al, 1974; HESSELTINE, 1972; ICHISHIMA et al, 1970; LANDERS et al, 1967; LATGÉ et al, 1977; LEWIS & PAPAVIDAS, 1983; NAGAMMA, 1972; RAMAKRISHNA et al, 1982; RAMSTACK et al, 1979; RATHBUN & SCHULER, 1983; SILMAN et al, 1979; SINGH et al, 1968; STUBBLEFIELD et al, 1967; WANG et al, 1975; WOOD, 1979);

- sementes de tamarindo, de algodão e castanhas (ARSECULERATNE et al, 1969; KARAPINAR & MORGAN, 1983; LATGÉ et al, 1977; NAGAMMA, 1972);

- batata, mandioca e suas farinhas (BECKORD et al, 1945; BUDIATMAN & LONSANE, 1987; RAIMBAULT & ALAZARD, 1980);

- palhas, folhas e restos agrícolas (CHAHAL & MOO-YOUNG, 1981; ENGLER & ROGOFF, 1980; HAN & ANDERSON, 1975; HESSELTINE, 1977a; HESSELTINE et al, 1968; MACRIS et al, 1987; RAMAKRISHINA et al, 1982; RAO et al, 1983; RETSER, 1954; VIESTRUS et al, 1981; WOOD, 1979; ZADRAZIL & BRUNNERT, 1981);

- serragem de madeira (CHAHAL, 1985; LEWIS & PAPAVIDAS, 1983; PAMMENT et al, 1978);

- dejetos animais (HESSELTINE, 1977b; LEWIS & PAPAVIDAS, 1983);

- resíduos sólidos de agroindústrias e indústrias de alimentos (AGUILLERA et al, 1983a; BARRIOS-GONZALEZ et al, 1988; BLACHERE et al, 1973; COCHET et al, 1988; COUSIN, 1980; GIBBONS et al, 1984; LAKSHIMINARAYANA et al, 1975; LEWIS & PAPAVIDAS, 1983; NIGAM & VOGEL, 1986; ORIOL et al, 1986; PENALOZA et al, 1985; RAO et al, 1983; SATO et al, 1982);

Todos estes substratos foram testados principalmente nos últimos 20 anos, sendo que nos últimos 10 anos observou-se uma tendência clara em estudar resíduos e subprodutos agrícolas ou industriais, que provocam problemas ambientais ao serem descartados (MORAES & CAPALBO, 1986c).

De qualquer forma que se encare a utilização dos substratos para o processo FSS, tanto pela forma adequada com que se apresenta na obtenção de um determinado produto, como pelo aproveitamento de seu potencial energético como componente

importante no combate à poluição, ou por ambos, o processo FSS ganhou novo impulso e amplo reconhecimento nos últimos 10 anos, e suas vantagens tem sido reconhecidas em todo o mundo por muitos dos autores citados.

b. Umidade

O conteúdo de umidade do substrato é um dos fatores fundamentais no desempenho da FSS, e seu valor será estabelecido pela natureza do substrato, tipo do produto final desejado e necessidades do microrganismo (ABDULLAH et al, 1985; LAUKEVICS et al, 1984; LONSANE et al, 1985; THIEMANN, 1985; VEZINA et al, 1968).

WANG et al (1975) em seu trabalho, mostraram a variação observada no desenvolvimento do fungo *Rhizopus oligosporus*, de acordo com o tipo de substrato utilizado e seu conteúdo de umidade, conforme se pode observar pela TABELA 3.

TABELA 3. Produção de esporos de *Rhizopus oligosporus* sobre diferentes substratos em três níveis de umidade (apud WANG et al, 1975).

Substrato	Substrato:água (peso/volume)	Umidade (%)*	Esporos viáveis/g **
Arroz	10:4	31	6,82
	10:6	40	8,03
	10:8	47	7,86
Trigo	10:4	34	6,70
	10:6	43	5,30
	10:8	50	5,30
Trigo integral	10:4	32	5,70
	10:6	40	6,95
	10:8	49	7,00
Soja	10:4	33	5,00
	10:6	39	5,70
	10:8	48	6,48

(*) - umidade do substrato determinada por secagem a 110 C/ 24 horas.

(**) - contagem expressa em logaritmo das contagens numéricas/grama de preparação congelada.

Sendo a umidade um fator limitante na FSS (ao contrário da fermentação submersa, onde a disponibilidade é ilimitada), o seu controle dentro de uma faixa constante e relativamente restrita, é essencial. Assim, umidade em excesso compacta o substrato, diminuindo a disponibilidade de oxigênio e dificultando a dissipação do calor, ao mesmo tempo que favorece a anaerobiose (HESSLETTINE, 1977b; LAUKVICIS et al, 1984; SILMAN et al, 1979; ZADRAZIL & BRUNNERT, 1981). A baixa umidificação por sua vez, inibe o crescimento e a atividade enzimática, além de prejudicar a disponibilidade de nutrientes (ABDULLAH et al, 1985; HANG & WOODAMS, 1987; IONSANE et al, 1985; SATO et al, 1982; THIEMANN,

1985; WANG et al, 1975; ZADRAZIL & BRUNNERT, 1981).

A definição do processo FSS prevê a não existência de água livre presente, entretanto esse assunto deve ser discutido com maior intensidade. A capacidade de retenção de água para diferentes substratos e as propriedades físico-químicas da água ligada foram examinadas por alguns autores, e LAUKEVICS et al (1984) mostraram em seu trabalho com FSS, que a presença de água livre é inevitável, apesar da umidade do substrato ser mantida muito próxima a 70%. Estes autores citaram ainda que a fase líquida pode desaparecer, mas a água livre poderá permanecer, o que compromete a definição geral de FSS. No desenvolvimento de uma FSS, deve-se lembrar que a capacidade de adsorção de água do substrato varia de uma forma complexa. Uma vez que a massa de substrato diminui pela ação dos microrganismos, a atividade de água se altera devido à exaustão de nutrientes; a mudança na constituição química do substrato implica na alteração de sua área superficial. Essas modificações são acompanhadas por um aumento da biomassa (que se caracteriza por um alto conteúdo de umidade), e por um aumento na quantidade de água presente (devido à formação de água que acompanha o crescimento microbiano) (DAVIS & SMITH, 1977; HESSELTINE, 1977b; LAUKEVICS et al, 1984; ORIOL et al, 1988). A umidade relativa do material, que inicialmente estava entre 30 e 80%, irá variar devido à evaporação e à atividade metabólica (NISHIO et al, 1979; SATO et al, 1982; ZADRAZIL & BRUNNERT, 1981). Para compensar essas variações da forma mais uniforme possível, os autores sugerem manter a umidade relativa do ar em valores elevados nas primeiras fases do processo, e gradativamente diminuí-la, com o desenrolar da

fermentação (DUIMAGE & RHODES, 1971; NESSELTINE, 1972; LONSANF et al, 1984; SATO et al, 1982; TAKAMINE, 1914; THIEMANN, 1985; WINDISH & MHATRE, 1965).

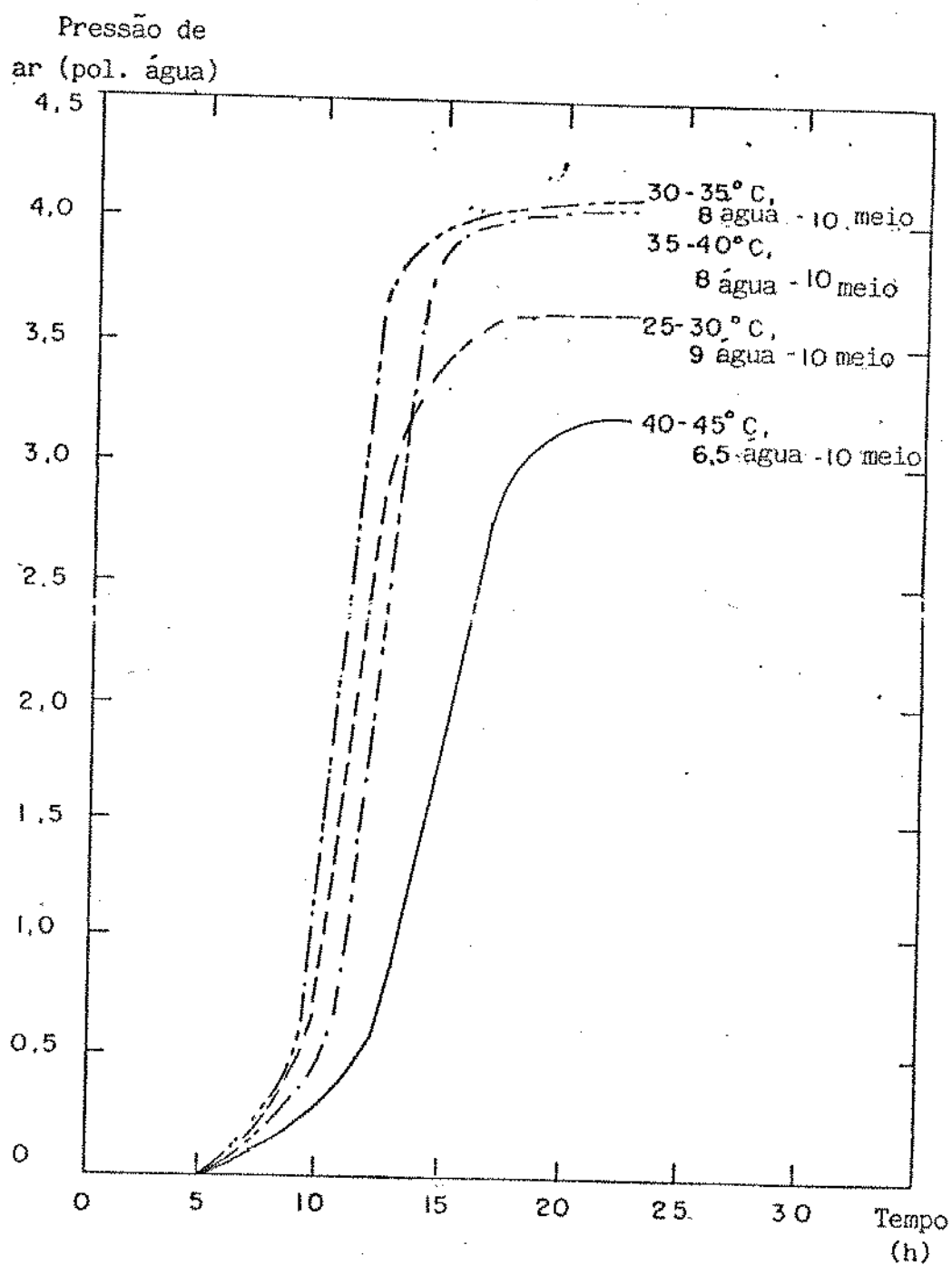
Nos casos em que o nível de umidade da FSS estiver acima do nível de equilíbrio da saturação da água, o controle de umidade através da umidade relativa do ar fornecido, não será eficiente, fazendo-se necessária a adição de água ao meio de cultura (ABDULLAH et al, 1985).

c. Temperatura

A FSS se caracteriza pela dificuldade de trocas térmicas com o ambiente devido à natureza sólida de seus substratos. O calor gerado durante a FSS, decorrente da atividade metabólica dos microrganismos, pode atingir valores até 14 960 Btu/kg de matéria seca (LAUKEVICS et al, 1984) ou 1,6 Btu/h/2kg de matéria úmida (GHILDYAL et al, 1981), dependendo da espessura da camada de meio sendo fermentado. Esse calor precisa ser dissipado rapidamente, pois temperaturas elevadas costumam inibir o crescimento microbiano e conseqüentemente a formação do produto final desejado (GHILDYAL et al, 1981; NORTHOLT & BULLERMAN, 1982). A dissipação natural deste calor se dá através da evaporação da água presente no meio (THIEMANN, 1985) e portanto a temperatura e umidade serão variáveis dependentes (LANDERS et al, 1967; UNDERKOFER et al, 1947). A influência da temperatura e da umidade sobre o desenvolvimento de fungos amilolíticos, em processo FSS de bandejas, utilizando trigo ou malte como

substrato, é bem representada pelos resultados de UNDERKOFER et al (1947) reproduzidas na FIGURA 12.

FIGURA 12. Influência da temperatura sobre o crescimento fúngico (apud UNDERKOFER et al, 1947).



Para remover este calor e manter temperatura e umidade adequadas à fermentação, são sugeridos diversos processos, por diferentes autores (HESSELTINE, 1972; ICHISHIMA et al, 1973; LATGE, 1977; LAUKEVICS et al, 1984; THIEMANN, 1985). Entre eles, destacam-se a passagem forçada de grandes quantidades de ar através do fermentador (GHILDYAL et al, 1981; RAMAKRISHNA et al, 1982; SATO et al, 1982), resfriamento da superfície externa do fermentador com água (SILMAN et al, 1979; WINDISH & MHATRE, 1965), a manutenção do fermentador em câmara de temperatura controlada (BARACHARYA & MUDGETT, 1980; GHILDYAL et al, 1981; HALL et al, 1971; YONG & WOOD, 1986), a utilização de fermentador com camisa para circulação de água fria (HALL et al, 1971), e a utilização de um banho de temperatura controlada para submergir o fermentador (BARRIOS-GONZALEZ et al, 1988; CARRIZALEZ et al, 1988; NISHIO et al, 1979).

d. pH

Conforme vários autores, apesar do pH ser parâmetro crítico no desenvolvimento das FSS como nas fermentações submersas, o monitoramento e controle do pH não costuma ser realizado. Características intrínsecas ao processo, dificultam essa operação, tais como:

- fermentadores sem agitação não permitem amostragem homogênea;

- a formação de aglomerados de microrganismos provoca variações locais ou pontuais de pH;

- a análise do pH de substratos sólidos não pode ser realizada pela simples inserção do eletrodo no meio de fermentação, exigindo leitura em suspensão, que só poderá ser realizada em separado.

Em alguns casos, a capacidade tamponante de alguns substratos utilizados para FSS torna desnecessária a correção do pH durante a fermentação. Essa característica pode ser potencializada, umidificando-se o substrato com soluções de boa capacidade tamponante (LONSANE et al, 1985; THIEMANN, 1985), ou compondo o meio de cultura com alguns sais que ajustem o pH ao valor desejado (LONSANE et al, 1985; RAIMBAULT & ALAZARD, 1989).

O controle eficiente do pH durante uma FSS depende, assim, antes de tudo, de um cuidadoso estudo da composição do meio de cultura, de forma a obter o efeito tamponante mais eficiente e adequado ao processo em estudo (THIEMANN, 1985).

e. Aeração e transferência de oxigênio

Nos processos FSS (com exceção da compostagem e fermentação de uns poucos alimentos), a presença de oxigênio é indispensável, e a aeração do material é normalmente realizada através da passagem de ar esterilizado, sob pressão (o que garante uma pequena pressão positiva no interior do fermentador) (WINDISH & MHATRE, 1965). A vazão de ar recomendada é definida

pela natureza do microrganismo utilizado, pelas exigências de oxigênio para a síntese do produto, pela quantidade de calor metabólico a ser dissipada, pela espessura da camada de substrato sendo fermentado, pelo volume de metabólitos voláteis a ser eliminado, e pela quantidade de espaços intersticiais presentes no meio de cultura (LANDERS et al, 1967; THIEMANN, 1985). Como exemplos podemos citar a produção de aflatoxina e a de invertase, em que altas vazões de ar são indispensáveis (SILMAN, 1980; SILMAN et al, 1979) sendo entretanto estas altas vazões, inibidoras de produção de outros metabólitos (LATGE et al, 1977; LINDENFELSER & CIEGLER, 1975).

SILMAN et al (1979) estudando a fermentação de *Aspergillus flavus* observaram que uma redução no fluxo de ar diminuiu a produção de metabólitos desejáveis, provocando ao mesmo tempo um aumento na concentração de gás carbônico. Essa observação é um aspecto importante, posto que a quantidade de metabólitos voláteis presentes nas camadas superficiais do substrato em fermentação, muitas vezes afetam a formação do produto desejado e prejudicam a reprodutibilidade dos experimentos (BAJRACHARYA & HUDGETT, 1980; ILAG & CURTIS, 1948; LONSANE et al, 1985; VEZINA et al, 1968).

Alguns outros relatos incluem a relação linear entre a demanda de oxigênio, a velocidade de crescimento e a umidade inicial, e a relação entre a quantidade de gás carbônico formado e a velocidade de fermentação (ABDULLAH et al, 1985; BAJRACHARYA & HUDGETT, 1980; LONSANE et al, 1985; NISHIO et al, 1979; RATHBAULT & ALAZARD, 1980; RAMSTOCK et al, 1979; RATHBUN &

SHULER, 1983; SATO et al, 1982).

Para controlar a atmosfera gasosa no interior dos fermentadores para meios semi-sólidos, são geralmente empregados alguns artifícios, como a troca completa dos gases a intervalos de tempo determinados ou a inversão da direção do fluxo de ar (UNDERKOFER et al, 1947). A demanda de oxigênio durante uma FSS pode ser verificada através de cromatografia gasosa dos gases na superfície do material sendo fermentado, ou por analisador específico (BAJRACHARYA & MUDGETT, 1980; LONSANE et al, 1985; RAMSTACK et al, 1979).

Apesar de haver alguns estudos sobre a influência do oxigênio nas FSS, muito pouca informação pode ser encontrada sobre o mecanismo de transferência do oxigênio. Presume-se que o processo seja similar ao que ocorre nas fermentações de hidrocarbonetos, ocorrendo portanto essencialmente na fase gasosa, sendo mínima a contribuição do oxigênio dissolvido na solução que umidifica o substrato (LONSANE et al, 1985; THIEMANN, 1985).

Alguns poucos trabalhos descrevem fatores que atuam como barreiras à transferência de oxigênio na FSS, tais como o crescimento de microrganismos na forma de película sobre o substrato, a formação de aglomerados compactos devido ao crescimento intenso de fungos ou devido à grande espessura de material no fermentador, a presença de água em excesso, e uso de substratos constituídos de partículas muito pequenas (LONSANE et al, 1985; RAIMBAULT & ALAZARD, 1980).

Em outros estudos são descritas algumas formas de se promover o livre movimento de ar, permitindo uma melhor transferência de oxigênio, tais como: corrigir a granulometria do substrato, utilizando de preferência substrato poroso, granulado ou fibroso; empregar espessura reduzida de substrato; aumentar os espaços intersticiais; utilizar fundo perfurado nas bandejas para facilitar circulação de gases; e em alguns casos é sugerido o uso de agitação do meio de cultura (HESSELTINE, 1972; LATGE, 1977; LONSANE et al, 1985; TAKAMINE, 1914; THIEMANN, 1985; UNDERKOFFER et al, 1947).

Quanto ao aspecto econômico das necessidades de aeração das FSS, RAIMBAULT (1987) afirmou que o consumo de oxigênio nas fermentações submersas é 4 a 5 vezes superior às da FSS.

f. Agitação

A intensidade de agitação nas FSS é definida pelos mesmos fatores que governam as necessidades de aeração (LONSANE et al, 1985).

A movimentação da massa sendo fermentada costuma ser lenta, descontínua e de curta duração, seja pela fragilidade relativa da parede celular dos microrganismos, seja pela característica quase sempre abrasiva do material (RATHBUN & SHULER, 1989; SILMAN, 1980; THIEMANN, 1985). HESSELTINE (1977a) e LINDENFELSER & CIEGLER (1975) mostraram que aumentando a velocidade de agitação de um fermentador rotativo, por eles desenvolvido, aumenta o rendimento de certos metabólitos

fúngicos, porém aumenta igualmente o tempo de fermentação.

Segundo HESSELTINE (1977a), LATGE (1977) e TAKAMINE (1914), a agitação periódica do substrato na FSS tem vários aspectos benéficos, tais como: promover a homogeneização do substrato; auxiliar o crescimento do microrganismo sobre partículas distintas do substrato; prevenir a formação de agregados; expor as partículas do substrato à atmosfera do fermentador, auxiliando na transferência de gases; facilitar a troca de calor; prevenir alterações localizadas; acelerar o crescimento; e distribuir uniformemente o inóculo.

WINDISH & MHATRE (1965) citam dentre as desvantagens, principalmente a formação de aglomerados quando a agitação é em tambor rotativo.

II . Acompanhamento do processo

O crescimento microbiano é o resultado das interações do microrganismo com seu ambiente. Essa interação é dirigida por leis da termodinâmica, energia e massa, como também pelas condições do ambiente, tais como temperatura, pH, pressão osmótica e outros (CARRIZALEZ et al, 1981). O controle de fatores ambientais não é simples, principalmente se não houver homogeneidade da mistura do microrganismo com o substrato e o oxigênio.

A avaliação e acompanhamento do crescimento microbiano nas FSS é trabalhosa, além de ser dificultada, em alguns casos,

pela impossibilidade de se separar o microrganismo do substrato residual. Na avaliação do crescimento microbiano nas FSS, utiliza-se método indireto, como extração alcalina da proteína micelial (para fungos em substrato celulósico), estimativa do ATP ou da glucosamina, contagem em placas das amostras suspensas em água, contagem em filtros apropriados, determinação de enzimas específicas, e determinações de liberação de gases, como o gás carbônico (AIDOO et al, 1981; BORZANI et al, 1972; CARRIZALEZ et al, 1981; HAN & ANDERSON, 1975; LONSANE et al, 1985; MANFREDINI & WANG, 1972; NISHIO et al, 1979; RAMSTACK et al, 1979; RATHBUN & SHULER, 1983).

Como a FSS é historicamente utilizada no crescimento de fungos, muitas características de crescimento desses microrganismos já foram estudadas, e estão bem definidas. UNDERKOFFLER et al (1947) afirmam que numa FSS com fungos, os esporos germinarão nas primeiras 3 a 4 horas, a temperatura irá aumentando gradualmente a partir da 5a - 6a hora de fermentação, devido ao metabolismo microbiano, e o desenvolvimento metabólico intenso permanecerá pelas próximas 20 horas, seguido de uma fase estacionária e posterior declínio.

III. Vantagens e desvantagens

O processo FSS apresenta algumas vantagens sobre a fermentação submersa em fermentadores convencionais, que costumam ser descritas, segundo CANNEL & MOO-YOUNG (1980), HESSELTINE (1977a, 1977b, 1981) e THIEMANN (1985), como sendo:

- o meio de cultura é relativamente simples, uma vez que apenas um substrato acrescido de água, se faz necessário;

- o espaço necessário para o equipamento de fermentação é relativamente pequeno se comparado com o rendimento obtido neste tipo de fermentação; isso porque pouca água é utilizada em relação à fermentação submersa;

- a complexidade do equipamento não é maior do que na fermentação líquida, podendo inclusive ser menor;

- condições de crescimento do microrganismo são muito semelhantes àsquelas sob as quais ele se desenvolve na natureza;

- o substrato já fermentado pode ser colocado em sacos plásticos e armazenado em freezer sem necessidade de estocar grandes volumes de líquido ou manter grandes tanques de retenção;

- não há líquidos residuais como na fermentação submersa, reduzindo portanto os problemas de poluição;

- aeração é obtida de forma simples, pois existem espaços de ar entre cada partícula de substrato;

- uma vez que o produto está concentrado no substrato sólido, este pode ser seco e estocado a custos menores, pois menos umidade deverá ser removida.

Entretanto, os mesmos autores ressaltam alguns problemas, como:

- a linhagem do microrganismo deve ser escolhida de forma que esta esteja apta a produzir seus metabólitos em condições de FSS;

- em pequena escala não se observam problemas de controle de temperatura, porém com grandes volumes de trabalho, o controle do calor gerado pode se tornar um problema;

- equipamentos de controle (para determinar umidade, pH, produção do metabólito, etc.) precisam ser estudados e desenvolvidos, uma vez que esses parâmetros não podem ser medidos diretamente no fermentador;

- muitas vezes o substrato requer um pré-tratamento, e este deve ser considerado economicamente; geralmente ele precisa ser picado ou reduzido a partículas pequenas; entretanto a formação de pó deve ser evitada;

- a quantidade de inóculo necessária para uso em grandes massas de substrato pode ser problemática;

- a adição de água, soluções ou gases úmidos, durante a fermentação, para manutenção da umidade pode oferecer chances de introdução de contaminantes, principalmente quando o microrganismo utilizado na fermentação for uma bactéria.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Microrganismo

O microrganismo utilizado para todos os ensaios, foi *Bacillus thuringiensis* mantido em estoque no Laboratório de Biotecnologia da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas sob o código BtL. Este microrganismo foi mantido em tubo inclinado contendo agar nutriente, submerso em óleo mineral. Uma alçada foi retirada deste estoque, e repicada para novo tubo de agar nutriente, incubado a 30°C por 48 horas, e mantida a seguir em câmara fria (5-8°C) até ser utilizada.

Foram efetuadas repicagens a cada 40 dias ou quando necessário.

4.2. Inóculo

O meio de cultura utilizado para gerar o inóculo será aqui denominado "meio de pré-fermentação". Sua composição, descrita em MORAES (1976), é apresentada na TABELA 4.

TABELA 4. Composição do meio de cultura de pré-fermentação.

COMPOSIÇÃO	g / l
Na HPO ₂ 4	2,5
NaCl	5,0
Glicose	2,0
Triptose	20,0

pH = 7,3

Colocou-se 100 ml do meio de pré-fermentação em cada um dos seis frascos erlenmeyer de 500 ml de capacidade, fechados com tampão de algodão, e esterilizados a 121 °C por 15 minutos. Após resfriamento à temperatura ambiente, cada frasco era inoculado com uma alçada de Bt mantido nos tubos inclinados.

O frasco inoculado foi levado a agitador incubador com circulação de ar forçada, mantido a 30 °C, com agitação de 150 rpm durante 10 a 12 horas. Esse período foi detectado em ensaios preliminares, como sendo adequado para que as culturas não estivessem esporulando, minimizando assim a fase "lag" do início da etapa de fermentação semi-sólida, conforme descrito por PEARSON & WARD (1987). Ao final da incubação foi feita avaliação do número total de bactérias em câmara de Neubauer, ao microscópio. Segundo a média obtida em pelo menos três repetições de leitura, foram realizadas as diluições necessárias

para se atingir entre $4,6$ e $6,8 \times 10^8$ células bacterianas /ml. Essa diluição foi então utilizada como inóculo dos frascos de fermentação semi-sólida. Esse valor elevado de células no inóculo foi estabelecido, baseado nos comentários de ABDULLAH et al (1985), de que a concentração de células deve ser suficientemente grande para que os microrganismos estejam aptos a colonizar a maior parte das partículas do substrato; entretanto essa concentração não pode ser excessiva, para não causar competição pelo suprimento limitado de nutrientes.

4.3. Substratos

A seleção de substratos sólidos para realização da FSS com Bt exigiu uma busca na literatura sobre tipos de resíduos ou subprodutos gerados na agricultura, indústrias e agroindústrias. A forma como foi conduzida esta etapa do trabalho, bem como os resultados nela alcançados, estão relatados no APÊNDICE 1.

Os substratos testados são apresentados na TABELA 5. Dos diversos substratos sólidos, cinco deles (resíduo de indústria de papel e celulose, farinha de vísceras, farinha de penas, farelo malte e farelo de bolachas e doces) foram selecionados considerando:

- facilidade de obtenção na região de Campinas;
- terem se destacado pelo baixo custo ou por serem subprodutos destinados ao descarte, sem qualquer outro aproveitamento;

- a quantidade gerada diariamente pela indústria;
- a pouca variabilidade de composição (segundo informação obtida junto ao produtor ou na literatura consultada).

Outros dois substratos (resíduo de indústria de sabões, e suplemento mineral) foram incluídos nos trabalhos pelo interesse demonstrado pelas indústrias geradoras, no seu aproveitamento ou transformação; sua inclusão foi efetivada baseada em informações fornecidas pelas indústrias.

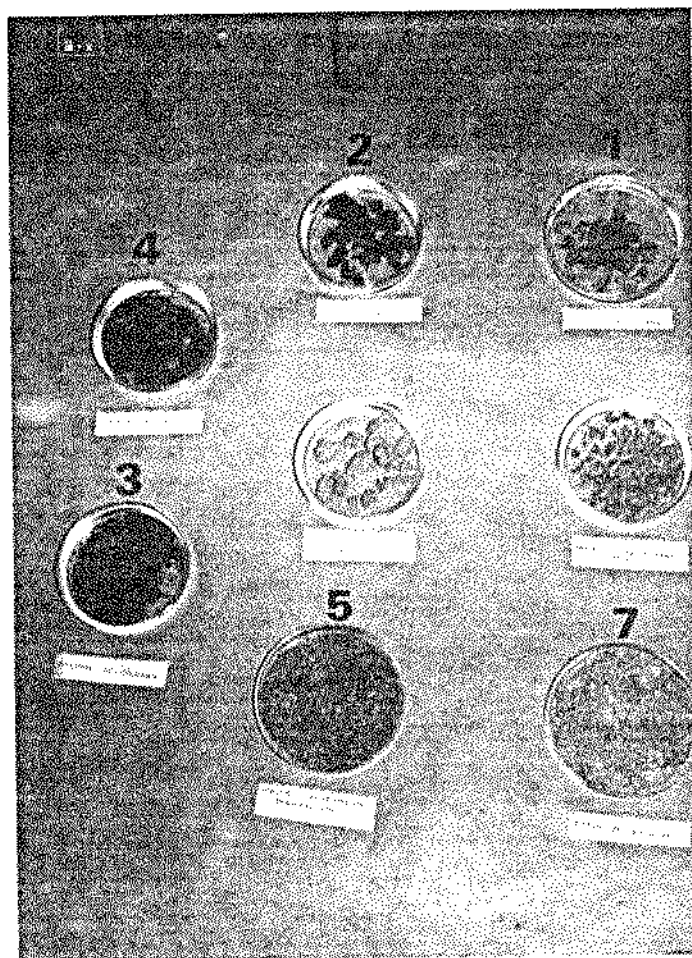
A água de côco foi utilizada apenas em uma parte deste trabalho. Tal substrato já tinha sido usado em trabalhos anteriores, em fermentação submersa com Bt (FERNÁNDEZ et al, 1975; MORAES E CAPALBO, 1986). As indústrias geradoras desse subproduto estão localizadas principalmente na região nordeste, entretanto, foi possível coletá-la em Campinas, quando o Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) realizava ensaios de processamento deste fruto. Pela oportunidade única oferecida, este material foi coletado, filtrado e armazenado em freezer para utilização nos ensaios de FSS, como complemento do meio de cultura.

TABELA 5. Substratos testados como componentes de meio de cultura semi-sólido, para obtenção de esporos de *Bacillus thuringiensis*.

Nº.	DESCRIÇÃO	ORIGEM	ASPECTO NA COLETA
1	Resíduo sólido de indústria de sabões	Indústria Gessy-Lever (Valinhos)	Grânulos grandes, úmidos e compactos; odor: acre.
2	Resíduo sólido de indústria de papel e celulose	Indústria Champion (Mogi-Guaçu)	Pasta grossa, bem úmida; odor: fraco e típico.
3	Farinha de vísceras	Abatedouro de aves Cargil (Jaguariúna)	Farinha grossa e solta; odor: fraco e típico.
4	Farinha de penas	Abatedouro de aves Cargil (Jaguariúna)	Farinha grossa e solta; odor: fraco e típico.
5	Farelo de malte prensado	Cervejarias Reunidas Skol/Caracu (Rio Claro)	Farelo úmido; odor: típico de fermento;
5B	Farelo de malte decantado	Cervejaria Antártica (Campinas)	Farelo úmido; odor: cereais.
6	Suplemento mineral	Indústrias Fermisa S.A. (Vitória/ES)	Pó fino; odor: ---
7	Farelo de bolachas e doces	Indústria de Biscoitos e Doces Campineira (Campinas)	Pedaços e farelos de bolachas (doces e salgadas), de doces e balas; odor: agradável e doce.
8	Água de rão	ITAI (Campinas)	Turva, com pedaços de casca da fruta; odor: agradável.

O aspecto dos resíduos e subprodutos sólidos utilizados nos experimentos de fermentação semi-sólida, podem ser observados na FOTO 1.

FOTO 1. Aspectos dos resíduos e subprodutos sólidos testados como substrato para fermentação semi-sólida de *Bacillus thuringiensis*. (Olueração correspondente à da TABELA 5).



4.4. Meios de cultura semi-sólidos

O processo estático, em frascos de vidro (erlenmeyer, 250 ml de capacidade) fechados com tampão de algodão, foi o processo utilizado para realizar os testes de FSS com Bt.

Tendo em vista o fato de os materiais possuírem diferentes granulometrias, e sendo objetivo do trabalho evitar ao máximo alterar as características físicas de cada um deles, foram realizados testes preliminares para estabelecer a quantidade de material a ser utilizada em cada frasco. A camada de substrato deveria ser suficiente para garantir uma espessura de não menos que 1,0 cm e não mais de 2,0 cm, exceção feita aos suplemento mineral e água de côco, que foram utilizados como complemento nas etapas posteriores.

Ficou determinado que 10 g seriam suficientes para garantir um volume de meio adequado para todos os substratos em teste. A utilização de uma massa fixa ao invés de um volume fixo simplificou bastante a metodologia de preparo do meio de cultura e a avaliação dos parâmetros durante a fermentação.

Devido à variabilidade de composição dos diferentes substratos, principalmente quanto às fontes de açúcares fermentescíveis, decidiu-se estabelecer a adição de glicose ao meio, para que o crescimento de Bt não fosse limitado pela glicose. Esta adição foi definida seguindo a proporcionalidade utilizada por DULMAGE & RHODES (1971), apresentada na TABELA 7.

TABELA 7. Composição do meio semi-sólido para fermentação de *Bacillus thuringiensis*, descrita por DULMAGE & RHODES (1971).

COMPONENTE	gramas
farelo de trigo	545
farinha de soja	62
perlite expandida	380
dextrose	36
cal	3,6
NaCl	0,9
CaCl ₂	0,29
água	160 ml

Com base nesses dados, ficou estabelecida a adição de solução de glicose 22,5%.

Foram realizados alguns ensaios preliminares utilizando-se diferentes níveis de adição de água (5, 10, 20 e 25 ml) a cada 10 g dos diferentes substratos, cujos resultados estão apresentados na TABELA 8. Os níveis de adição foram baseados em trabalhos onde se efetuou o crescimento de Bt ou outra bactéria, em processo FSS (BECKORD et al, 1945; DULMAGE & RHODES, 1971).

TABELA 8. Observação qualitativa do efeito do nível de adição de água sobre as características dos diferentes substratos.

Substrato	Características					
	antes da esterilização			após esterilização		
Número (a)	(b) Nível de umidificação					
	5ml	10ml	20ml	25ml	10ml	
1	o	+	*	*	**	
2	o	++	+	*	++	
3	+	+	-	*	+	
4	+	+	-	*	+	
5	o	++	++	-	++	
7	o	+	+	*	+	

a - Numeração correspondente à da TABELA 5.

b - Quantidade de água de torneira adicionada a 10g de substrato.

o - Aspecto seco ou não suficientemente umedecido.

+

++ - Aspecto úmido, uniforme, sem formação de aglomerados.

- - Aspecto pastoso

* - Presença de duas fases distintas: sólido e água.

** - Endurecido, muito difícil homogeneinização.

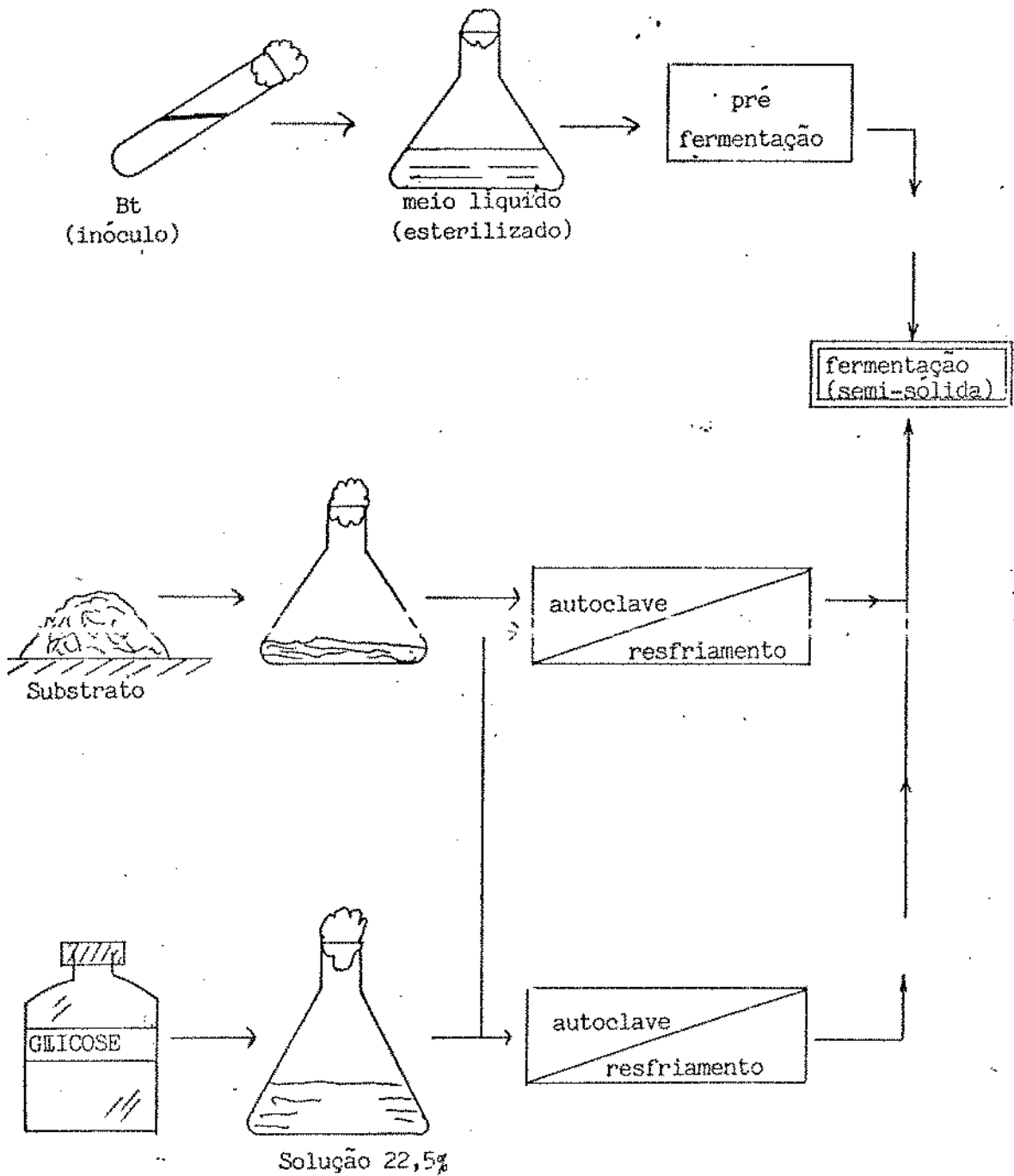
Pode-se observar na TABELA 8, que volumes superiores a 10 ml promoveram a formação de pastas. Nestes casos os substratos eram constituídos por partículas mais finas. Volumes inferiores a 10 ml deixavam alguns substratos com aspecto seco, e portanto com características inadequadas ao crescimento bacteriano. Baseados nestas observações foi fixada a adição de 10 ml de água ou outra solução a cada 10g de substrato.

Segundo a proporcionalidade sugerida em DULMAGE & RHODES (1971), utiliza-se cerca de 4,0 ml de inóculo/ 10 g de substrato úmido, entretanto a concentração celular no inóculo não foi fornecida. Para definir então o volume de inóculo a ser empregado, foi utilizado um caminho indireto. DULMAGE & RHODES (1971) sugerem a adição de aproximadamente 0,6 g de glicose/ 10g de substrato seco (ver TABELA 7), então deveremos utilizar 2,7 ml de solução de glicose 22,5% para atingir tal valor.

Resta completar os 10 ml previstos, na forma de inóculo.

Definida a composição básica dos meios de cultura semi-sólidos, o processo FSS utilizado durante a execução dos trabalhos, seguiu o fluxograma apresentado na FIGURA 13.

FIGURA 13. Fluxograma simplificado das etapas incluídas no preparo do meio de cultura semi-sólido utilizado nos experimentos.



Pelo fato dos subprodutos apresentarem uma alta carga microbiana contaminante, devido à sua origem e manipulação, foi estudado se a autoclavagem usualmente realizada no laboratório (121 C / 15 minutos) era suficiente para destruir essa população. Pelo menos duas amostras de cada subproduto em estudo, tiveram sua carga microbiana avaliada antes e após tratamento térmico, conforme metodologia descrita no item 4.7.

As contagens microbianas totais (sem aquecimento da suspensão de 10g da amostra em 100 ml de água) foram iguais ou superiores a 10^{10} UFC/ml (unidades formadoras de colônia/ml), sendo que as contagens de esporos ou unidades termorresistentes (suspensão submetida a choque térmico) foram sempre iguais ou inferiores a 100 UFC/ml. As contagens efetuadas após tratamento térmico (121 C / 15 minutos), foram sempre inferiores a 10^0 UFC/ml, que se considerou suficiente.

Desta forma, durante os trabalhos realizados, os substratos foram submetidos a autoclavagem por 15 minutos a 121°C.

Além da utilização de cada substrato como componente único do meio de cultura, foi também utilizada a combinação de dois ou mais substratos. As combinações testadas (designadas por letras maiúsculas), bem como a proporção de seus componentes, estão apresentadas na TABELA 9.

TABELA 9. Combinação de substratos, utilizada para compor o meio de cultura da fermentação semi-sólida para esporulação de *Bacillus thuringiensis*.

Combinação testada	Substratos utilizados *	Relação entre componentes
A	2 e 7	1:1
B	2, 7 e 6	1:1:0,02
C	2, 7 e 6	1:1:0,04
D	5, 7 e 6	1:1:0,02
E	5, 7 e 6	1:1:0,04
F	4 e 7	1:1
G	2 e 3	1:1
H	2 e 4	1:1
I	2 e 5	1:1
J	3 e 4	1:1
L	3 e 5	1:1
M	3 e 7	1:1
N	4 e 5	1:1

* - os números correspondem aos apresentados na TABELA 5, onde:

Substrato 2	= resíduo de indústria de papel e celulose;
Substrato 3	= farinha de vidoeira;
Substrato 4	= farinha de penas;
Substrato 5	= farelo de malte;
Substrato 6	= suplemento mineral;
Substrato 7	= farelo de bolachas e doces.

4.5. Condições de crescimento

Cinquenta frascos de 250 ml, contendo o mesmo substrato, foram inoculados e incubados após esterilização. Uma boa agitação manual dos mesmos foi realizada após adição de solução de glicose e do inóculo, de forma a garantir uma distribuição uniforme destes sobre as partículas do meio de cultura.

A incubação se realizou a 30^o C, e todos os frascos foram mantidos estáticos durante o período de fermentação. Uma vez ao dia eles eram agitados manualmente (ou com o auxílio de uma espátula, assepticamente, quando necessário) para evitar formação de aglomerados ou que houvesse adesão das partículas às paredes dos frascos. A cada 24 horas, pelo menos 2 frascos foram retirados e submetidos às análises para acompanhamento do processo (item 4.7).

As adições de água ou outra solução, testadas em alguns experimentos foram realizadas em condições assépticas, sendo cada adição acompanhada de agitação manual do frasco para melhor distribuição do meio. Foram testados três níveis de adição de água esterilizada (1, 2 e 3 ml) por frasco de 250 ml, a cada 48 horas. A adição de água foi realizada sempre após a retirada de amostra do respectivo frasco.

4.6. Variação de escala

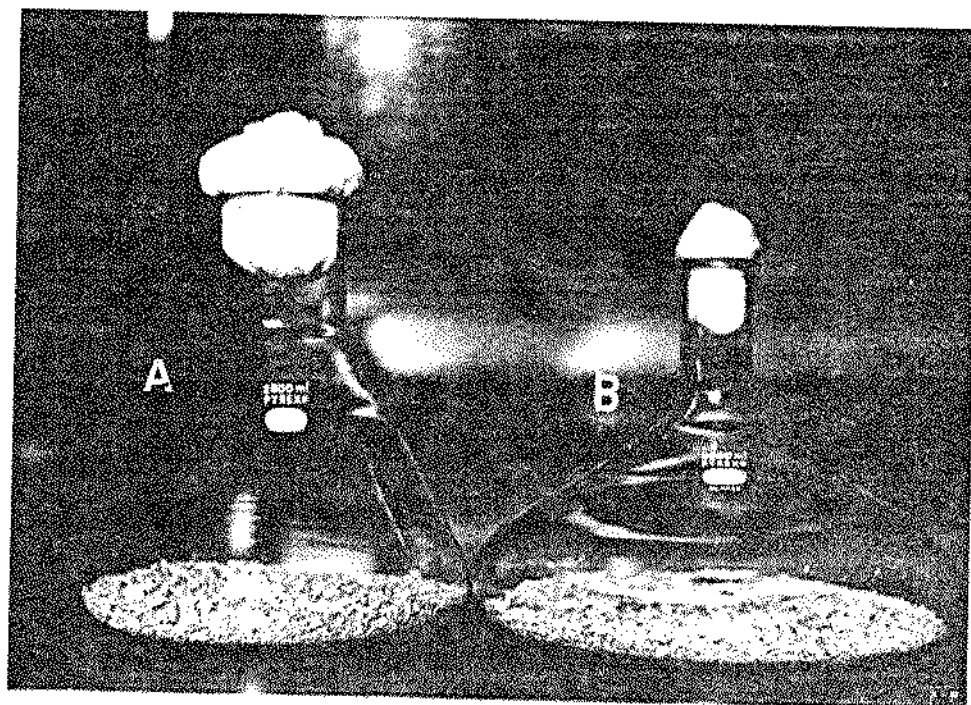
Após a conclusão das etapas iniciais, os substratos nelas selecionados foram utilizados no estudo da variação de escala.

Nesta etapa foram utilizados frascos erlenmeyer de 2 500 e 2 800 ml de capacidade (também denominados frascos Fernbach), com as características assinaladas na TABELA 10, e aspecto documentado na FOTO 2.

A quantidade de substrato em cada frasco, assim como o volume de inóculo e solução de glicose utilizados foram

estabelecidos de forma a manter os parâmetros de proporcionalidade descritos no item 4.4. . Assim, cerca de 150g de cada substrato (espessura do meio de cultura variou entre 1,0 e 2,0 cm) foram utilizadas por frasco, aos quais foram adicionados 105 ml de inóculo (item 4.2.) e 45 ml de solução de glicose 22,5% (p/v).

FOTO 2. Frascos Fernbach utilizados para fermentação semi-sólida.
A - frasco de 2 800 ml de capacidade;
B - frasco de 2 500 ml de capacidade.

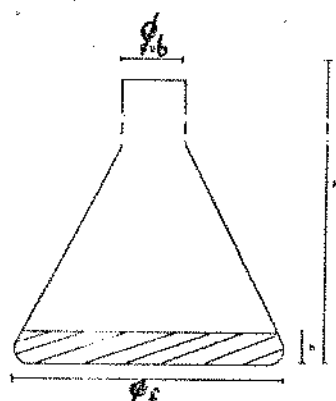


O preparo seguiu o fluxograma apresentado na FIGURA 13. As condições de crescimento foram mantidas, sendo que apenas 5 frascos foram preparados de cada vez. A retirada de amostras de cada frasco foi realizada

asépticamente, a cada intervalo de tempo determinado. As amostras foram transferidas para frascos esterilizados e tarados previamente, visto ser indispensável se conhecer o peso do material sendo analisado.

As adições de água ou outra solução, realizadas durante a fermentação, apresentadas no item 5.3, foram realizadas a cada 48 horas, com 30 ml de água esterilizada, agitando-se manualmente para garantir uma distribuição uniforme da solução sobre as partículas do meio.

TABELA 10. Características dos frascos utilizados na variação de escala do processo semi-sólido com *Bacillus thuringiensis*.



Símbolo	Características	Frasco 2 500 ml	Frasco 2 800 ml
ϕ_b	Diâmetro interno da boca	3,0 cm	6,7 cm
ϕ_f	Diâmetro externo do fundo do frasco	25,5 cm	20,5 cm
h	Altura do meio de cultura	1,0-1,2 cm	1,5-2,0 cm
H	Altura total do frasco	18,5 cm	21,0 cm

4.7. Acompanhamento da fermentação

O acompanhamento da FSS nas duas escalas, foi realizado através das determinações que seguem.

A metodologia sugerida pela AOAC (1984) foi utilizada com algumas modificações para adequá-la às nossas necessidades de análises assépticas. A metodologia aqui descrita se assemelha bastante à sugerida por BARRIOS-GONZALEZ et al (1988).

Adicionou-se 80 ml de água a cada frasco contendo 10 g de material obtido da fermentação. Procedeu-se a agitação em agitador-incubador a 200 rpm, 30 C, por 30 minutos.

4.7.1. pH

Uma fração do líquido assim obtido, cerca de 15 ml, foi então deixada em repouso por 10 minutos, e seu pH foi medido em potenciômetro.

4.7.2. Esporos

Outra fração de líquido foi diluída convenientemente, e as diluições submetidas a choque térmico (80 C / 10 minutos) em banho maria. O objetivo do choque é inativar células vegetativas e ativar a germinação dos esporos (os esporos capazes de germinar e formar colônias, são denominados "esporos viáveis") (THOMPSON, 1984).

Após resfriamento, 1 ml de cada diluição foi plaqueado em meio agar nutritivo, em duplicata, e então levado a incubar por 24 horas a 30 C, efetuando-se a leitura do número de colônias formadas (não menos que 25 e não mais que 250 por placa). A média obtida nas duplicatas, multiplicada pelo inverso da diluição utilizada no plaqueamento, representou o número médio de esporos viáveis (esporos UFC) por ml da solução inicial. A transformação deste valor para UFC/g de substrato, foi realizada baseada no volume de líquido utilizado para preparar a suspensão e no peso de material sendo analisado.

4.7.3. Umidade

O conteúdo de umidade das amostras foi determinado após secagem de 1 g de amostra retirada do frasco de fermentação, em estufa a 65°C, até peso constante. Os resultados apresentados foram calculados em base úmida, como segue:

$$\frac{(\text{peso do material úmido} - \text{peso do material após secagem})}{\text{peso do material úmido}} \times 100$$

4.7.4 Atividade biológica

Para avaliação preliminar da atividade inseticida dos produtos obtidos a partir do Bt pela FSS com resíduo de indústria de papel e celulose, foram realizados bioensaios utilizando a lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*) como inseto teste (FOTO 3).

A criação realizada pelo Laboratório de Entomologia do Centro Nacional de Pesquisa de Defesa da Agricultura (CNPDA) - EMBRAPA, em Jaguaridna/SP, seguiu a metodologia de CAMPO et al (1985), em dieta artificial, cujas etapas são resumidas nas FOTOS 4, 5 e 6.

As lagartas obtidas nesta criação, quando atingiram o terceiro estágio, foram transferidas para folhas de soja (IAC 7), para realização do bioensaio (as folhas foram colhidas no dia da realização do teste, de plantas cultivadas em vasos, com esta finalidade - FOTO 7).

FOTO 3. Aspecto do frasco de criação das lagartas da soja (*Anticarsia gemmatilis*) para fins de bioensaios.



FOTO 4.

Gaiola para acasalamento, observando-se:

A - frasco contendo as pupas de *Anticarsia gemmatalis*;

B - frasco com solução açucarada para os adultos que emergem;

C - alguns adultos que já emergiram das pupas.

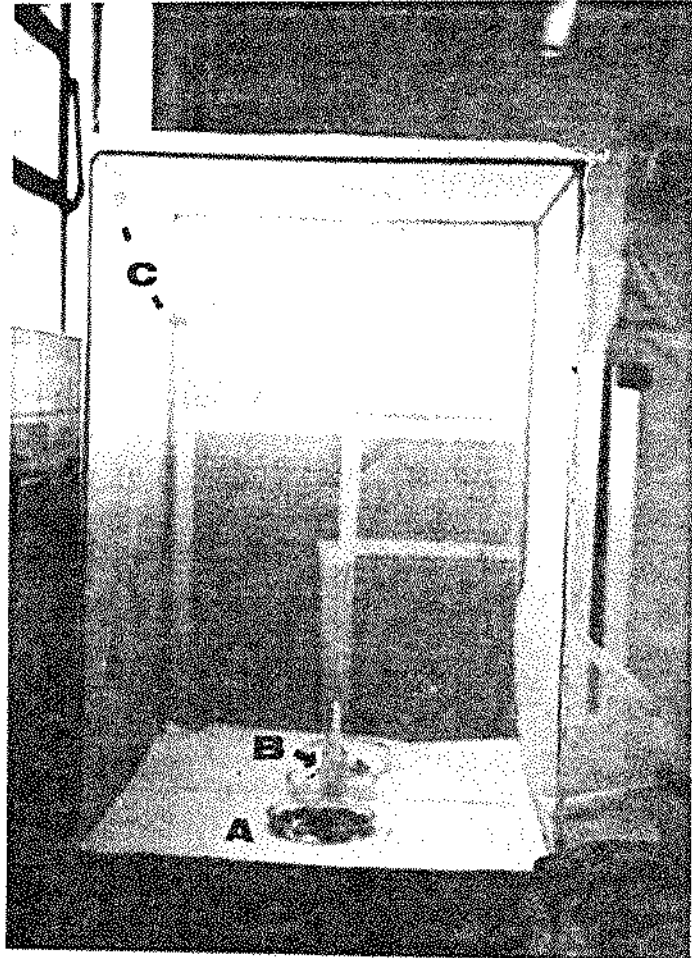


FOTO 5. Gaiolas para ovoposição. (Os adultos, após o acasalamento são transferidos para essas gaiolas, para a postura. Os ovos aí depositados são coletados diariamente).

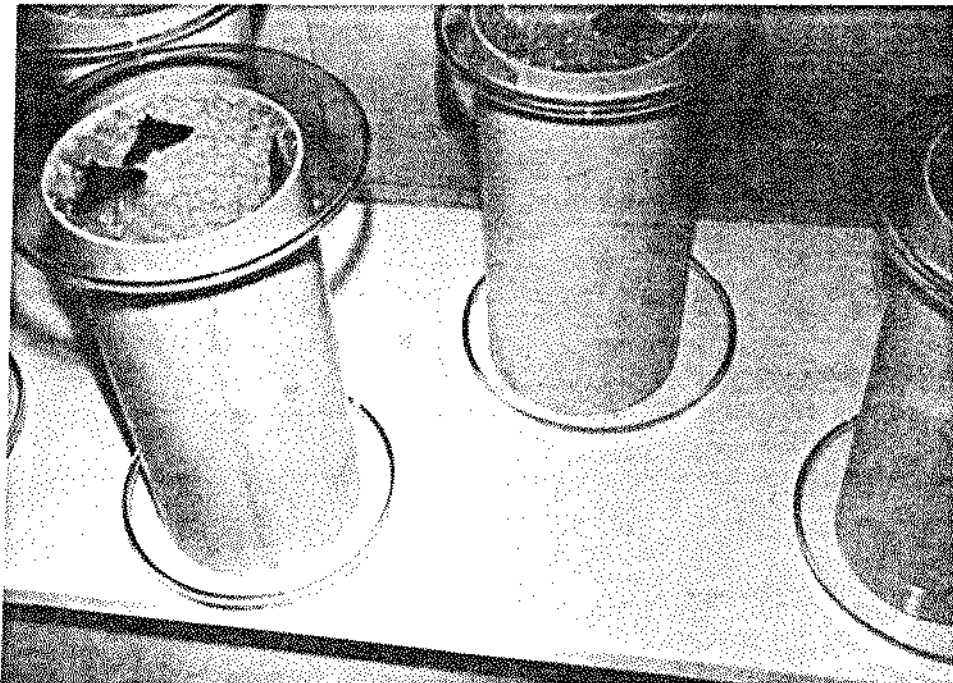


FOTO 6. Frascos para desenvolvimento das larvas. (Os ovos coletados, são transferidos para estes frascos, cobertos com discos de acrílico, para emergirem. São aí mantidos até atingirem o estágio desejado.)

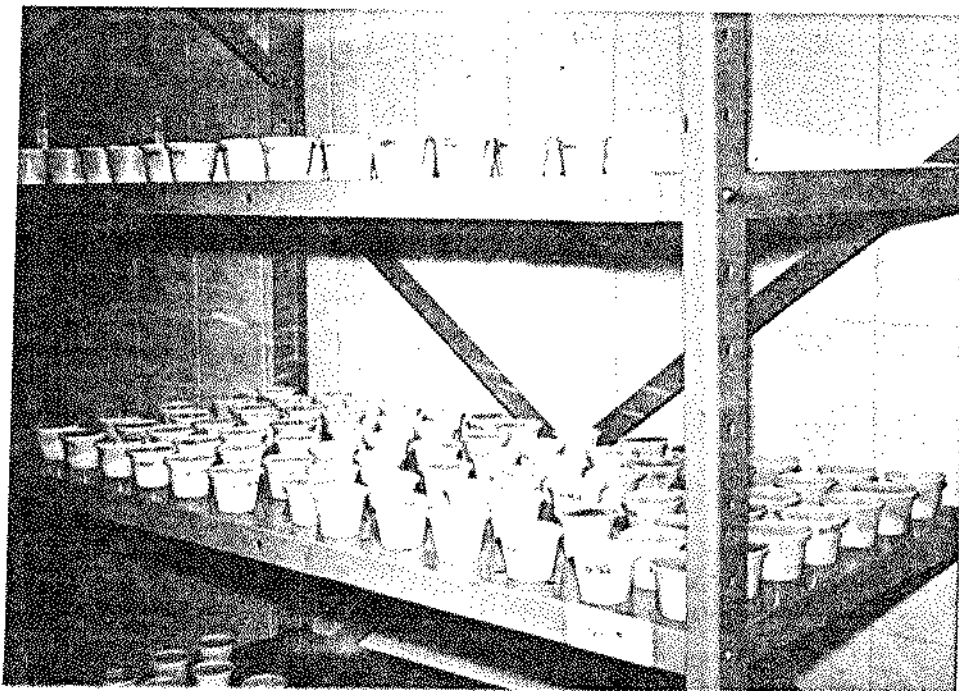


FOTO 7. Aspecto da manutenção de soja - *Glycine max* - (IAP - 7) em vasos, para utilização de suas folhas em bioensaios.



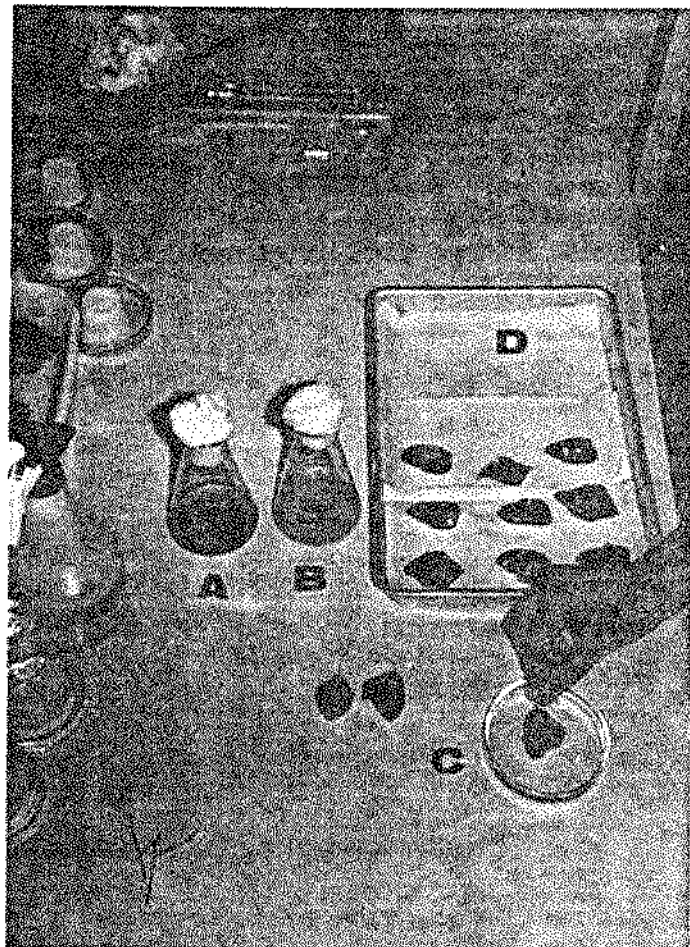
Para os bioensaios, foi realizada a suspensão dos esporos presentes no substrato após o término da fermentação. A suspensão em água foi então diluída convenientemente para que se obtivesse cinco concentrações distintas do patógeno. A avaliação desta concentração foi realizada por contagem em placas, conforme item 4.7.2. da metodologia (REICHELDERFER, 1985).

As suspensões preparadas para teste, foram utilizadas nos bioensaios. As folhas colhidas, lavadas em água e submetidas a secagem sobre papel absorvente, temperatura ambiente, foram imersas na solução do patógeno (concentração previamente determinada). A seguir foram colocadas a secar à temperatura ambiente, como se pode notar na FOTO 8.

FOTO 8.

Aspecto da preparação das folhas de soja (*Glicine max*) para execução do bioensaio com *Bacillus thuringiensis*.

- A = frasco com suspensão de *B. thuringiensis* obtido por fermentação semi-sólida;
- B = frasco com solução de DIFEL (Produto comercial à base de *B. thuringiensis*);
- C = etapa de imersão das folhas na suspensão em teste;
- D = bandejas forradas com papel, para secagem das folhas.



Além das soluções de patógeno, uma certa quantidade de folhas foi imersa apenas em água, para servir de testemunha, e outra quantidade idêntica a esta foi submersa em solução do produto comercial DIPEL (à base de *B. thuringiensis* Berliner) para servir de padrão de comparação, na falta de um padrão internacional.

Cada folha foi colocada em um copo individual (copo plástico tipo cafuninho, 50 ml de capacidade, ou placa de petri), e duas lagartas do terceiro estágio foram ali depositadas, conforme se observa pela FOTO 9.

Os copinhos foram fechados com um disco de acrílico transparente (quando da utilização de placas de petri, elas foram fechadas com sua própria tampa).

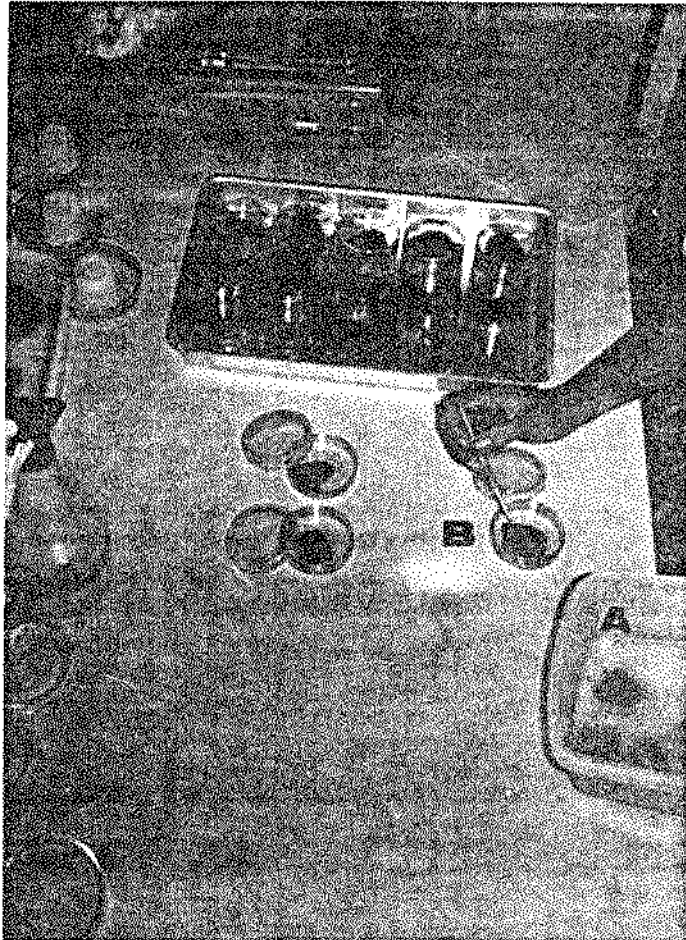
Cada concentração foi testada contra pelo menos 30 lagartas, e no máximo contra 60.

Os copinhos (ou as placas) foram mantidos nas mesmas condições de ambiente da criação, durante todo o período da avaliação, porém em salas distintas.

A cada 24 horas foi feita leitura do número de indivíduos mortos, até o sétimo dia.

Quando a folha inicialmente oferecida, se tornava imprópria para o inseto (amarelava, murchava ou era muito consumida), ela era substituída por folha recém colhida, porém sem aplicação do Bt (essas substituições se mostraram necessárias após o segundo dia de iniciado o bioensaio).

FOTO 9. Transferência de lagartas de *Anticarsia gemmatalis* da dieta artificial (A) para a folha já tratada com *Bacillus thuringiensis* (R).



5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Experimentos preliminares

Os resultados dos experimentos preliminares para definir o melhor período para a etapa de pré-fermentação, podem ser observados através das FOTOS 10 a 13.

FOTO 10. Aspecto da cultura de *Bacillus thuringiensis* em meio de pré-fermentação, após 10 horas de incubação. (Interferência de fase objetiva 160x).

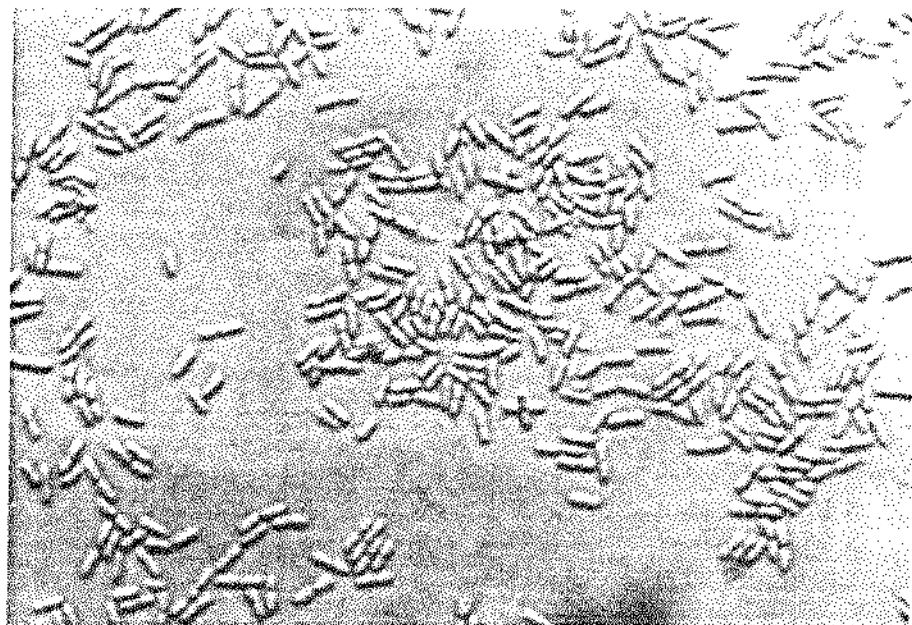


Foto 14. Aspecto da cultura de *Bacillus thuringiensis*, após 14 horas de fermentação, em meio de pró-fermentação. (Observa-se a presença de alguns esporos - setas indicativas). (Contraste de fase; objetivo 100x)

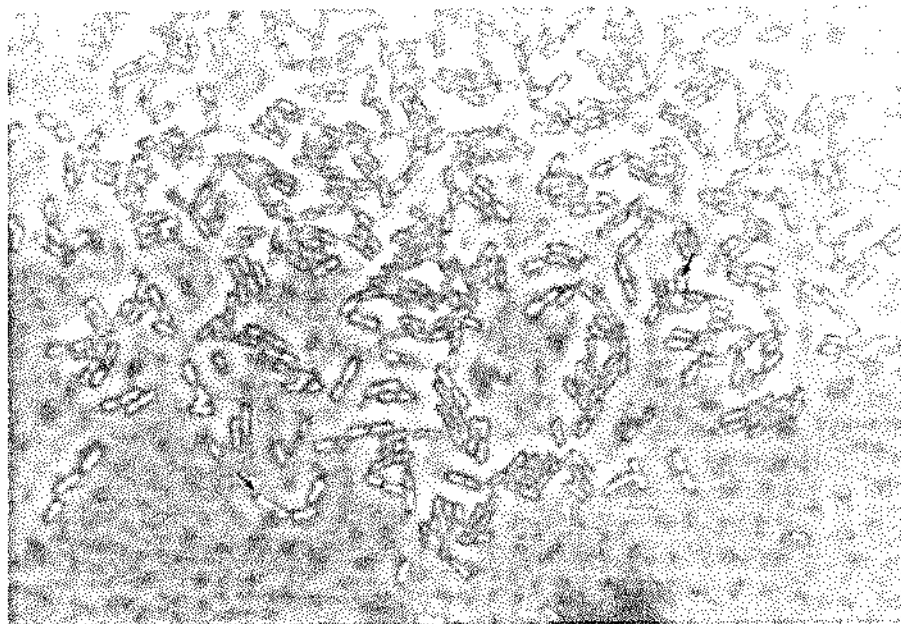


FOTO 12. Aspecto da cultura de *Bacillus thuringiensis* após 20 horas de fermentação em meio de pré-fermentação. (Observasse a presença de um maior número de esporos - setas indicativas - cujo tamanho e forma são bem distintos das das células vegetativas.) (Interferência de fase; objetiva 400x)

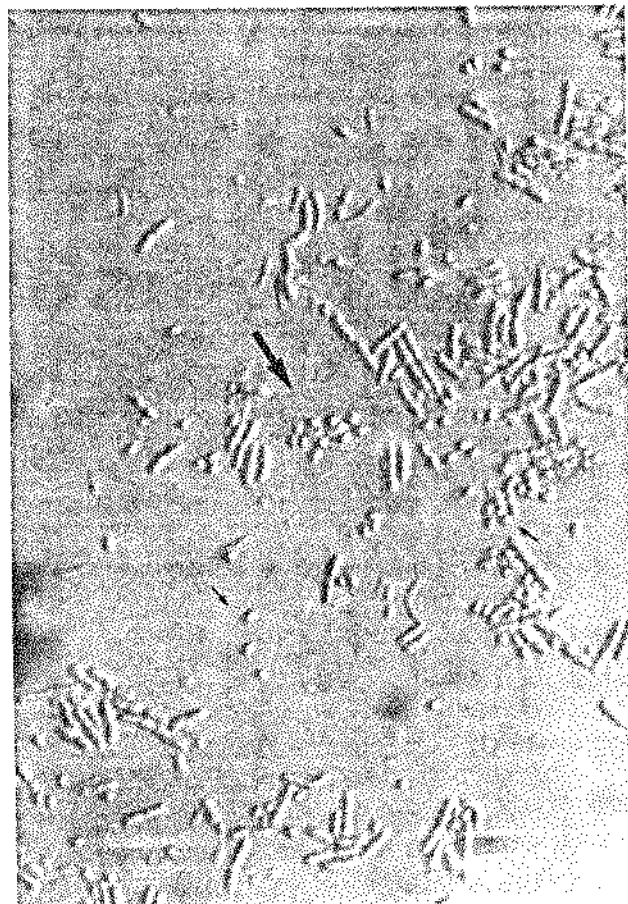


FOTO 13. Aspecto da cultura de *Bacillus thuringiensis* em meio de pré-fermentação, após 48 horas de incubação. (Observa-se o maior número de esporos - brilhantes e de forma arredondada; as células vegetativas de apresentam opacas e alongadas). (Foto obtida pela superposição das imagens obtidas com interferência e contraste de fase; objetiva 100x)



5.2. Meio de cultura composto por um único substrato

Os resultados obtidos na fermentação dos substratos sólidos, sob as condições previamente citadas, em frascos de 250ml de capacidade, estão apresentados na TABELA 11.

TABELA 11. Arranbamento da fermentação semi-sólida com *Bacillus thuringiensis*, em diferentes substratos.

Resíduo de indústria de sabões		Resíduo de indústria de papel e celulose		Farinha de vísceras		Farinha de penas		Farelo de malte prensado		Farelo de bolachas e doces	
(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)
pH	esporos(UFC/g)	pH	esporos(UFC/g)	pH	esporos (UFC/g)	pH	esporos(UFC/g)	pH	esporos(UFC/g)	pH	esporos(UFC/g)
7,0	---	7,0-7,5	---	6,0	---	5,6-6,2	---	5,0-5,7	---	5,0-6,8	---
6,4	$4,0 \times 10^6$	7,2-7,4	$1,7 \times 10^4$ ^A	5,7	$2,0^5 \times 10^5$	5,4-6,1	$1,2 \times 10^3$ ^B	5,7	$2,1 \times 10^4$ ^A	5,1-6,1	$< 10^3$ ^C
---	---	---	$5,0 \times 10^7$ ^D	5,5	$3,2 \times 10^4$ ^A	---	$2,0 \times 10^4$ ^A	5,8	$> 10^4$ ^A	5,8	$1,2 \times 10^3$ ^E
---	---	---	---	5,9	$1,0 \times 10^5$ ^B	5,4-6,3	$1,4 \times 10^4$ ^A	6,3	$4,2 \times 10^{11}$ ^F	4,9-5,4	$5,1 \times 10^3$ ^G
7,1	$< 10^8$ ^H	6,2	$> 10^8$ ^I	---	---	---	---	---	---	5,7	$< 10^7$ ^J
---	---	7,8	$> 10^8$ ^K	6,1	$1,7 \times 10^8 - 5,5 \times 10^{10}$ ^L	5,1-7,2	$> 10^5$ ^M	6,8	$5,4 \times 10^{11}$ ^N	4,9-5,9	2,0
7,2	$< 10^8$ ^O	8,4	$> 10^8$ ^P	---	---	---	---	---	---	5,6	$< 10^3$ ^Q
6,9	(d)	7,1-8,1	$3,0 \times 10^{12}$ ^R	---	$< 10^{10}$ ^S	5,5-7,8	(d)	---	---	5,3-5,6	8,4
7,0	(d)	8,2	---	---	$> 10^9$ ^T	---	---	---	---	5,3	$1,0$ ^U
---	---	---	---	7,9	$> 10^9$ ^V	---	---	8,1	$> 10^{14}$ ^W	5,7	7,0

a - valores mínimo e máximo observados em pelo menos 3 repetições. Quando apenas 1 valor for indicado, representa a média obtida, com um desvio não superior a 5%.
b - unidade formadora de colônia / g de material sendo fermentado, após choque térmico (80°C/10 minutos).
c - valor estimado, conforme sugerido por THOMPSON (1984).
d - resultados muito discrepantes e inconsistentes. Valores não apresentados.

Observa-se pela TABELA 11 que alguns substratos promoveram melhor a esporulação do Bt segundo valores de UFC/g obtidos. Assim o resíduo de indústria de papel, e o farelo de malte, se destacaram, ficando os demais no mesmo nível de produção. O farelo de bolachas e doces apresentou grande variabilidade de comportamento. Esse fato é explicável pela variação na composição, visto que são resíduos de diferentes composições químicas e características físicas diversas, os quais estão discutidos no APÊNDICE 2. Como resultado, apesar do cuidado inicial de homogeneizar esses materiais, obteve-se desenvolvimento bacteriano heterogêneo, concentrando-se sobre as partículas mais adequadas. Acrescente-se a isto o fato de que o substrato requer agitação mecânica para promover uma distribuição razoável de umidade e de inóculo, conforme se observou na TABELA 8.

As farinhas de penas e de vísceras promoveram um crescimento e esporulação do Bt razoáveis, entretanto a farinha de penas apresentou resultados muito variáveis conforme se pode observar principalmente pelos valores de pH apresentados na TABELA 11. Também a contagem de esporos foi extremamente variável, sendo que para tempos superiores a 72 horas os resultados de todas as repetições foi irregular sem que se detectasse uma razão especial para isto.

O resíduo da indústria de sabões apresentou contagem de esporos variável e irregular, provavelmente em virtude de suas características físicas (APÊNDICE 2). Este substrato tem uma primeira limitação quanto à sua baixa capacidade de absorver

água. Além disso apresenta grande dificuldade na separação e quebra dos aglomerados resultando em grandes partículas principalmente após esterilização (TABELA 8). Tais fatos levaram à decisão de não mais utilizá-lo nos tratamentos posteriores, visto que sua aplicação futura como substrato seria muito limitada pela etapa de pré-tratamento que se faz necessária. Desta forma, as etapas seguintes do trabalho foram realizadas apenas com os seguintes resíduos: resíduo sólido de indústria de papel e celulose, farinha de penas, farinha de vísceras, farelo de malte, farelo de bolachas, suplemento mineral e água de côco.

De forma geral, todos os substratos (tanto os de odor agradável) como os de odor agressivo - ver TABELA 5), apresentaram ao final da fermentação uma cor bem mais escura e um odor mais ofensivo, característico da fermentação com Bt. Este fato condiz com os comentários de BECKORD et al (1945) que trabalharam com outras bactérias.

5.3 Combinação de substratos

Após a verificação do comportamento de cada substrato separadamente, foi testada a combinação de dois ou mais subprodutos na composição do meio de cultura semi-sólido, conforme apresentado na TABELA 9 anteriormente. Seus resultados são apresentados na TABELA 12 e FIGURAS 14 a 17.

TABELA 12. Avaliação das fermentações de *Bacillus thuringiensis* em meios semi-sólidos compostos por dois substratos distintos.

Combinação (TABELA 9)	Avaliação	Combinação (TABELA 9)	Avaliação
F	* , ---	J	*
G	o , ---	L	o , ---
H	o , ---	M	* , ---
I	o	N	o , ---

* - a produção de esporos viáveis (UFC/g) após 120 horas foi inferior a 108 UFC/g.

o - houve formação de duas fases distintas, compostas por cada um dos substratos separadamente.

--- - a umidificação foi irregular, provocada pelas diferenças na capacidade de absorção dos componentes da mistura.

FIGURA 14. Acompanhamento das fermentações semi-sólidas em cinco diferentes meios de cultura (resíduo de indústria de papel, farelo de bolachas e doces, e suas combinações - A, B e C da TABELA 9), através das contagens de esporos viáveis (UFC/g).

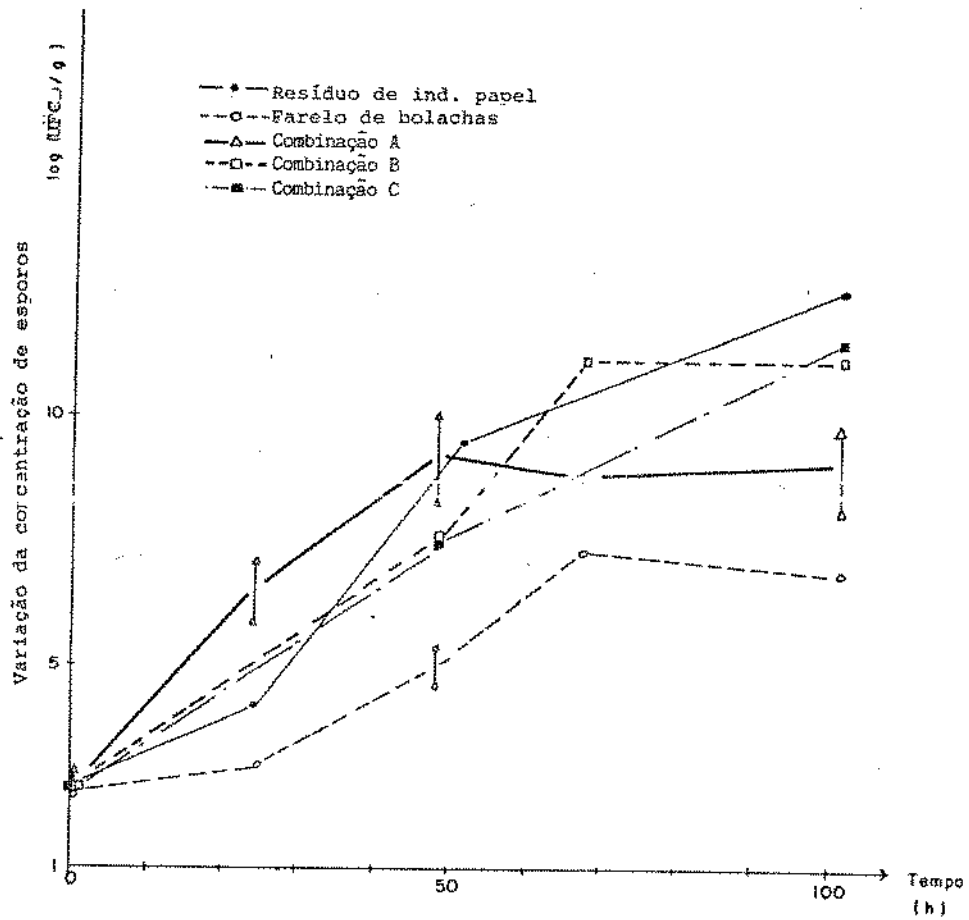


FIGURA 15. Acompanhamento das fermentações semi-sólidas em cinco diferentes substratos (Resíduo de indústria de papel, farelo de bolachas e doces, e suas combinações - A, B e C da TABELA 9), através da medida do pH.

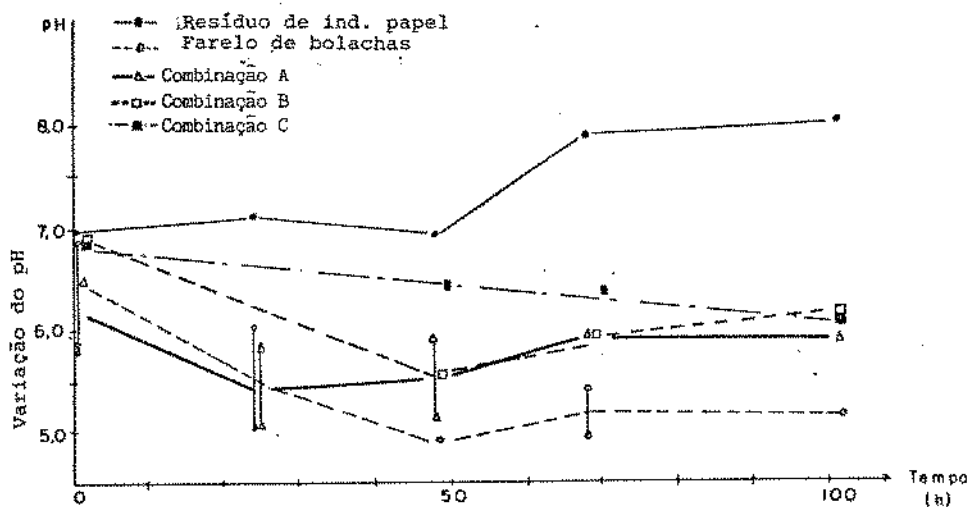


FIGURA 14. Acompanhamento das fermentações semi-sólidas em quatro diferentes meios de cultura (Farelo de malte prensado, farelo de bolachas e doces e e suas combinações - D e E da TABELA 9), através das contagens de esporos viáveis (UFC/g).

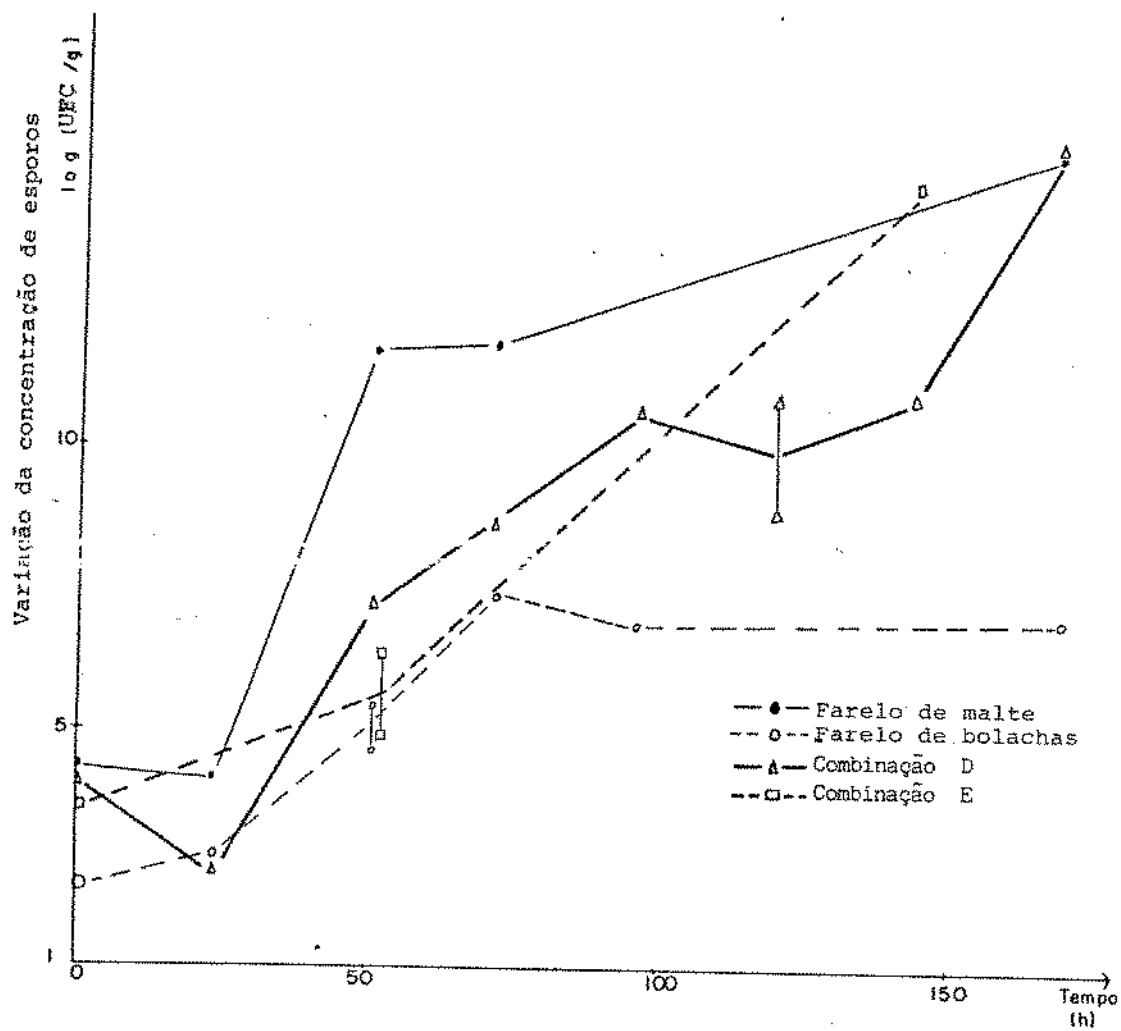
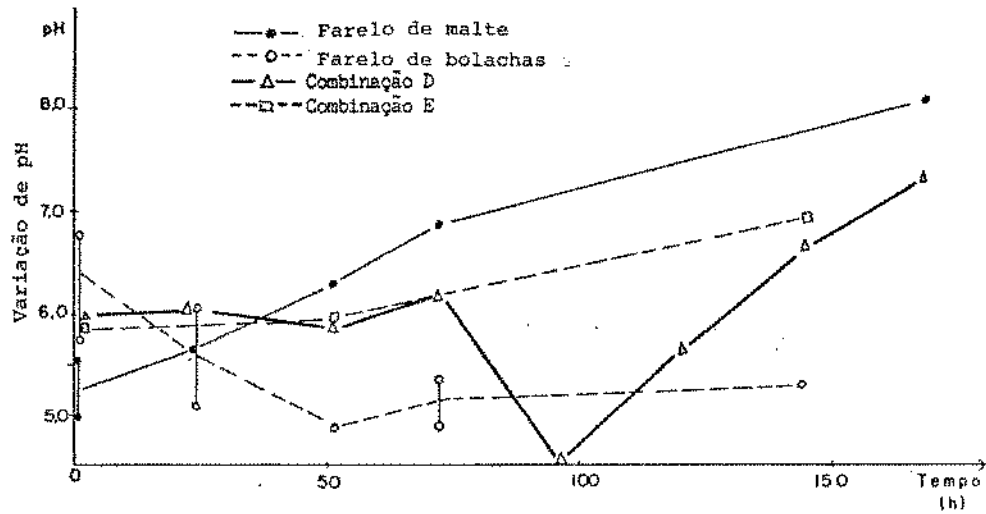


FIGURA 17. Acompanhamento das fermentações semi-sólidas em quatro diferentes meios de cultura (Farelo de malte prensado, farelo de bolachas e doces, e suas combinações - conforme TABELA 9), através da medida do pH.



Pelos resultados apresentados na FIGURA 14, a combinação A, do resíduo da indústria de papel e celulose com o farelo de bolachas e doces, apresentou rendimento superior ao obtido pelo farelo de bolachas sozinho, porém não atingiu os níveis alcançados pelo resíduo de indústria de papel e celulose sozinho.

A adição de sais minerais (representada em dois níveis de adição nas combinações B e C - FIGURA 14 e 16) melhorou o rendimento em esporos, atingindo valores muito próximos dos obtidos com o resíduo de indústria de papel sozinho (FIGURA 14) ou farelo de malte sozinho (FIGURA 16).

Nas combinações cujos resultados foram satisfatórios, pode haver em alguns casos (D e E), a necessidade de se acrescentar sais minerais para que a produção de esporos seja boa. Em outros casos (combinação A), essa complementação é menos importante, uma vez que um dos substratos sozinho (sem complementação) promove a mesma produção de esporos (FIGURA 14).

O comportamento das curvas do pH dos meios de cultura (FIGURA 15 e 17) apresentou a mesma tendência das curvas de produção de esporos (FIGURA 14 e 16) respectivas. O pH inicial do meio de fermentação tem sua importância no processo fermentativo de Bt (semi-sólido ou líquido) para reduzir a fase lag de adaptação da bactéria ao meio. Conforme se observa na FIGURA 15, o pH do meio constituído pelo resíduo de indústria de papel é mais elevado, e portanto mais adequado que os demais. Quando se procedeu à combinação A, o resíduo de indústria de papel não conseguiu elevar o pH da combinação. Entretanto, a adição de suplemento mineral cujo pH inicial é 6,8 (B e C),

elevou o pH das combinações para valores muito próximos à neutralidade, favorecendo assim o desenvolvimento da FSS com Bt.

Na FIGURA 17, pode-se observar efeito semelhante nas combinações D e E. Entretanto nestes casos o pH não foi tão elevado como no caso anterior, provavelmente pelo efeito do pH muito ácido do farelo de malte.

O acompanhamento do pH dos meios de cultura durante a fermentação semi-sólida, mostrou ser interessante no desenvolvimento do processo fermentativo com Bt.

Deve-se ressaltar a variabilidade de resultados que se observa em alguns pontos graficados (FIGURA 14 a 17). Ela é indicativa da dificuldade de se obter amostras homogêneas e representativas na FSS, principalmente em escala de laboratório, confirmando as observações de IHLEMANN (1985) sobre FSS, e as de BURGESS et al (1966) sobre as contagens de esporos de Bt.

5.4 Umidificação intermediária

5.4.1 Umidificação com água

Com a finalidade de se avaliar a necessidade ou não de adições periódicas de soluções umidificantes ao meio de cultura, compensando assim perdas de umidade ocorridas durante o processo FSS, foram testados diferentes níveis de umidificação. Foram utilizados apenas os meios constituídos pelo resíduo da indústria de papel, e pelo farelo de malte, separadamente, uma vez que eles

se mostraram mais interessantes que os demais, conforme TABELA 11.

Testes preliminares com adições a cada 24 horas indicaram umidificação excessiva, e a utilização de volumes inferiores a 1 ml se mostrou insuficiente pela dificuldade de distribuição homogênea do líquido sobre o meio de cultura.

Os resultados obtidos para o resíduo de indústria de papel são apresentados na TABELA 13 e na FIGURA 18; para o farelo de melte, os resultados estão apresentados na TABELA 14 e na FIGURA 19.

A adição de 3 ml a cada 48 horas não está representada pois mostrou-se excessiva após a segunda adição (96 horas de fermentação), notando-se a formação de uma fase líquida distinta do meio de cultura.

Observa-se pelas TABELAS 13 e 14 que a umidade inicial do meio é bastante reduzida para o crescimento de bactérias em FSS, se comparada com as sugeridas por ABDULLAH et al (1985), BECKORD et al (1945), PAMMENT et al (1978) e RAMESH & LONSANE (1987). Esse valor é gradativamente reduzido a índices muito baixos (30% de umidade) se não for realizada uma umidificação. Uma umidade tão desfavorável ao desenvolvimento de bactérias é entretanto bastante propícia para o desenvolvimento de contaminantes fúngicos que crescem em substratos com baixa atividade de água (TABELA 13).

Com a adição de 1 ml de água ao meio constituído pelo resíduo de indústria de papel, a cada 48 horas, foi possível

manter a umidade inicial do meio, ocorrendo mesmo uma pequena elevação deste valor. Com adição periódica de 2 ml de água, a umidade inicial foi elevada consideravelmente, e o rendimento em esporos foi superior à expectativa (uma vez que em meios de cultura líquidos, as contagens de esporos costumam se situar ao redor de 10^9 UFC/ml).

O meio constituído pelo farelo de malte possui maior capacidade de retenção de líquidos, entretanto como ficou estabelecido um limite de 2 ml de água adicionada / 48 horas para o resíduo de papel, valores superiores a 2 ml não foram testados com o farelo de malte. As variações nas medidas de pH, umidade e contagem de esporos viáveis, não foram superiores a 5% da média, para todas as repetições com os dois substratos testados.

TABELA 13. Influência da umidificação do meio de cultura na produção de esporos de *Bacillus thuringiensis* por processo de fermentação semi-sólido (Substrato utilizado: resíduo de indústria de papel e celulose).

Tempo (h)	Adição: 0 ml		Adição: 1 ml		Adição: 2 ml	
	Umidade (%)	Esporos (UFC/g)	Umidade (%)	Esporos (UFC/g)	Umidade (%)	Esporos (UFC/g)
0	50,2	-----	50,2	-----	50,2	-----
28	47,8	$1,9 \times 10^8$	47,8	$1,9 \times 10^9$	47,8	$3,5 \times 10^9$
50	48,7	$4,5 \times 10^7$	48,7	$9,2 \times 10^{10}$	48,7	$3,8 \times 10^9$
72	-----	$9,0 \times 10^7$	-----	> 10^9	-----	-----
79	-----	-----	-----	-----	53,4	$9,8 \times 10^9$
96	-----	$9,9 \times 10^{13}$	-----	$8,9 \times 10^{12}$	51,5	$9,2 \times 10^{15}$
120	46,6	$1,8 \times 10^{14}$	53,4	< 10^{17}	52,7	$1,5 \times 10^{17}$
144	46,9	$2,2 \times 10^9$	51,4	< 10^{19}	53,5	$7,7 \times 10^{24}$
168	46,4	$2,0 \times 10^9$	52,2	> 10^{19}	57,4	$2,7 \times 10^{23}$
192	-----	-----	-----	-----	57,7	$1,0 \times 10^{17}$
198	43,2	< 10^6 (a)	52,9	$1,1 \times 10^{16}$	-----	-----
223	43,2	(a)	53,7	$9,4 \times 10^{16}$	60,3	$7,3 \times 10^{28}$
240	41,5	(a)	52,7	< 10^{16}	58,6	$5,0 \times 10^{28}$
264	37,1	(a)	53,5	< 10^{12}	62,8	$4,7 \times 10^{32}$
312	34,6	(a)	54,3	$1,2 \times 10^{12}$	64,0	$3,1 \times 10^{32}$
336	38,1	(a)	54,1	$1,8 \times 10^{12}$	62,1	$4,0 \times 10^{35}$
359	-----	(a)	-----	-----	62,1	$3,6 \times 10^{35}$

(a) - surgimento de fungos contaminantes.

FIGURA 18. Influência da umidificação periódica do meio de cultura (cada 48 horas), sobre o desenvolvimento da fermentação semi-sólida de *Bacillus thuringiensis*, acompanhada pela avaliação do pH (Substrato utilizado: resíduo de indústria de papel e celulose).

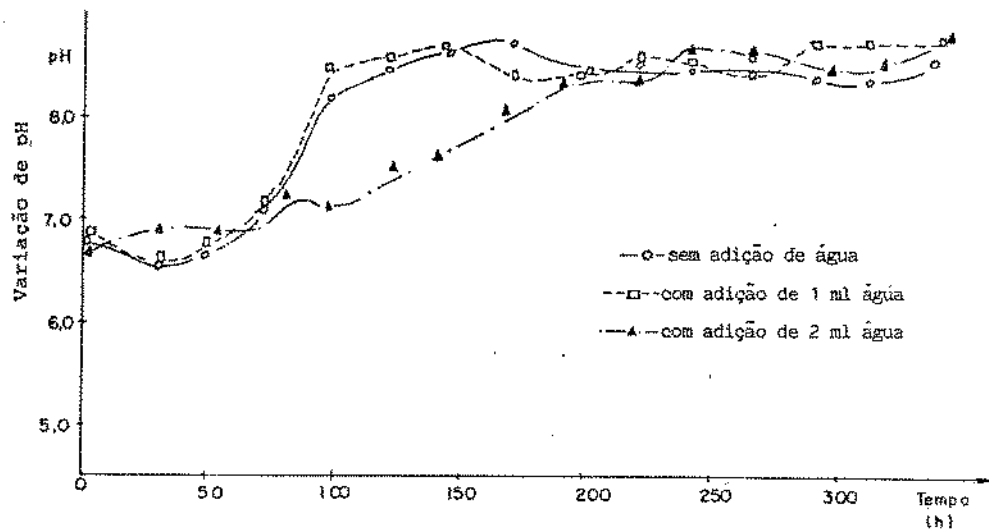


FIGURA 19. Influência da umidificação periódica do meio de cultura (cada 48 horas), sobre o desenvolvimento da fermentação semi-sólida de *Bacillus thuringiensis*, acompanhada pela avaliação do pH (Substrato utilizado: farelo de malte).

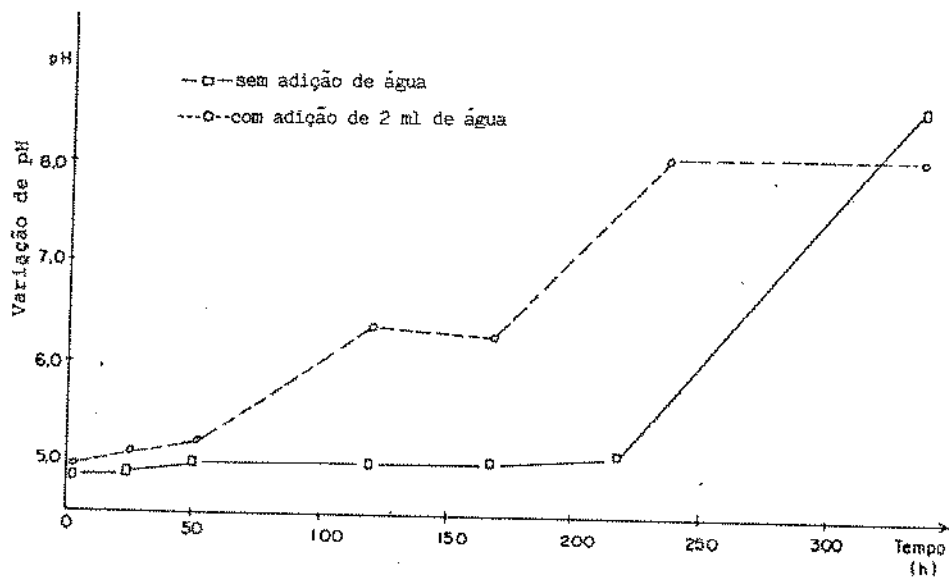


TABELA 14. Influência da umidificação do meio de cultura (cada 48 horas) na produção de esporos de *Bacillus thuringiensis* em processo de fermentação semi-sólido (Substrato utilizado: farelo de malte).

Tempo (h)	Adição: 0 ml		Adição: 2 ml	
	Umidade (%)	Esporos (UFC/g)	Umidade (%)	Esporos (UFC/g)
0	50,1	-----	50,1	-----
24	47,2	-----	47,2	3,7 × 10 ²
48	46,2	1,8 × 10 ⁴	46,2	1,8 × 10 ⁴
120	43,7	5,3 × 10 ¹¹	49,7	1,2 × 10 ⁸
168	39,5	1,7 × 10 ¹¹	54,6	2,0 × 10 ¹⁰
216	35,2	3,0 × 10 ¹⁴	55,2	3,5 × 10 ¹⁴
336	32,0	1,9 × 10 ¹¹	55,0	1,9 × 10 ¹⁵

5.4.2 Umidificação combinada

Alguns autores em seus trabalhos com FSS, estudaram e sugeriram a utilização combinada de resíduos e subprodutos sólidos e líquidos (BECKORD et al, 1945; BUDIATMAN & LONSANE, 1987; LAKSHMINARAYANA et al, 1975; LAUKEVICS et al, 1984; LEWIS & PAPAVIDAS, 1983; NIGAM & VOGEL, 1986; PAMMENT et al, 1978; SOBKOVIC, 1976; VIESTRUZ et al, 1981). Tendo em vista os resultados obtidos pelos mesmos, foi estudada a utilização de água de côco (subproduto B, TABELA 5) em substituição à água de umidificação e à solução de glicose, uma vez que este subproduto é rico em carboidratos - APÊNDICE 1).

No estudo realizado, os meios de cultura constituídos pelo resíduo de indústria de papel e farelo de malte, separadamente, foram preparados conforme metodologia (item 4.4), exceto a utilização de água de côco (previamente filtrada e esterilizada) em substituição aos 2,7 ml de solução de glicose 22,5%. A adição periódica de água (item 5.4.1) foi substituída pela de água de côco em outros dois experimentos.

Os resultados obtidos são apresentados nas TABELAS 15 e 16.

TABELA 15. Efeito da adição de água de côco (apenas em substituição aos 2,7 ml de solução de glicose 22,5%) sobre a fermentação de *Bacillus thuringiensis* em processo semi-sólido.

TEMPO (h)	Resíduo de indústria de papel e celulose			Farelo de malte		
	pH	Umidade (%)	Esporos (UFC/g)	pH	Umidade (%)	Esporos (UFC/g)
0	8,0	50,0	8	5,0	52,5	8
48	6,9	---	$7,9 \times 10^8$	5,2	50,4	$3,4 \times 10^{10}$
120	8,5	50,2	$5,6 \times 10^{11}$	6,3	54,8	$5,9 \times 10^{12}$
168	8,3	54,2	$5,1 \times 10^{13}$	6,3	64,5	$1,8 \times 10^{15}$
220	8,2	55,7	$3,0 \times 10^{14}$	8,1	62,8	$3,0 \times 10^{21}$
336	8,4	60,1	$4,9 \times 10^{14}$	8,1	64,6	$1,7 \times 10^{21}$

TABELA 16. Efeito da adição de água de côco em substituição à solução de glicose (2,7 ml) e à água adicionada periodicamente para umidificação (2 ml) sobre a fermentação semi-sólida de *Bacillus thuringiensis*.

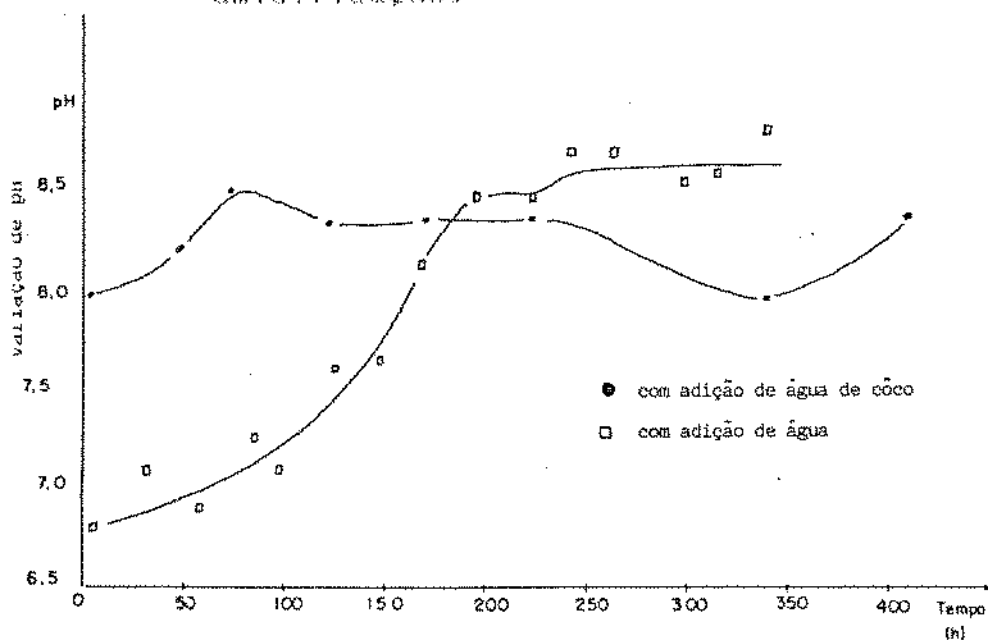
TEMPO (h)	Resíduo de indústria de papel e celulose			Farelo de malte		
	pH	Umidade (%)	Esporos (UFC/g)	pH	Umidade (%)	Esporos (UFC/g)
0	8,0	49,7	----- 9	5,0	52,5	----- 8
48	8,2	-----	$3,0 \times 10^{10}$	5,2	50,4	$3,4 \times 10^{10}$
120	8,3	50,2	$4,0 \times 10^9$	6,3	57,2	$5,9 \times 10^{13}$
168	8,5	54,2	$2,0 \times 10^9$	7,8	53,3	$1,5 \times 10^{18}$
216	8,3	54,8	$4,2 \times 10^{12}$	8,5	58,8	> 10^{23}
336	8,1	59,5	$1,5 \times 10^{10}$	8,4	67,1	$2,7 \times 10^{10}$

Comparando os resultados de umidade obtidos na TABELA 15 com os seus respectivos nas TABELAS 13 e 14, nota-se que foram acentuando-se gradativamente as diferenças do conteúdo de umidade nos dois casos, principalmente após 120 horas de fermentação. Notou-se também que para o resíduo de indústria de papel, o teor de umidade foi menor quando se utilizou água de côco, enquanto que para o farelo de malte, ocorreu o contrário. Pode-se correlacionar essas variações e as diferenças observadas nas TABELAS 15 e 16, com a intensidade do desenvolvimento microbiano em cada substrato, conforme relatado no item 3.4.3-I-b (o desenvolvimento microbiano vem acompanhado de formação de água).

Comparando os resultados obtidos com o resíduo de indústria de papel na TABELAS 13 (coluna referente à adição de 2 ml de água) e TABELA 15, observa-se que com a adição de água de côco houve menor produção de esporos de Bt. Entretanto para o farelo de malte (TABELA 14 - coluna de adição de 2 ml de água - e TABELAS 15 e 16), o efeito foi benéfico. Esse resultado confirma os resultados de ARCAS et al (1984), FODA(1985) apud SALAMA (1984), NICKERSON & BULLA (1974) e SCHERRER et al (1973), que observaram variações na esporulação de acordo com alterações do conteúdo de glicose do meio (item 3.2.1.b).

Para melhor observar o efeito da adição de água de côco sobre o pH do meio de cultura constituído pelo resíduo de indústria de papel, apresenta-se na FIGURA 20 um gráfico comparativo.

FIGURA 20. Variação do pH do meio de cultura constituído pelo resíduo sólido da indústria de papel e celulose, em função da adição ou não de água de côco em substituição à água de umidificação.



Também com relação aos valores de pH, a água de côco afetou de forma diversa os dois substratos. No resíduo de indústria de papel e celulose) (FIGURA 20) ela agiu como elemento tamponante, se comparado com o comportamento do pH do mesmo substrato quando apenas água foi adicionada. Este comportamento não era esperado, principalmente quando se compara com os obtidos por FERNANDEZ et al (1975) (apresentados no QUADRO V, APÊNDICE 1), e por MORAES & CAPALBO (1986b) (apresentados na FIGURA I, APÊNDICE 1), que utilizaram água de côco em fermentações submersas com Bt. Pelo QUADRO V (APÊNDICE 1), observa-se que o pH se torna mais ácido quando se aumenta a quantidade de água de côco no meio. Na FIGURA I (APÊNDICE 1), notou-se a acidificação do meio durante o processo fermentativo.

Na tentativa de esclarecer os fatos, deve-se observar a composição dos substratos em uso, apresentados no APÊNDICE 2. Observa-se que o resíduo de indústria de papel e celulose contém cerca de 0,045% de açúcares totais, dos quais cerca de 60% são redutores, ao passo que o farelo de malte possui cerca de dez vezes esse conteúdo em açúcares totais, que por sua vez são em sua totalidade redutores. De forma análoga, se observa um conteúdo de nitrogênio muito superior no farelo de malte se comparado com o resíduo de indústria de papel. Assim, no farelo de malte o crescimento do Bt não está limitado pela glicose, ao passo que no resíduo de papel, devido ao conteúdo mais reduzido de nutrientes, alterações na concentração de açúcares afetam drasticamente o balanço de nutrientes, o que causaria uma esporulação defeituosa. Segundo DULMAGE & RHODES (1971), as variações na composição do meio podem causar rompimento celular,

esporulação incompleta, germinação ou autólise, fatores esses que, neste trabalho, se refletiram na redução do número de esporos viáveis (UFC).

Pode-se concluir com base nos resultados obtidos, e nos de FERNANDEZ et al (1975), ROBOFF & YOSTEN (1969) e SINGER et al (1966), entre outros, que a presença da água de côco rompeu o balanço C:N do meio de cultura composto pelo resíduo de papel, causando por isso a redução da contagem de esporos.

Porém com o farelo de malte o balanço não foi rompido devido à presença de maior quantidade de nutrientes, havendo até um pequeno aumento das UFC/g. Para este substrato a água de côco adicionou amino-ácidos ou fatores de crescimento nos quais o substrato fosse deficiente, ou que possuísem a característica de reverter ou promover a etapa do ciclo metabólico do Bt que estava comprometida anteriormente, conforme explicam FERNANDEZ et al (1975).

5.5 Variação de escala

Para verificar a influência de alguns parâmetros na ampliação de escala da FSS com Bt, foram realizadas fermentações com o resíduo de indústria de papel e celulose, e o farelo de malte, separadamente, conforme as condições descritas no item 4.6.

Nestes experimentos, como a espessura da camada do meio de cultura era reduzida (TABELA 10), e a quantidade de material

retirado para amostra não podendo ser inferior a 10 g para garantir sua representatividade, a retirada de amostras foi restrita a 2 ou 3 vezes durante cada fermentação.

Os resultados obtidos são apresentados nas TABELAS 17 e 18 para o resíduo de indústria de papel e celulose, e nas TABELAS 19 e 20 para o farelo de malte. As TABELAS 17 e 19 são referentes aos experimentos efetuados nos frascos de 2 500 ml, e as TABELAS 18 e 20 são referentes aos frascos de 2 800 ml.

TABELA 17. Fermentação semi-sólida com *Bacillus thuringiensis*, em meio de cultura composto pelo resíduo de indústria de papel e celulose em frascos de 2 500 ml, com ou sem adição periódica de água.

TEMPO (h)	Sem adição de água			Com adição de água		
	pH	Umidade (%)	Esporos (UFC/g)	pH	Umidade (%)	Esporos (UFC/g)
0	7,2	43,1	-----	7,2	43,1	-----
168	8,7	---	2,5 × 10 ¹³	8,1	---	2,6 × 10 ¹¹
312	8,6	50,5	1,0 × 10 ¹⁸	8,7	63,8	5,4 × 10 ²¹

TABELA 18. Fermentação semi-sólida com *Bacillus thuringiensis* em meio de cultura composto apenas pelo resíduo de indústria de papel e celulose em frascos de 2800 ml, com ou sem adição periódica de água.

TEMPO (h)	Sem adição de água			Com adição de água		
	pH	Umidade (%)	Esporos (UFC/g)	pH	Umidade (%)	Esporos (UFC/g)
0	7,1	43,1	----- 10	7,1	43,1	----- 12
190	8,6	---	$1,7 \times 10$ 11	8,4	60,1	$7,3 \times 10$ 21
312	7,2	47,0	$1,7 \times 10$	8,2	62,9	$5,0 \times 10$

TABELA 19. Fermentação semi-sólida com *Bacillus thuringiensis*, em meio de cultura composto apenas pelo farelo de malte, em frascos de 2 500 ml, com ou sem adição periódica de água.

TEMPO (h)	Sem adição de água			Com adição de água		
	pH	Umidade (%)	Esporos (UFC/g)	pH	Umidade (%)	Esporos (UFC/g)
0	5,8	45,2	----- 8	5,8	45,2	----- 7
120	6,3	---	$3,0 \times 10$ 11	5,6	53,2	< 10 13
192	8,2	47,0	$1,9 \times 10$ 12	5,5-8,2	63,1	$1,7 \times 10$ 17
312	8,4	49,8	$7,8 \times 10$	8,3	65,1	$7,6 \times 10$

TABELA 20. Fermentação semi-sólida com *Bacillus thuringiensis*, em meio de fermentação composto apenas pelo farelo de malte, em frascos de 2 800 ml, com ou sem adição periódica de água.

TEMPO (h)	Sem adição de água			Com adição de água		
	pH	Umidade (%)	Esporos (UFC/g)	pH	Umidade (%)	Esporos (UFC/g)
0	5,9	45,2	-----	5,9	45,2	-----
120	6,1-7,4	41,5	$4,5 \times 10^6$	6,0-7,4	53,2	$7,0 \times 10^8$
192	6,2-8,1	-----	$1,6 \times 10^9$	5,1-7,7	63,1	$6,1 \times 10^{11}$
312	6,1-8,4	49,1	$1,5 \times 10^{12}$	5,0	65,1	$3,4 \times 10^{16}$
				8,7		$6,4 \times 10^{20}$

Pode-se observar pelos resultados apresentados que a adição de água a intervalos regulares, favoreceu o crescimento do Bt, e também sua esporulação. Observa-se pela característica do pH, que o crescimento foi favorecido nos frascos onde ocorreu adição de água. Seu valor foi aumentado mais lentamente do que nos frascos sem adição; nestes últimos, já após 168 horas, observa-se um valor de pH acima de 8,0 na maioria dos casos.

Observa-se também que para o resíduo de indústria de papel e celulose, os resultados foram sempre muito semelhantes aos demais, e que como se esperava, a adição periódica de água auxiliou o aumento da esporulação. Entretanto, comparando os resultados da TABELA 13 com as TABELAS 17 e 18, nota-se que nos frascos maiores a produção de esporos foi inferior.

Para o farelo de malte, o comportamento é exatamente o inverso do observado para o resíduo de papel. Nota-se uma variabilidade de um para outro experimento, principalmente nos frascos de 2 800 ml. Apesar disso, comparando os resultados da TABELA 14 com as TABELAS 19 e 20, observa-se um aumento significativo na produção de esporos com frascos de maior dimensão.

5.6 Avaliação biológica

Alguns bioensaios foram realizados com os produtos obtidos da FSS a partir do resíduo de indústria de papel, em frascos de 2 500 e 2 800 ml. Entretanto, todos eles apresentaram problemas na execução do teste, principalmente devido à alta taxa de mortalidade observada nos copos-testemunha.

Além desse problema, observou-se que apesar de altas concentrações de esporos estarem sendo utilizadas (ao redor de 10^{10} UFC/ml), a mortalidade obtida não era significativa. Dois fatores poderiam estar ocasionando este comportamento: ou o processo FSS não permitia a produção de unidades tóxicas, ou a cultura-estoque de Bt utilizada havia perdido sua toxicidade devido às repetidas vezes que havia sido repicada em meio artificial.

Para estabelecer a causa, isolamos colônias de Bt do produto comercial DIPEL (ABBOT Lab.), segundo metodologia sugerida em REICHELDEFER (1985). Estas colônias, sem contaminantes, assim obtidas, foram utilizadas para realizar

fermentações nos dois substratos sob as condições já descritas na metodologia, em frascos de 2 800 ml. Os produtos obtidos foram avaliados ao final da fermentação, quanto ao conteúdo em esporos, e submetidos a bioensaio.

Os resultados obtidos, são apresentados na TABELA 21.

Pelas FOTOS 14 e 15 pode-se observar o aspecto das lagartas e das folhas por elas consumidas, durante e ao final do bioensaio.

TABELA 21. Avaliação da atividade inseticida de *Bacillus thuringiensis* (isolado de produto comercial à base desta bactéria), produzido por fermentação semi-sólida, contra a lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*).

Material testado	Concentração (UFC/ml)	Mortalidade acumulada após 7 dias (%)
Fermentado em resíduo de indústria de papel e celulose	$1,9 \times 10^9$	100
	$1,9 \times 10^6$	80
Produto comercial (DIPFL)	$2,3 \times 10^{10}$	100
	$2,3 \times 10^5$	33
Testemunha	—	24

FOTO 14. Aspecto da folha de soja:
(A) tratada com *Bacillus thuringiensis*;
(B) sem tratamento.

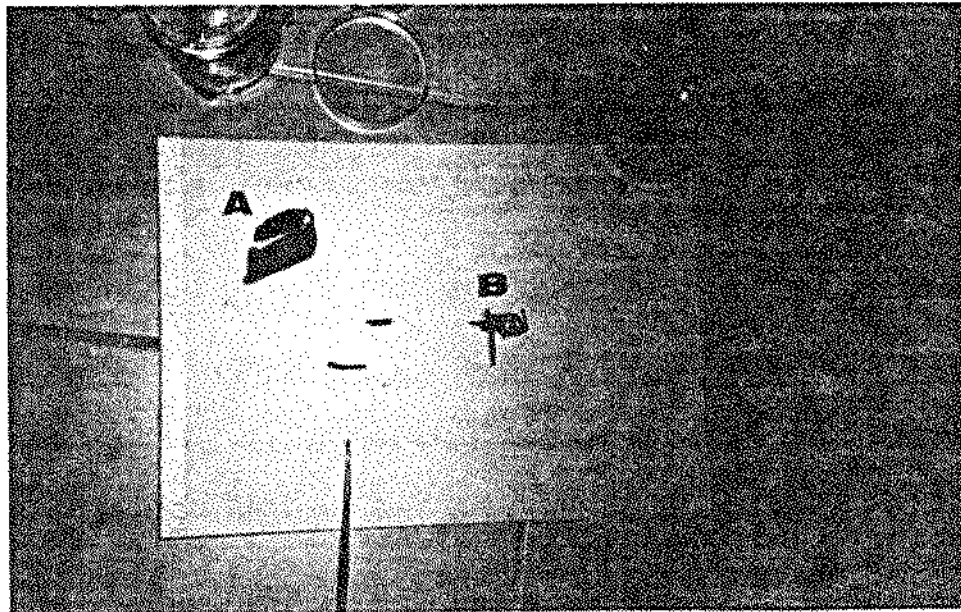
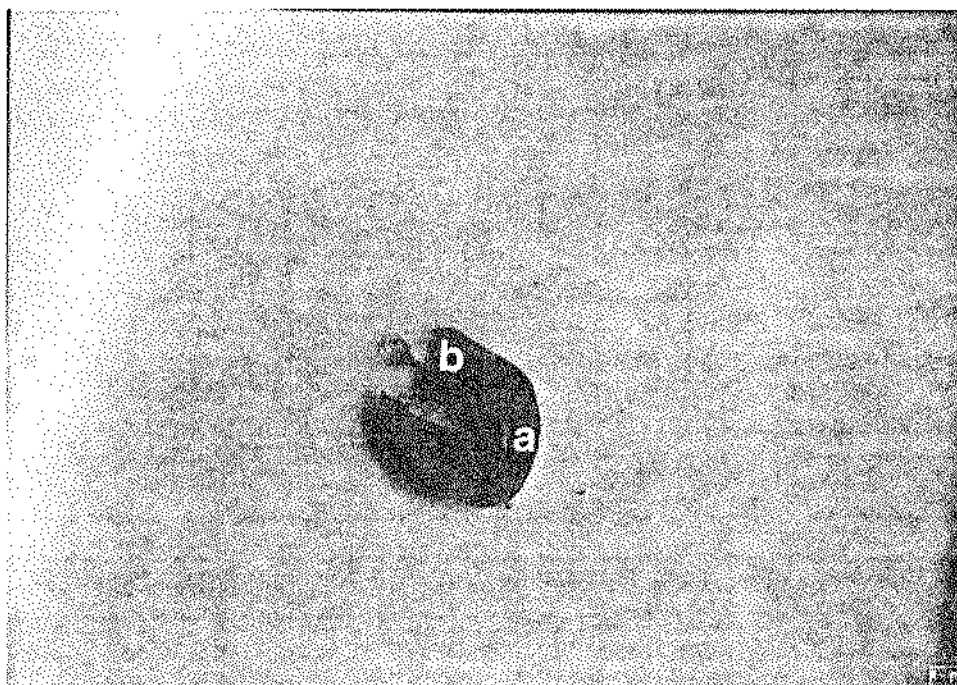


FOTO 15. Aspecto das lagartas da soja ao final do biótipo:
(A) lesionadas;
(B) alimentadas com *Bacillus thuringiensis*.



5. CONCLUSÕES

1. O resíduo sólido da indústria de papel e celulose se mostrou interessante nos trabalhos realizados, onde foi utilizado como substrato para fermentação semi-sólida de *Bt*. Além dos rendimentos obtidos em esporos de *Bt* terem sido consideravelmente elevados, o resíduo é muito atrativo sobre outros aspectos, como por exemplo o fato de estar disponível em grande quantidade, de forma concentrada e em áreas relativamente bem definidas. Também já foi pré-tratado, ou seja, as fibras já foram reduzidas a parcelas de pequeno comprimento, e grande parte da lignina foi removida. O seu valor econômico é baixo ou nulo para a indústria, visto que ele se acumula sem aproveitamento.

Outro resíduo que se destacou como substrato para produção de esporos de *B. thuringiensis* por fermentação semi-sólida foi o farelo de malte, pelos altos rendimentos em esporos. Também este resíduo é atrativo pelo fato de estar disponível em grande quantidade, de forma concentrada e em áreas bem definidas. Entretanto seu uso, apesar do custo muito baixo, deverá ser considerado economicamente pois já é utilizado por suinocultores das regiões próximas da cervejaria produtora do farelo, e pode apresentar variação de composição química, em função de do processo de produção da cerveja que o gera.

2. A umidificação intermediária dos meios de cultura é aspecto dos mais relevantes e indispensável para um bom rendimento em esporos de *B. thuringiensis*; o nível de adição de água de 2 ml a cada 48 horas (para cada 10 g de substrato inicial, seco) foi considerado ideal para as condições de trabalho, pois garantiu um teor de umidade ao redor de 60% durante todo o processo.

A umidificação combinada (utilização de água de côco para umidificar o meio semi-sólido) se mostrou satisfatória quando utilizada como complementação nutricional do substrato, visando adequar o meio de cultura às necessidades do microrganismo em fermentação.

Além dessas indicações de substratos viáveis, outras considerações igualmente importantes se apresentam:

* o período de pré-fermentação ideal para se obter bom desenvolvimento de células vegetativas e pouca esporulação, está situado entre 10 e 12 horas, para as condições descritas no trabalho;

* alguns substratos requerem pré-tratamento para que seja possível crescimento e esporulação adequados ao *B. thuringiensis*; trabalhos futuros deverão enfatizar esses processos;

* a combinação de substratos sólidos com finalidade de composição de meio de cultura para processo de fermentação semi-sólido, não é simples de se efetuar; itens como pré-tratamento e homogeneização de tamanho de partículas devem ser considerados;

* a complementação do meio de cultura com sais minerais, de baixo custo, favoreceu a esporulação do *B. thuringiensis* quando o substrato não era muito rico em minerais; estudos futuros poderão avaliar economicamente o interesse desta adição;

* a determinação do pH dos produtos durante a fermentação semi-sólida mostrou ser parâmetro de interesse para o acompanhamento do processo de produção de *B. thuringiensis*; os aspectos de homogeneidade das amostras para tal acompanhamento, deverão ser objeto de estudos futuros;

* as variações de escala testadas, visando ampliação de escala futura, indicaram que o processo semi-sólido de fermentação poderá ser ampliado para escalas maiores sem grandes obstáculos, pois os rendimentos obtidos nas escalas maiores estudadas (150 g de substrato por frasco) foram iguais ou superiores à escala inicial (10 g de substrato por frasco);

* os bioensaios preliminares indicam a possibilidade de uso do produto à base de *B. thuringiensis* obtido em fermentações semi-sólidas. O produto testado se mostrou tóxico à lagarta da soja (*Anticarsia gemmatilis*) em condições de laboratório;

* a padronização do produto obtido por fermentação semi-sólida é item dos mais importantes a ser avaliado, para que se tenha segurança e reprodutibilidade na aplicação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULLAH, A.I.; TENDERDY, R.P.; MURPHY, V.G. 1985. Optimization of solid substrate fermentation of wheat straw. *Biotechnol. Bioeng.* 27: 20 - 27.
- AGUILERA, M.M. et al. 1983a. Informe preliminar sobre meios de cultura para produção massal de inóculo de *Paezelomyces* spp, fungos controladores de nematóides. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 6., Araras, 1983. Resumo dos trabalhos. Araras, Planalsucar/Coordenadoria Regional Sul. p.17.
- ATBA, S.; HUMPHREY, A.E.; HILLIS, N.F. 1971. Aeração e agitação. In: Engenharia Bioquímica. Trad. Júlio Cesar Medina. Campinas, Fundação Centro tropical de Pesquisa e Tecnologia de Alimentos. Cap.6, p.138-168.
- ATDOO, K.E.; HENDRY, R.; WOOD, B.J.B. 1981. Estimation of fungal growth in a solid state fermentation system. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 12: 6 - 9.
- ANDREWS Jr., R.E. et al. 1980. Rocket immune eletrophoresis of the entomocidal parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *Appl. Environ. Microbiol.* 40(5): 897 - 900.
- ANGUS, T.A. 1965. Symposium on Microbial Insecticides. I. Bacterial pathogens of insects as microbial insecticides. *Bacteriol. Rev.* 29 (3): 364-371.

- ANGUS, T.A. 1968. The use of *Bacillus thuringiensis* as a microbial insecticide. *World Rev. Pest Control* 7(1): 11 - 26.
- 1971. *Bacillus thuringiensis* as a microbial insecticide. In: DEKKER, M., ed. *Naturally occurring insecticides*. New York, Marcel Dekker, p. 463-498.
- ANGUS, T.A. & LUTHY, P. 1971. Formulation of microbial insecticides. In: BURGESS, H.D. & HUSSEY, N.W., ed. *Microbial control of insects and mites*. London, Academic Press. Cap. 28, p. 623 - 638.
- AOAC. 1984. In: *Official methods of analysis of the Association of Official Agricultural Chemists*. Washington/DC, p. 253.
- AQUINO, M.L.N. et al. 1975. Nova tecnologia de multiplicação do fungo *Metarrhizium anisopliae*. Recife, Comissão Executiva de Defesa Fitossanitária da Lavoura Canavieira de Pernambuco. 29 p. (CODECAP. Boletim Técnico, 4).
- 1977. Cultura de *Metarrhizium anisopliae* (Netsch) Sorokin em sacos de polipropileno. Nota prévia. Recife, Comissão Executiva de Defesa Fitossanitária da Lavoura Canavieira de Pernambuco. (CODECAP. Boletim Técnico, 5).
- ARCAS, J.; YANTORNO, O.; ERTOLA, R. 1987. Effect of high concentration of nutrients on *Bacillus thuringiensis* culture.

- Biotechnol. Lett. 9(2): 105 - 110.
- ARCAS, J. et al. 1984. A new medium for growth and delta-endotoxin production by *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. Biotechnol. Lett. 6(8): 495 - 500.
- ARSECULFRATNE, S.N. et al. 1969. Coconut as a medium for the experimental production of aflatoxin. Appl. Microbiol. 18(1): 88 - 94.
- BAURACHARYA, R. & MUDGEY, R.E. 1980. Effects of controlled gas environments in solid-state fermentation of rice. Biotechnol. Bioeng. 22: 2219 - 2235.
- BARRIOS-GONZALEZ, J. et al. 1966. Penicillin production by solid state fermentation. Biotechnol. Lett. 10(11): 793 - 798.
- BARTHOLOMEW, J. & MITTWER, T. 1950. A simplified bacterial spore stain. Stain Technol. 25(3): 153 - 156.
- BECKORD, L.D., KNEEN, E., LEWIS, K.H. 1945. Bacterial amylases production on wheat bran. Ind. Eng. Chem. 37(7): 692 - 696.
- BEEBE, J.L. & UMBRETT, W.W. 1971. Extracellular lipid of *Thiobacillus thiooxidans*. J. Bacteriol. 108(1): 612 - 614.
- BENZ, G. & ALTWEGG, A. 1975. Safety of *Bacillus thuringiensis* for earthworm. J. Invertebr. Pathol. 26: 125 - 126.

- BFNZ, G. & BORUSTEWICZ, K. 1963. A method for the differential staining of spores and parasporal bodies of *Bacillus thuringiensis* Berliner, and *Bacillus feibourgensis* Wille. *J. Insect Pathol.* 5: 393 - 394.
- BERG, R. & PETERSON, G. 1977. Location and formation of cellulases in *Trichoderma viridae*. *J. Appl. Bacteriol.* 42: 65 - 75.
- BIOASSAY of *Bacillus thuringiensis* (Berliner) delta-endotoxin using the tobacco budworm. Washington, USDA, 1976. 15p. (Technical Bulletin, 1528).
- BLANCHÈRE, H. et al. 1973. Etude de la formulation et de la conservation d'une préparation entomopathogène à base de blastospores de *Beauveria tenella* (Delacr. Sieniaszko). *Ann. Zool. Ecol. Anim.* 5(1): 69 - 79.
- BORZANI, W. et al. 1972. Sieving method for the determination of mold concentration in heterogeneous culture media. *Biotechnol. Bioeng.* 14(2): 273 - 277.
- BOUDREAUX, D.P. & SRINIVASAN, V.R. 1981. A continuous culture study of growth of *Bacillus cereus* T. *J. Gen. Microbiol.* 122: 129 - 134.
- BRTGGS, J.D. 1963. Commercial production of insect pathogens. In: STEINHAUS, E.A., ed. *Insect Pathology - An Advanced*

Treatise. New York, Academic Press. V. 2, p. 519 - 548.

BUCHER, G.F.; ANGUS, T.A.; KRYWIENCZYK, J. 1966. Characteristics of a new strain of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner (serotype I) isolated from the bumblebee wax moth. *J. Invertebr. Pathol.* 8(4): 485 - 491.

BUDIATMAN, S. & LONSANE, B.K. 1987. Cassava fibrous waste residues: a substitute to wheat bran in solid state fermentation. *Biotechnol. Lett.* 9(8): 597 - 600.

BULLA Jr., L.A. & YOSTEN, A.A. 1979. Bacterial insecticides. *Econ. Microbiol.* 4: 91 - 114.

BULLA Jr., L.A. et al. 1969. Scanning electron and phase-contrast microscopy of bacterial spores. *Appl. Microbiol.* 18(3): 490 - 495.

..... 1980. Ultrastructure, physiology, and biochemistry of *Bacillus thuringiensis*. *Crit. Rev. Microbiol.* 8(2): 147 - 204.

BURGERJON, A. & GRISON, P. 1959. Sensibilité de différents lépidoptères à la souche "Anduze" de *Bacillus thuringiensis* Berliner. *Entomophaga*, 4(3): 207 - 209.

BURGESS, B.D. 1966. The standardization of products based on *Bacillus thuringiensis*. *Meded. Rijksfac - Landbouwwet Gent.* 31 (3): 534.

BURGES, H.D. 1967. Standardization of *Bacillus thuringiensis* products: homology of the standard. *Nature*, 215: 664.

..... 1969. Control of insects by *Bacillus thuringiensis*. In: BRITISH INSECTICIDE AND FUNGICIDE CONFERENCE, 5., Brighton, 1969. Proceedings. Croydon, British Crop Protection Council, p. 405 - 411.

..... 1982. Control of insects by bacteria. *Parasitology* 84(1): 79 - 117.

BURGES, H.D. & BAILEY, L. 1968. Control of the greater and lesser wax moths (*Galleria mellonella* and *Achroia grisella*) with *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* 11(2): 184.

BURGES, H.D. & HALL, R.A. 1982. Bacteria and fungi as insecticides. *Outlook on Agric.* 11(2): 79 - 86.

BURGES, H.D. et al. 1966. The standardization of *Bacillus thuringiensis*: tests on three candidate reference materials. In: INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON INSECT PATHOLOGY AND MICROBIAL CONTROL, Wageningen, The Netherlands. Proceedings, p. 314 - 338.

..... 1982. Numbering the H-serotypes of *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* 40: 419.

- RUSSA, F.F. et al. 1984. Colony count methods. In: SPECK, H.L., ed. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 2. ed. Washington, SPECK, H.L. Cap. 4, p. 62 - 83.
- CAMARGO, L.N.P.C.A. 1983. Desenvolvimento do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin em diferentes meios de cultura naturais sólidos. *O Biológico (São Paulo)*, 49: 107 - 109.
- CAMPO, C.B.H.; OLIVEIRA, E.B.; MOSCARDI, F. 1985. Criação massal da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*). Londrina, EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa da Soja. 23p. (EMBRAPA-CNPSO. Documentos, 10)
- CANNEL, E. & MOO YOUNG, M. 1977. Solid-state fermentation systems. *Process Biochem.* 15(5): 2 - 7.
- CAPALBO, D.M.F. 1984. Dados não publicados.
- CAPALBO, D.M.F. & MORAES, I.O. 1984. Study of continuous fermentation for obtaining bacterial insecticide to control agricultural pests. In: JAPAN-BRAZIL SYMPOSIUM ON SCIENCE AND TECHNOLOGY. 4., São Paulo, 1984. Anais. São Paulo, Academia de Ciências do Estado de São Paulo. V. 2, p. 248 - 255.
- CARRIZALEZ, V.; RODRÍGUEZ, H.; SARDINA, I. 1981. Determination of the specific growth of molds on semi-solid cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 23: 321 - 333.

- CHAHAL, D.S. 1985. Solid-state fermentation with *Trichoderma reesei* production. *Appl. Environ. Microbiol.* 49(1): 205 - 210.
- CHAHAL, D.S. & MOO-YOUNG, M. 1981. Bioconversion of lignocellulosis into animal feed with *Chaetomium cellulolyticum*. *Dev. Ind. Microbiol.* 22:143 - 159.
- CHANDRASEKARAN, A. & SHANTHAMMA, M.S. 1969. A new technique for the economic production of cellulase. *J. Food Sci. Technol.* 6: 12 - 14.
- CHARNEY, J.; FISHER, W.P.; HEGARTY, C.P. 1951. Manganese as an essential element for sporulation in the genus *Bacillus*. *J. Bacteriol.* 62: 145 - 148.
- COCHET, N.; NONUS, M.; LEBEAULT, J.M. 1988. Solid-state fermentation of sugar-beet. *Biotechnol. Lett.* 10(7): 491 - 496.
- CONNER, R.M. & HANSEN, P.A. 1967. Effect of valine, leucine and isoleucine on the production of fly toxin by *Bacillus thuringiensis* and related organisms. *J. Invertebr. Pathol.* 9: 114 - 125.
- COOKSEY, K.E. 1973. The protein crystal toxin of *Bacillus thuringiensis*: biochemistry and mode of action. In: BURGES, H.D. & HUSSEY, N.W., ed. *Microbial control of insects and mites*. London, Academic Press. p. 247 - 274.

- COSTERTON, J.W.; INGRAM, J.M.; CHENG, K.J. 1974. Structure and function of the cell envelope of gram-negative bacteria. *Bacteriol. Rev.* 38(1): 87 - 110.
- COUCH, T.L. & IGNOFFO, C.N. 1981. Formulation of insect pathogens. In: BURGESS, H.D., ed. *Microbial control of pests and plant diseases 1970 - 1980.*, London, Academic Press. Cap. 34, p. 621 - 634.
- COUCH, T.L. & ROSS, D.A. 1980. Production and utilization of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnol. Bioeng.* 22(7): 1295 - 1334.
- COUSIN, M.A. 1980. Converting food processing wastes into food or feed through microbial fermentation. *Annu. Rep. Ferment. Process.* 4: 31 - 65.
- CROSBY, W.H.; GREENE, R.A.; SLEPECKY, R.A. 1971. The relationship of metal content to dormancy, germination and sporulation in *Bacillus megaterium*. In: BARKER, G.W. & WOLF, J. *Spore Research.* London, Academic Press. p. 143 - 160.
- CURRAN, H.R. & EVANS, F.R. 1954. The influence of iron or manganese upon the formation of spores by mesophilic aerobes in fluid organic media. *J. Bacteriol.* 67: 489 - 497.
- DAVIS, G.R. & SMITH, J.D. 1977. Effect of temperature on production of fungal metabolites toxic to larvae of *Ianobryon mollitor*. *J. Invertebr. Pathol.* 30: 325 - 329.

- DAY, D.F. & YAPHE, W. 1975. Enzymatic hydrolysis of agar: purification and characterization of neoagarobiose hydrolase and p-nitrophenyl alfa-galactoside hydrolase. *Can. J. Microbiol.* 21: 1513 - 1518.
- DE BARJAC, H. 1981. Identification of H-serotypes of *Bacillus thuringiensis*. In: BURGESS, H.D., ed. *Microbial control of pests and plant diseases 1970 - 1980*. London, Academic Press. p. 35 - 43.
- DE BARJAC, H. & RONNEFOI, A. 1968. A classification of strains of *Bacillus thuringiensis* Berliner with a key to their differentiation. *J. Invertebr. Pathol.* 11: 335 - 347.
- DE BARJAC, H. & BURGERJON, A. 1972. Standardization of products derived from *Bacillus thuringiensis*. In: *MICROBIAL CONTROL OF INSECTS SEMINAR*, Helsinki, 1971. Helsinki, International Organization for Biotechnology and Bioengineering. 32p.
- DHARNSTHITI, S.C.; PANTUMATANA, S.; BHUMIRATANA, A. 1985. Production of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* strain 1593 on media using a by-product from a monosodium glutamate factory. *J. Invertebr. Pathol.* 46: 231 - 238.
- DIETZ, A. 1981. Crystal production by micro-organisms. *Microscope*, 29(2): 71 - 76.

- DUBOTS, N.R. 1968. Laboratory batch production of *Bacillus thuringiensis* spores and crystals. *Appl. Microbiol.* 16: 1098-1099.
- DILMAGE, H.T. 1970a. Insecticidal activity of HD-1, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *alesti*. *J. Invertebr. Pathol.* 15 : 232 - 239.
- _____. 1970b. Production of spore-delta-endotoxin complex by variants of *Bacillus thuringiensis* in two fermentation media. *J. Inv. Pathol.* 16: 385 - 389.
- _____. 1971. Production of delta-endotoxin by eighteen isolates of *Bacillus thuringiensis*, serotype 3, in 3 fermentation media. *J. Invertebr. Pathol.* 19: 353 - 358.
- _____. 1973. Assay and standardization of microbial insecticides. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 217: 187 - 199.
- _____. 1981. Insecticidal activity of isolates of *Bacillus thuringiensis* and their potential for pest control. In: BURGESS, H.D., ed. *Microbial control of pests and plant diseases 1970 - 1980*. London, Academic Press, p. 193 - 222.
- DILMAGE, H.T. & RHODES, R.A. 1971. Production of pathogens in artificial media. In: BURGESS, H.D. & HUSSEY, N.W. ed. *Microbial control of insects and mites*. London, Academic Press. Cap. 24, p. 507 - 540.

DULMAGE, H.T.; CORREA, J.A.; MARTINEZ, A. 1970. Coprecipitation with lactose as a mean of recovering the spore-crystal complex of *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* 15(1): 15 - 20.

DULMAGE, H.T.; GRAHAM, H.N.; MARTINEZ, E. 1978. Interactions between the tobacco budworm, *Heliothis virescens* and the delta-endotoxin produced by the HD-1 isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*: relationship between length of exposure to the toxin and survival. *J. Invertebr. Pathol.* 32(1): 40 - 50.

DULMAGE, H.T. et al. 1971a. A proposed standardized bioassay for formulation of *Bacillus thuringiensis* based on the International Unit. *J. Invertebr. Pathol.* 18: 240 - 245.

..... 1971b. Field tests with the HD-1 formulation of the delta-endotoxins of *Bacillus thuringiensis* against the cabbage looper on cabbage. *J. Econ. Entom.* 64: 1421.

ENGLER, R. & ROGOFF, M.H. 1980. Registration and regulation of microbial pesticides. *Biotechnol. Bioeng.* 22: 1441 - 1448.

ERICKSON, K.E. 1978. Enzyme mechanisms involved in cellulose hydrolysis by the rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. *Biotechnol. Bioeng.* 20: 317 - 332.

- FAST, P.G. 1972. The delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis*.
 III. A rapid method for separating parasporal bodies from
 spores. *J. Invertebr. Pathol.* 20(1): 139 - 140.
- 1981. The crystal toxin of *Bacillus thuringiensis*.
 In: BURGESS, H.D., ed. *Microbial control of pests and plant
 diseases 1970 - 1980*. London, Academic Press. p. 223 - 248.
- FAST, P.G. & DONAGHUE, T.P. 1971. The delta-endotoxin of *Bacillus
 thuringiensis*. II. On the mode of action. *J. Invertebr.
 Pathol.* 18: 135 - 138.
- FAUST, R.M. & DOUGHERTY, E. M. 1969. Effects of the *Bacillus
 thuringiensis* delta-endotoxin produced by *Bacillus
 thuringiensis* var. *dendrolimae* on the hemolymph of the silk-
 worm *Bombix mori*. *J. Invertebr. Pathol.* 13: 155 - 157.
- FERNANDEZ, W.L.; OCAMPO, T.A.; PEREZ, D.C. 1975. Coconut water in
 three media reduces cell yield of *Bacillus thuringiensis* var.
thuringiensis Berliner. *Philipp. Agric.* 58(7/8): 273 - 279.
- FIGUETREDO, H.R.; COUTINHO, J.M.; ORLANDO, A. 1960. Novas
 perspectivas para o controle biológico de algumas pragas com
Bacillus thuringiensis. *Arq. Inst. Biol., São Paulo*, 27: 77 -
 85.
- FISHER, R.A. 1963. Bioassay of microbial pesticides. In: ZWEIG,
 G., ed. *Analytical methods for pesticides, plant growth*

regulators and food additives. New York, Academic Press. V. 1, p. 425 - 442.

FOGARTY, W.N. & WARD, D.P. 1974. Pectinases and pectic polysaccharides. *Prog. Ind. Microbiol.* 13: 59 - 119.

FOSTER, J.W. 1956. Morphogenesis in bacteria: some aspects of spore formation. *Q. Rev. Biol.* 31: 102 - 118.

FOSTER, J.W. & HEILIGMAN, F. 1949. Biochemical factors influencing sporulation in a strain of *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.* 57: 639 - 646.

GALLEGOS, M.G. et al. 1984. Produccion y toxicidad de *Bacillus thuringiensis* GM-1 y GM-2 crecido en medios con melazas o subproductos azucareros. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 26(2): 151.

GHILDYAL, N.P. et al. 1981. Large scale production of pectolytic enzyme by solid state fermentation. *J. Food Sci. Technol.* 18: 248 - 251.

..... 1985. Economics of submerged and solid state fermentation for the production of amyloglucosidase. *J. Food Sci. Technol.* 22: 171 - 176.

GIBBONS, W.R.; WESTBY, C.A.; DOBBS, T.L. 1984. A continuous farm-scale, solid-phase fermentation process for fuel ethanol and protein feed production from fodder beets. *Biotechnol.*

Bioeng. 26(9): 1098 - 1107.

GOLDBERG, J. et al. 1980. Optimization of a medium for a high yield production of spore-crystal preparation of *Bacillus thuringiensis* effective against the egyptian cotton leaf worm *Spodoptera littoralis* Bois. *Biotechnol. Lett.* 2(10): 419 - 426.

GUARILIMI, P.; MARQUES, E. J.; VILAS BOAS, A. M. 1974. Contribuição ao estudo da cultura e aplicação de *Metarrhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin no controle da cigarrinha-da-folha *Mahanarva posticata* (Stal) no nordeste do Brasil. Recife, Comissão Executiva de Defesa Fitossanitária da Lavoura Canavieira de Pernambuco. 57p. (CODECAP. Boletim Técnico, 3).

HABIB, M. E. E. M. & ANDRADE, C. F. S. 1986. Bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S. B., coord. *Controle Microbiano de Insetos*. São Paulo, Editora Manole. Cap. 7, p. 127 - 170.

HALL, R. A. & PAPIEROK, B. 1982. Fungi as biological control agents of arthropods of agricultural and medical importance. *Parasitology*, 84: 205 - 240.

HAN, Y. N. & ANDERSON, A. W. 1975. Semisolid fermentation of ryegrass straw. *Appl. Microbiol.* 30(6): 930 - 934.

- HANG, Y.D. & WOODANS, E.E. 1987. Effect of substrate moisture content on fungal production of citric acid in a solid state fermentation system. *Biotechnol. Lett.* 9(3): 183 - 186.
- HEIMPFL, A.M. 1971. Safety of insect pathogens for man and vertebrates. In: BURGESS, H.D. & HUSSEY, N.W., ed. *Microbial control of insects and mites*. London, Academic Press. p. 469-489.
- HEIMPFL, A.M. & ANGUS, T.A. 1960. Bacterial insecticides. *Bacteriol. Rev.* 24: 266 - 288.
- 1963. Diseases caused by certain spore forming bacteria. In: STEINHAUS, E.A., ed. *Insect Pathology: an Advanced Treatise*. New York, Academic Press. p. 21 - 73.
- HERTFELN, B.C. et al. 1981a. Prospects of spore-forming bacteria for vector control with special emphasis on their local production potential. *Dev. Ind. Microbiol.* 22: 53 - 60. (General Meeting of the Society for Industrial Microbiology, 37., Proceedings, Arizona, 1981).
- 1981b. Prospects of spore-forming bacteria for vector control with special emphasis on their local production potential. In: WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO/VBC 80791. Geneva. 11p.

- HESSELTINE, C.W. 1965. A millennium of fungi, food and fermentation. *Mycology*, 57(2): 149 - 197.
- 1972. Solid state fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 14: 517 - 532.
- 1977a. Solid state fermentation. Part I. *Process Biochem.* 12(6): 24 - 27.
- 1977b. Solid state fermentation. Part II. *Process Biochem.* 12(9): 29 - 32.
- 1981. A microbe's view of fermentation. *Dev. Ind. Microbiol.* 22: 1 - 18.
- HESSELTINE, C.W. et al. 1968. Laboratory studies on the formation of aflatoxin in forages. *Mycology*, 60: 304 - 312.
- ICHISHINO, E. et al. 1973. Production of a new type of acid carboxypeptidase of molds of the *Aspergillus niger* group. *Appl. Microbiol.* 26(3): 327 - 331.
- IGNATYENKO, Y.N. et al. 1983. Effect of temperature and aeration on growth and spore formation in *Bacillus licheniformis*. *Microbiol.* 52(5): 553 - 556.
- HAG, I. & CURTIS, R.W. 1968. Production of ethylene by fungi. *Science*, 159: 1357 - 1359.

- KARAPINAR, M. & MORGAN, J. T. 1983. Effect of substrate pretreatment on microbial fermentation of olive oil solid waste. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* 8: 19 - 23.
- KENNETH, R.; MUTTATH, T. I.; GERSON, U. 1979. *Hirsutiella thompsonii*, a fungal pathogen of mites. I. Biology of the fungus "in vitro". *Ann. Appl. Biol.* 91: 21 - 28.
- KNAYSI, G. 1945a. A study of some environmental factors which control endospore formation by a strain of *Bacillus mycoides*. *J. Bacteriol.* 49: 473 - 493.
- 1945b. Investigation of the existence and nature of reverse material in the endospore of a strain of *Bacillus mycoides* by an indirect method. *J. Bacteriol.* 49: 417 - 422.
- KOLODZIEJ, B. J. & SLEPECKY, B. A. 1964. Trace metal requirements for sporulation of *Bacillus megaterium*. *J. Bacteriol.* 88(4): 821 - 830.
- KRISHNASWAMY, M. A. et al. 1976. Production of fungal rennet substitute for cheese making. *J. Food. Sci. Technol.* 13: 187-191.
- KRISHNA-MURTY, G. G. & HAI VORSON, H. O. 1957. Effect of enzyme inhibitors on the germination and respiration of and growth from *Bacillus cereus* var. *terminalis* spores. *J. Bacteriol.* 73: 230 - 234.

- KUMAR, P.K.R. & LONSANE, B.K. 1987. Potential of fed-batch culture in solid state fermentation for production of gibberelic acid. *Biotechnol. Lett.* 9(3): 179 - 182.
- LAKSHMINARAYANA, K. et al. 1975. A solid state fermentation method for citric acid production using sugar cane bagasse. *Biotechnol. Bioeng.* 17: 291 - 293.
- LANDERS, K.E.; DAVIS, W.D.; DIENER, U.L. 1967. Influence of atmospheric gases on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in peanuts. *Phytopathology*, 57: 1086 - 1090.
- LATGE, J.P.; SOPER, R.S.; MADORE, C.D. 1977. Media suitable for industrial production of *Entomophthora virulenta* zygospores. *Biotechnol. Bioeng.* 19: 1207 - 1214.
- LAUKEVICS, J.J. et al. 1984. Solid substrate fermentation of wheat straw to fungal protein. *Biotechnol. Bioeng.* 26(12): 1465 - 1474.
- LECADET, M.M. 1970. *Bacillus thuringiensis* toxins - The proteinaceous crystal. In: MONTIE, T.C., KADIS, S. and AJE, S., ed. *Microbial toxins*. New York, Academic Press. V. 3, p. 437 - 471.
- LEE, H.H.; LEE, J.J.; SUH, J.H. 1986. Studies on the development of the *Bacillus thuringiensis* pesticide. Media compositions for the endotoxin production by *Bacillus*

- Thuringiensis* var. *israelensis*. Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng. 14(4): 329 - 334.
- LEWIS, J.A. & PAPAVIDAS, G.C. 1983. Production of chlamydospores and conidia by *Trichoderma* spp. in liquid and solid growth media. Soil Biol. Biochem. 15(3): 351 - 357.
- LINDENFELSER, L.A. & CIEGLER, A. 1975. Solid-substrate fermentor for ochratoxin A production. Appl. Microbiol. 29(3): 323 - 327.
- LONSANF, B.K. et al. 1985. Engineering aspects of solid state fermentation. Enzyme Microbiol. Technol. 7: 258 - 265.
- LUTHY, P. 1980. Insecticidal toxins of *Bacillus thuringiensis*. Fed. Eur. Microb. Soc. Microbiol. Lett. 8: 1 - 7.
- MACRIS, B.J. et al. 1987. Solid state fermentation of straw with *Neurospora crassa* for CMCase and beta-glucosidase production. Biotechnol. Lett. 9(9): 661 - 664.
- MAJUMDER, S.K. & PADMA, M.C. 1957. Screening of carbohydrate for sporulation of bacilli in fluid medium. Can. J. Microbiol. 3: 639 - 642.
- MANFREDINI, R. & WANG, D.I.C. 1972. Simple method for determining cell and hydrocarbon concentration during fermentation. Biotechnol. Bioeng. 14: 267 - 271.

- MARTIN, S.M. & SO, U. 1969. Solubilization of autoclaved feathers and wool by myxobacteria. *Can. J. Microbiol.* 15: 1393 - 1397.
- MAXHAM, J.V. & MAIER, W.J. 1978. Bacterial growth on organic polymers. *Biotechnol. Bioeng.* 20: 865 - 898.
- MENEZES, T.J.B.; SANTOS, C.L.M.dos; AZZINI, A. 1983. Saccharification of bamboo carbohydrates for the production of ethanol. *Biotechnol. Bioeng.* 25: 1071 - 1082.
- MCCOY, C.W. & COUCH, T.L. 1978. *Hirsutella thompsonii*: a potential mycoacaricide. *Dev. Ind. Microbiol.* 20: 89 - 96.
- BOND-SALLEN, H.B.; BEEGLE, C.C.; LEWIS, J.C. 1980. Fermentation media and production of exotoxin by three varieties of *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* 35: 75 - 83.
- MOO-YOUNG, M.; MACDONALD, D.; LING, A. 1980. Sensitivity analysis of the Waterloo SCP process in agricultural waste treatment. *Can. Agric. Eng.* 22(2): 119 - 124.
- MORAES, I.O. 1973. Obtenção de inseticidas bacterianos por fermentação submersa. Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. 69 p. (Tese, Mestrado)

MORAES, I.O. 1976. Ensaio de fermentação submersa para produção de um inseticida bacteriano em mini-fermentador. Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. 76p. (Tese, Doutorado)

..... 1983. Produção industrial de *Bacillus thuringiensis*. In: BIOTECNOLOGIA APLICADA AO CONTROLE DE PRAGAS POR PATÓGENOS. Curso. Campinas.

MORAES, I.O. & CAPALBO, D.M.F. 1986a. Produção de bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S.B., coord. Controle Microbiano de Insetos. São Paulo, Editora Manole. Cap. 16, p. 297 - 310.

..... 1986b. Agroindustrial residues as a medium for growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis*. In: SIMPÓSIO ANUAL DA ACADEMIA DE CIÊNCIAS DO ESTADO DE SÃO PAULO, 11., São Paulo, 1986. Anais. São Paulo, Academia de Ciências do Estado de São Paulo, p. 195 - 202. (ACIESP, 51-52).

MORAES, I.O. & CHAIB, M.A. 1978. Bioassay for microbial insecticide. *Process Biochem.* 13(10): 23.

MORAES, I.O.; SANTANA, H.H.A.; HOKKA, C.O. 1980. The influence of oxygen concentration on microbial insecticide production. In: ADVANCES in Biotechnology. London, Pergamon Press. V. 1, p. 75 - 79 (Sixth International Fermentation Symposium, Proceedings).

MURRELL, W.G. 1961. Spore formation and germination as a microbial reaction to the environment, 1961. In: SYMPOSIUM OF THE SOCIETY FOR GENERAL MICROBIOLOGY, 11., Cambridge, p. 100 - 150.

NAGAMMA, H.V.; RAGUNATHAN, A.N.; RAJUMDER, S.K. 1972. A new medium for *Bacillus thuringiensis* Berliner. J. Appl. Bacteriol. 35: 367 - 370.

NAGANATSU, Y. et al. 1978. Subunit structure and toxic component of delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. J. Invertebr. Pathol. 32(1): 103 - 109.

NESSE, N.; WALLICK, J.; HARPER, J.M. 1977. Pretreatment of cellulosic wastes to increase enzyme reactivity. Biotechnol. Bioeng. 19: 323 - 336.

NICKERSON, K.W. & BULLA Jr., L.A. 1974. Physiology of sporeforming bacteria associated with insects: minimal nutritional requirements for growth, sporulation and parasporal crystal formation of *Bacillus thuringiensis*. Appl. Microbiol. 28(1): 124 - 128.

..... 1975. Lipid metabolism during bacterial growth sporulation and germination: an obligate nutritional requirement in *Bacillus thuringiensis* for compounds that stimulate fatty acid synthesis. J. Bacteriol. 123(2): 598-603.

- NICKERSON, K.W.; DE PINTO, J.; BULLA Jr., L.A. 1974a. Sporulation of *Bacillus thuringiensis* without concurrent derepression of the tricarboxylic acid cycle. *J. Bacteriol.* 17(1): 321 - 323.
- NIGAM, P. & VOGEL, M. 1986. Selection of preculture conditions for solid state fermentation of sugar beet pulp. *Biotechnol. Lett.* 10(10): 755 - 758.
- NISHIO, N.; TAJ, K.; NAGAI, S. 1979. Hydrolase production by *Aspergillus niger* in solid-state cultivation. *Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 8: 263 - 270.
- NORTHOLT, M.D. & BULLERMAN, L.B. 1982. Prevention of mold growth and toxin production through control of environmental conditions. *J. Food Protect.* 45(6): 519 - 526.
- OGLESBY, R.T.; CHRISTMAN, R.F.; DRIVER, C.H. 1967. The biotransformation of lignin to humus - facts and postulates. *Adv. Appl. Microbiol.* 9: 171 - 184.
- ORIOI, F. et al. 1988. Solid-state culture of *Aspergillus niger* on support. *J. Ferment. Technol.* 66(1): 57 - 62.
- PANNENT, M. et al. 1978. Solid-state cultivation of *Chaetomium cellulolyticum* on alkali-pretreated sawdust. *Biotechnol. Bioeng.* 20: 1735 - 1744.

- PAPAIVIZAS, G.C., et al. 1984. Liquid fermentation technology for experimental production of biocontrol fungi. *Phytophatology*, 74(10): 1171 - 1175.
- PARK, Y.K. & RIVERA, B.C. 1982. Alcohol production from various enzyme-converted starches with or without cooking. *Biotechnol. Bioeng.* 24: 495 - 500.
- PEARSON, D. & WARD, O.P. 1987. Purification of the parasporal crystals of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and development of a novel bioassay technique. *Biotechnol. Lett.* 9(11): 771 - 776.
- 1988. Effect of culture conditions on growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and development of media for production of the protein crystal endotoxin. *Biotechnol. Lett.* 10(7): 451 - 456.
- PEKIN, B. 1983. General concepts of waste utilization for the production of microbial biomass and bio-energy. *NATO Adv. Stu. Inst. Series. Serie A. Life Sci.* 67: 309 - 364.
- PENALOZA, W. et al. 1985. Solid-state fermentation: an alternative to improve the nutritive value of coffee pulp. *Appl. Environ. Microbiol.* 49(2): 388 - 393.
- PEREZ, M. & GONZALEZ, F. 1984. Estudio comparativo de los medios líquidos para la reproducción de *Bacillus thuringiensis* variedad *thuringiensis*. *Cienc. Tec. Agríc.: Prot. plantas*

7(1): 75 - 80.

PEREZ, M.; GONZALEZ, F.; CASTAÑEDA, I. 1982. Medios líquidos para la reproducción de *Bacillus thuringiensis* variedad *thuringiensis*. *Cienc. Tec. Agric.: Prot. plantas*. 5(2): 17-23.

PEREZ, M. et al. 1983. Reproducción de *Bacillus thuringiensis* variedad *dendrolimus* comparando en tres medios líquidos el polvo de yuca y el de boniato como fuente de carbohidratos. *Cienc. Tec. Agric.: Prot. plantas*. 6(4): 21 - 30.

POWELL, M.S. & SLATER, N.K.H. 1983. The deposition of bacterium cells from laminar flows onto solid surfaces. *Biotechnol. Bioeng.* 25: 891 - 900.

A PRELIMINARY study on the cultivation of *Entomophthora* aphids and its use to control cotton aphids (*Aphis gossypii*) in the field. 1974. *Acta Entomologica Sinica* 19(1): 63 - 66.

RATNBULT, M. 1987. Comunicação pessoal.

RATNBULT, M. & ALAZARD, D. 1980. Culture method to study fungal growth in solid fermentation. *Eur. J. Appl. Microbiol.* 9: 199 - 209.

RANAKRISHNA, S.V. et al. 1982. Recovery of amyloglucosidase from moldy bran. *Indian J. Technol.* 20: 476 - 480.

- RAMESH, M.V. & LONSANE, B.K. 1987. Solid state fermentation for production of alfa-amilase by *Bacillus megaterium* 16M. *Biotechnol. Lett.* 9(5): 323 - 328.
- RAMSTACK, J.N.; LANCASTER, E.B.; BOTHAST, R.J. 1979. Gas chromatographic headspace analysis of solid substrate fermentations. *Process Biochem.* 4: 2 - 4.
- RAO, M.N. et al. 1983. Solid-state fermentation for cellulase production by *Pestalotiopsis versicolor*. *Biotechnol. Bioeng.* 25: 869 - 872.
- RATHBUN, B.J. & SHULER, M.L. 1983. Heat and mass transfer effects in static solid-substrate fermentations: design of fermentation chambers. *Biotechnol. Bioeng.* 25: 727 - 736.
- REICHELDERFER, C.F. 1985. Biological assays with insect pathogens. In: MANDAVA, N.B., ed. *CRC Handbook of natural pesticides: methods*. Boca Raton, CRC Press. V. 1, p. 489 - 518.
- REISER, C.O. 1954. *Torula* yeast from potato starch wastes. *Agric. Food Chem.* 2: 70 - 74.
- RIBIER, J. & LECADET, M.M. 1973. Étude ultrastructurale et cinétique de la sporulation de *Bacillus thuringiensis* var. Berliner. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)* 124A: 311.

- ROGOFF, M.H. & YOSTEN, A.A. 1969. *Bacillus thuringiensis*: microbiological considerations. *AnnU. Rev. Microbiol.* 23: 357 - 386.
- ROGOFF, M.H. et al. 1969. Insecticidal activity of thirty-one strains of *Bacillus* against five insect species. *J. Invertebr. Pathol.* 14: 122 - 129.
- RUSSEL, R.M.; ROBERTSON, J.L.; SAVIN, N.E. 1977. POLO: A new computer program for probit analysis. *Bull. Entomol. Soc. Am. (USA)* 23(3): 209 - 213.
- SALA, F.J. & BURGOS, J. 1972. Simple method for mass production and collection of conidia from *Metaspora stellata*. *Appl. Microbiol.* 24(3): 504 - 505.
- SALAMA, H.S. 1984. *Bacillus thuringiensis* Berliner and its role as a biological control agent in Egypt. *Z. Ang. Entomol.* 98(2): 206 - 220.
- SALAMA, H.S. et al. 1983a. Novel fermentation media for production of delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* 41: 8 - 19.
- _____ 1983b. A novel approach for whey recycling in production of bacterial insecticides. *Entomophaga*, 28(2): 151-160.

- SALAH, H.S. et al. 1983c. Utilization of fodder yeast and agro-industrial by-products in production of spores and biologically-active endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *Zentralbl. Mikrobiol.* 138(7): 553 - 563.
- 1983d. Persistence of *Bacillus thuringiensis* Berliner spores in cotton cultivations. *Z. Angew. Entomol.* 95(4): 321 - 326.
- SANSING, G.A. & DIEGLER, A. 1973. Mass propagation of conidia from several *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Appl. Microbiol.* 26(5): 830 - 831.
- SANTANA, M.H. A. 1980. Estudo da aeração e agitação na fermentação com *Bacillus thuringiensis*. Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. 73p. (Tese, Mestrado)
- SATO, K.; NAGATANI, M.; SATO, S. 1982. A method of supplying moisture to the medium in a solid-state culture with forced aeration. *J. Ferment. Technol.* 60(6): 607 - 610.
- SCHERRER, P.; LUTHY, P.; TRUNP, B. 1973. Production of delta-endotoxin by *Bacillus thuringiensis* as a function of glucose concentrations. *Appl. Microbiol.* 25(4): 644 - 666.
- SCHULZE, K.L. 1962. Continuous thermophilic composting. *Appl. Microbiol.* 10: 108 - 122.

- SHOTWELL, O.L. et al. 1966. Production of aflatoxin on rice. *Appl. Microbiol.* 14(3): 425 - 428.
- SILMAN, R.W. 1980. Enzyme formation during solid-substrate fermentation in rotating vessels. *Biotechnol. Bioeng.* 22: 411 - 420.
- SILMAN, R.W. et al. 1979. Production of aflatoxin in corn by a large-scale solid-substrate fermentation process. *Biotechnol. Bioeng.* 21: 1799 - 1808.
- SINGER, S.; GOODMAN, N.S.; ROGOFF, M.H. 1966. Defined media for the study of bacilli pathogenic to insects. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 139: 16 - 23.
- SINGH, K.; SENGUPTA, S.N.; VEJINA, C. 1960. Large scale transformation of steroids by fungal spores. *Appl. Microbiol.* 16(2): 393 - 400.
- SLEPECKY, R. & FOSTER, J.W. 1959. Alterations in metal content of spores of *Bacillus megaterium* and the effect on some spore properties. *J. Bacteriol.* 78: 117 - 123.
- SMIRNOFF, M.A. 1962. A staining method for differentiating spores, crystals and cells of *Bacillus thuringiensis* (Berliner). *J. Insect Pathol.* 4: 384 - 386.
- 1963. The formation of crystals in *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner before sporulation,

at low temperature incubation. *J. Insect Pathol.* 5(2): 242 - 250.

SMITH, R.A.. 1982. Effect of strain and medium variation on mosquito toxin production by *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Can. J. Microbiol.* 28(9): 1089 - 1072.

SOBCKOVICZ, G. 1976. Yeast from molasses. In: Birch, G.G., Parker, K.J., WORGAN, J.T. Food from waste. London, Applied Science. p. 42 - 57.

SOMMERVILLE, H.J. 1971. Formation of the parasporal inclusion of *Bacillus thuringiensis*. *Eur. J. Biochem.* 18: 226- 237.

..... 1978. Insect toxin in spores and protein crystals of *Bacillus thuringiensis*. *Trends Biochem. Sci.* 3: 108 - 110.

SOPER, R.S. & WARD, M.G. 1981. Production, formulation and application of fungi for insect control. In: PAPAIVIZAS, G. C., ed. Biological control in crop production. Totowa, Allanheld & Osmun. Cap. 12, p. 161 - 180. (BARC Symposium, 5).

SRIKANTA, S. et al. 1978. Reduction of proteolytic activity of the milk clotting enzyme from *Rhizopus oligosporus*. *J. Food Sci. Technol.* 15: 93 - 96.

- SRINIVASAN, M.C. 1977. Cellulose - a source of single cell protein production. Chem. Ind. Dev. 11(6): 26 - 30.
- STEWART, B.T. & HALVORSON, H.D. 1953. Studies on the spores of aerobic bacteria. I. The occurrence of alanine racemase. J. Bacteriol. 65(2): 160 - 166.
- STOLP, H. & STARR, M. 1965. Bacteriolysis. Ann. Rev. Microbiol. 19: 79 - 104.
- STUBBLEFIELD, R.D. et al. 1967. Production of aflatoxin on wheat and oats: measurement with a recording densitometer. Appl. Microbiol. 15(1): 186 - 190.
- SUBA, K.; van DEDEM, G.; MOO-YOUNG, M. 1975. Enzymatic breakdown of water insoluble substrates. Biotechnol. Bioeng. 17: 185 - 201.
- SUTTER, G.R. & RAUN, E.S. 1966. The effect of *Bacillus thuringiensis* components on the development of the european corn borer. J. Invertebr. Pathol. 8: 457 - 460.
- TAKAKINE, J. 1914. Enzymes of *Aspergillus oryzae* and the application of its amyloglycolytic enzyme to the fermentation industry. J. Ind. Eng. Chem. 6(10): 824 - 828.
- TENGERDY, R.P. 1985. Solid substrate fermentation. Trends Biotechnol. 3(4): 96 - 99.

- THIEMANN, J.E. 1985. Produção de enzimas por fermentação em substrato semi-sólido com especial referência às celulases. In: SEMINÁRIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIONASSAS, 2., Maringá, 1985. Anais. Universidade Estadual de Maringá, 1987. V. 1, p. 107 - 131.
- THOMPSON, P.J. & STEVENSON, K.E. 1984. Mesophilic sporeforming aerobes. In: SPECK, M., ed. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 2.ed. Washington, American Public Health Association. Cap. 19, p. 211 - 220.
- TIMONIN, M.I.; FOGAI, W.H.; POPUSHANSKI, S.M. 1980. Possibility of using white and green muscardine fungi for control of cone and seed insect pests. Can. Entomol. 112: 849 - 854.
- TOYAMA, N. 1976. Feasibility of sugar production from agricultural and urban cellulosic wastes with *Trichoderma viride* cellulase. Biotechnol. Bioeng. Symp. 6: 207 - 219.
- ULMER, D.C.; TENDERDY, R.P.; MURPHY, V.G. 1981. Solid-state fermentation of steam-treated feedlot waste fibers with *Chaetomium cellulolyticum*. Biotechnol. Bioeng. Symp. 11: 449-461.
- URDEEN, A.H. & LACEY, L.A. 1982. Field procedures for the evaluation of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (serotype 14) against black flies (simuliidae) and nontarget organisms in streams. Misc. Publ. Entomol. Soc. Am. 12:25-30.

- UNDERKOFER, L.A.; FULMER, E.I.; SCHOENE, L. 1939.
Saccharification of starchy grain mashes for the alcoholic
fermentation industry. *Ind. Eng. Chem.* 31(6): 734 - 738.
- UNDERKOFER, L.A.; SEVERSON, G.M.; GOERING, K.J. 1946.
Saccharification of grain mashes for alcoholic fermentation.
Ind. Eng. Chem. 38(10): 980 - 985.
- UNDERKOFER, L.A. et al. 1947. Commercial production and use
of mold bran. *Cereal Chem.* 24(1): 1 - 22.
- VASANTHA, N. & FREESE, E. 1979. The role of manganese in growth
and sporulation of *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* 112:
329 - 336.
- VEERWAL, O.S. & RANA, R.S. 1981. Effect of amethopterin on
growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* var.
thuringiensis. *Indian J. Microbiol.* 21(4): 320 - 325.
- VELANKAR, S.K. et al. 1975. Microbial growth on hydrocarbon -
some experimental results. *Biotechnol. Bioeng.* 17: 241 - 251.
- VEZINA, C.; SEHGAL, S.N.; SINGH, K. 1968. Transformation of
organic compounds by fungal spores. *Adv. Appl. Microbiol.* 10:
221 - 268.
- VIESTRUS, U.F. et al. 1981. Solid-state fermentation of wheat
straw with *Chaetomium cellulolyticum* and *Trichoderma lignorum*.

- Biotechnol. Bioeng. Symp. 11: 359 - 369.
- WAKISAKA, Y.; MASAKI, E.; NISHIMOTO, Y. 1982. Formation of crystalline delta-endotoxin or poly-beta-hydroxybutyric acid granules by asporogenous mutants of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 43(6): 1473 - 1480.
- WANG, H. L.; SWAIN, E.W.; HESSELTINE, C.W. 1975. Mass production of *Rhizopus oligosporus* spores and their application in temp fermentation. *J. Food Sci.* 40:168 - 170.
- WEINBERG, E.D. 1955. The effect of Mn and antimicrobial drugs on sporulation of *Bacillus subtilis* in nutrient broth. *J. Bacteriol.* 70: 289 - 296.
- WINDSH, M.W. & MHATRE, N.S. 1965. Microbial amylases. *Adv. Appl. Microbiol.* 7: 273.- 279.
- WINKLER, V.W.; HANSEN, G.D. & YODER, J. 1971. Immunochemical analysis of parasporal crystal digests of *Bacillus thuringiensis* as an index of insecticidal activity. *J. Invertebr. Pathol.* 18: 378 - 382.
- WODZINSKI, R.S. & COYLE, J.E. 1974. Physical state of phenanthrene for utilization by bacteria. *Appl. Microbiol.* 27(6): 1081 - 1084.

- WOOD, D.A. 1979. A method for estimating biomass of *Agaricus bisporus* in a solid substrate, composted wheat straw. *Biotechnol. Lett.* 1: 255 - 260.
- YAZDANY, S. & LASHKARI, K.B. 1975. Effect of pH on sporulation of *Bacillus stearothermophilus*. *Appl. Microbiol.* 30(1): 1-3.
- YONG, F.M. & WOOD, B.J.B. 1976. Microbial succession in experimental soy sauce fermentations. *J. Food. Technol.* 11: 525 - 536.
- YOUSTFN, A.A. & ROGOFF, M.H. 1969. Metabolism of *Bacillus thuringiensis* in relation to spore and crystal formation. *J. Bacteriol.* 100(3): 1227 - 1236.
- ZADRAZIL, F. & BRUNNERT, H. 1981. Investigation of physical parameters important for the solid state fermentation of straw by white rot fungi. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 11: 183 - 188.
- ZAMOLA, B. et al. 1981. Use of the centrifugal separation technique in manufacturing a bioinsecticide based on *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnol. Bioeng.* 23: 1079 - 1086.

APÊNDICE 1

RESÍDUOS E SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS

A fonte de proteína contida nos subprodutos de indústrias de óleos foi sempre muito usada para utilização no arrasoamento animal, segundo PFIKOTO (1973). Esse autor, tratando sobre plantas oleaginosas arbóreas, cita a utilização criteriosa de torta de oliva (contendo 1 - 2% de nitrogênio), bem como do resíduo das prensas obtido na extração do óleo de tungue, que contém cerca de 24% de proteína, além de 9,5% de cálcio e 17,6% de magnésio, entre outros sais. A torta de côco (28% material nitrogenado, 62% de celulose) e a farinha do mesocarpo do babaçu (63 - 71% de amido, e 0,8% açúcares) também se destacam pelas suas características de produção regionais, segundo o mesmo autor.

A respeito do babaçu, GONSALVES (1955) comentou que a torta (resíduo de fabricação do óleo de babaçu) é rica em proteínas (20%) e carboidratos (45%). As vantagens de sua exploração foram bastante ressaltadas por SALMITO (1977). Com respeito à torta de côco, CHATT (1953) destacou seu elevado conteúdo de matéria graxa e seu valor econômico como matéria prima inclusive para a indústria farmacêutica.

PFIKOTO (1972) discutiu a respeito de plantas oleaginosas herbáceas, e comentou o valor da casca de amendoim (5% de nitrogênio; 3,5% de sais, entre eles cálcio, fósforo e potássio) e de sua torta (46% proteína e 84% de nutrientes digeríveis pelos animais). Comentou também neste trabalho sobre o gergilim, a linhaça e a mamona, sendo que a primeira é mais interessante para ração pelo seu teor de proteínas (36%), cálcio e fósforo, enquanto a linhaça não é tão rica em sais, e a mamona apresenta

Um Grupo de Estudos vinculado ao Ministério do Interior (Grupo Executivo de Irrigação para o Desenvolvimento Agrícola - GEIDA), discutiu em alguns trabalhos, o aproveitamento de produtos e subprodutos agrícolas, e apresentou suas composições aproximadas (BRASIL, 1971a, 1971b; GRUPO, 1972a, 1972b, 1973), as quais estão resumidas no QUADRO I.

QUADRO I. Composição aproximada de alguns subprodutos da agroindústria brasileira (Adaptado de BRASIL, 1971a, 1971b; GRUPO, 1972a, 1972b, 1973).

SUBSTRATO	Composição (%)			
	Matéria graxa	Material não nitrogenado	Proteína	Cálcio
Torta de amendoim	8,0	31,0	41,0	----
Farelo de milho	1,0	---	7,5	----
Milho para ração	6,3	---	12,5	----
Farelo de arroz	15,0	41,0	12,0	0,08
Farelo de arroz desngordurado	1,0	48,0	19,0	0,11
Farelo de mamona	1,4	6,9	41,2	0,35

GOMES (1976) em seu trabalho sobre soja, apresentou alguns valores de composição de diferentes produtos e subprodutos da soja e alguns outros grãos, que são apresentados no QUADRO II. Neste QUADRO, os valores para soja foram confirmados por RHODES & FLETCHER (1969).

QUADRO II. Composição aproximada de alguns produtos e subprodutos agrícolas, resumidos a partir de dados de GOMES (1976).

PRODUTO / SUBPRODUTO	Composição (%)			
	Matéria graxa	Proteína	Celulose	Cinzas
Farinha de soja	2,15	41,07	12,32	5,50
Torta de soja	5,00-8,00	40,00-44,00	4,00-7,00	21,0-34,0
Caroço de algodão	7,41	40,29	10,84	28,63
Amendoim	7,91	46,84	5,29	24,34
Semente de girassol	7,94	23,80	28,06	27,49
Farinha de trigo integral	2,00	12,00	1,00	1,05
Fubá	0,90	8,50	0,80	---

LAVORENTI (1976) comentou que, no Brasil, os subprodutos agrícolas mais utilizados para ração animal eram, em 1976, o farelo de soja, o farelo de caroço de algodão e o de amendoim.

A respeito da obtenção do óleo de caroço de algodão, TANGO (1965, 1966) descreveu o seu processo, bem como a utilização de seus subprodutos (principalmente torta, farelo e farinha) na ração animal. Tanto TANGO (1965, 1966) como LAVORENTI (1976) comentaram que a utilização desses subprodutos era restrita, pois

exigiam uma etapa de inativação do gossipol (fator tóxico na ração animal).

Comentando sobre os subprodutos da transformação da soja, ZANGELMI (1980) salientou o conteúdo protéico do farelo (45%) e sugeriu a utilização do resíduo gerado na produção do leite de soja. Entretanto, hoje em dia sua utilização é realizada no enriquecimento de pães e sopas da merenda escolar (para o qual o leite de soja costuma ser mais utilizado em grande escala) (TRAVAGLINI et al, 1980). Outros resíduos gerados na industrialização da soja, foram estudados por AGUIRRE et al (1981) e SUGIMOTO (1974). Para incorporação à ração animal, também são muito utilizados em nosso país, as farinhas de peixe, carne, ossos e de aves, por seus altos valores de proteína, cálcio ou fósforo segundo diversos autores (GEROMEL, 1977; LANNA et al, 1979; LAVORENTI, 1976; WORGAN, 1972).

A respeito de subprodutos de abatedouro, LEINER & GASH (1973), e MANN (1962) comentaram que o aproveitamento de todas as matérias primas presentes em cada animal abatido, trás benefícios sob várias formas. A melhoria da sanidade do ambiente, o estabelecimento de indústrias secundárias e a melhoria da estrutura de presos, estão entre eles. Com referência aos diversos usos das partes dos animais abatidos, MANN (1962) comentou sobre a farinha de ossos e o conteúdo do rúmen, seco, cujo teor de proteínas atinge valores próximos a 14%, além do teor elevado de carboidratos (36%) e vitaminas, como as do complexo B.

GARGANTINI (1965) salientou que a composição da farinha de

ossos é altamente variável de acordo com o processo utilizado em sua obtenção, porém considerou razoável um conteúdo entre 1 e 5% de nitrogênio.

Discutindo sobre subprodutos gerados pelos abatedouros, LAURENTI (1976) comentou que a farinha de carne costuma ter sua composição variável, e apresentou problemas de estocagem. Segundo ele, esses dois fatores costumam restringir sua utilização. Além disso, o fator econômico é muito importante, e esse mesmo autor comentou que muitas vezes um subproduto interessante do ponto de vista nutricional pode ser rejeitado devido ao alto custo, como ocorria com frequência com a farinha de peixe.

MAIER (1981a, 1981b) e PEIXOTO (1981) compararam a utilização e desempenho dos farelos de coiza, soja, milho, arroz, sorgo e trigo, na alimentação de pintos, e concluíram que segundo critérios nutricionais, todos poderiam ser utilizados com bons resultados. O critério econômico ao final, ditaria quando utilizá-los.

CASTRO (1981) e CASTRO et al (1981), destacaram alguns produtos incorporados à ração de galinhas poedeiras: milho, farelo de côco, farinha de penas e vísceras (originárias de abatedouros avícolas), e farinha de carne e ossos, desengordurada ou não.

SKOGMAN (1976) comentou a utilização de resíduos sólidos de mandioca, batata, trigo e tapioca, na ração animal. RADLEY (1940) discutiu subprodutos da indústria de amido e comentou a

dificuldade encontrada para seu descarte ou no seu aproveitamento comercial como ração animal.

TAKAHASHI & KRONKA (1981) utilizaram farinha de crisálidas do bicho-da-seda na alimentação de suínos, em substituição ao farelo de soja, baseados principalmente na sua composição em proteínas (52%), cálcio (0,24%), fósforo (0,63%) e matéria graxa (26%), bem como na sua produção nacional, que é elevada, segundo BRANDÃO (1981).

SOUZA et al (1981b) sugeriram a utilização de resíduos de incubatório, e LUPCHINSKI et al (1978) a de cama de frango, ambos sob a forma de farinha, para incorporação à ração animal. A polpa cítrica, segundo HENDRICKSON & KESTERSON (1951, 1964, 1965) possui ainda uma composição adequada para aproveitamento. KESTERSON e BRADDOCK (1976), levando em trabalho de HENDRICKSON & KESTERSON (1951, 1964, 1965) apontaram uma composição de aproximadamente 3,5% de matéria graxa e 6,2% de proteína, valores esses comparativos com os apresentados pelo Grupo GEIDA (BRASIL, 1971a) e por CHEMISTRY (1956). Entretanto, KESTERSON e BRADDOCK (1976) sugeriram uma peletização prévia, para incorporação à ração animal.

SOUZA et al (1981a) em seu trabalho, sugeriram o aproveitamento de subprodutos da industrialização do tomate, uma vez que estes contêm cerca de 20% de proteína bruta, e 5% de sais minerais.

GADELHA (1983) e GADELHA et al (1981) sugeriram o aproveitamento do pseudo-fruto do cajueiro para ração de frangos.

A obtenção da farinha desse fruto, e sua utilização na ração animal, foram descritas por MAIA (1981). BANCO (1973) admitiu que seu uso na ração é alternativa a ser considerada, uma vez que em época de seca, a pecuária na região Nordeste (onde se concentra a produção do cajú), enfrenta anualmente sérios problemas com a alimentação de seu rebanho. Tal alternativa teria a vantagem de não exigir processo tecnológico refinado, sendo necessário apenas secagem ao sol (MAIA, 1981).

PFZZATO et al (1981) sugeriram a utilização da polpa seca de malte, obtida como subproduto da indústria de cerveja, na ração animal.

SANTANA et al (1981) trabalhando com ruminantes, testaram o resíduo de destilaria de álcool - fundo de dorna - para ração. Segundo ARAUJO et al (1982), o fundo de dorna, constituído por células de levedura decantadas, é descartado, aumentando muito a carga poluente; assim, eles sugeriram sua utilização como inóculo de outras fermentações alcoólicas a serem efetuadas pela destilaria.

MEDINA et al (1980) estudando o aproveitamento do mamão, comentou que além das sementes (úteis com fonte de óleo comestível e matéria prima para obtenção de produtos farmacêuticos), a polpa residual seca, pode ser utilizada na alimentação do gado, pois apresenta cerca de 26% de proteína, e 32% de carboidratos.

A conversão de resíduos agrícolas e de indústrias de alimentos, em proteína para alimentação humana ou animal, foi

discutida por COOPER (1976), SLONEKER (1976) e MORGAN (1976). A conversão sugerida é baseada no aproveitamento de resíduos líquidos e sólidos como substratos para o crescimento de fungos. Esses microrganismos utilizariam a matéria orgânica como fonte de energia para o crescimento, os compostos de carbono para síntese de biomassa celular, e o nitrogênio inorgânico é convertido a proteína. Além do aproveitamento como alimento humano ou animal, se estaria diminuindo a carga de poluição ambiental pela redução da BOD (demanda bioquímica de oxigênio), segundo os autores.

ROLZ & HUMPHREY (1982) em sua revisão sobre utilização de biomassa na ração animal, destacaram muitas alternativas, entre as quais: água de côco, extrato de folha de bananeira, suco da pele e polpa da banana, polpa de café, água de cozimento de carvão, efluentes de digestores anaeróbicos e resíduos de cervejarias e destilarias. Alguns destes chegaram a ser testados por diferentes autores entre eles ALIWALAS et al (1968), BALDENSPERGER et al (1985) e SISON (1977).

Também a utilização de esterco e dejetos animais vem sendo estudada e sugerida na produção de proteína unicelular ("single cell protein") ou outras formas de transformação (DAY & HARMON, 1975; HENRY & THOMSON, 1979; RHODES & ORTON, 1975; ROLZ, 1978; ROLZ & HUMPHREY, 1982; STANTON, 1978).

ASHLEY (1972) e UPDEGRAFF et al (1973) comentaram o uso de resíduos do processamento de café e destilarias de rum, como substrato para fermentação por diversos microrganismos, principalmente na região das Antilhas e América Central. O resíduo do processamento do café, seco, apresenta um conteúdo

proteico de até 15%, segundo esses autores.

A utilização dos resíduos sólidos obtidos na produção de bebidas fermentadas foi também estudado e sugerido por SHANNON & STEVENSON (1975a, 1975b) na obtenção de biomassa, visando além disso reduzir a carga poluente (BOD).

MARTELI & SOUSA (1978) e TAIK (1978, 1979, 1982) também sugeriram o aproveitamento de resíduos da indústria do açúcar e do álcool para o crescimento de *Candida utilis*, visando reduzir o potencial poluente.

CHURCH et al (1972) sugeriram a utilização de descartes do processamento da soja e do milho, para desenvolvimento de biomassa fúngica.

OYAGAKI & MATSUNOTO (1955) e STANFORD et al (1983) utilizaram resíduos de indústria de maracujá na produção de ração animal enriquecida com proteína fúngica. STANFORD (1984) e STANFORD et al (1983) obtiveram um resíduo enriquecido com a seguinte composição: proteína (21%), carboidratos totais (23%), magnésio (36 mg/100g) e cálcio (80 mg/100g).

2. Resíduos líquidos

Alguns subprodutos líquidos são igualmente descritos, uma vez que a combinação sólido e líquido poderia vir a ser interessante.

AIWALAS et al (1968) e SMITH & BULL (1976a, 1976b) utilizaram água de côco para crescimento de *Rhodotorula pilimanae* e *Saccharomyces*, respectivamente, obtendo resultados satisfatórios. PINTO & OLIVEIRA (1962) fizeram a determinação da composição da água de côco, verificando diferenças de composição entre dois tipos de frutos. A composição determinada por eles, está apresentada no QUADRO III.

QUADRO III. Composição química (g/l) da água de côco anão e de praia (adaptado de PINTO & OLIVEIRA (1962)).

COMPOSTO	Côco anão	Côco de praia
Sulfatos	0,065	0,218
Magnésio	0,050	0,0647
Cálcio	0,1345	0,1200
Potássio	0,920	1,622
Glicose	18,30	16,45
Sacarose	2,90	4,05
Proteínas	0,421	0,870

SISON (1977) também determinou a composição química da água de côco, bem como seu conteúdo em aminoácidos e vitaminas. Esses últimos valores são apresentados no QUADRO IV.

QUADRO IV. Vitaminas (*) e aminoácidos presentes na água de côco. (resumido de SISON, 1977 e ALIWALAS et al, 1968).

ácido ascórbico (*)	2,2 - 3,7 mg/ 100 ml
ácido nicotínico (*)	0,64 microgramas/ml
ácido pantotênico (*)	0,52 microgramas/ml
riboflavina (*)	0,01 microgramas/ml
ácido fólico (*)	0,003 microgramas/ml
ácido glutâmico (*)	14,5%
lisina	4,51%
ácido aspártico	3,60%
tirosina	2,83%
serina	0,91%
cisteína	1,17%

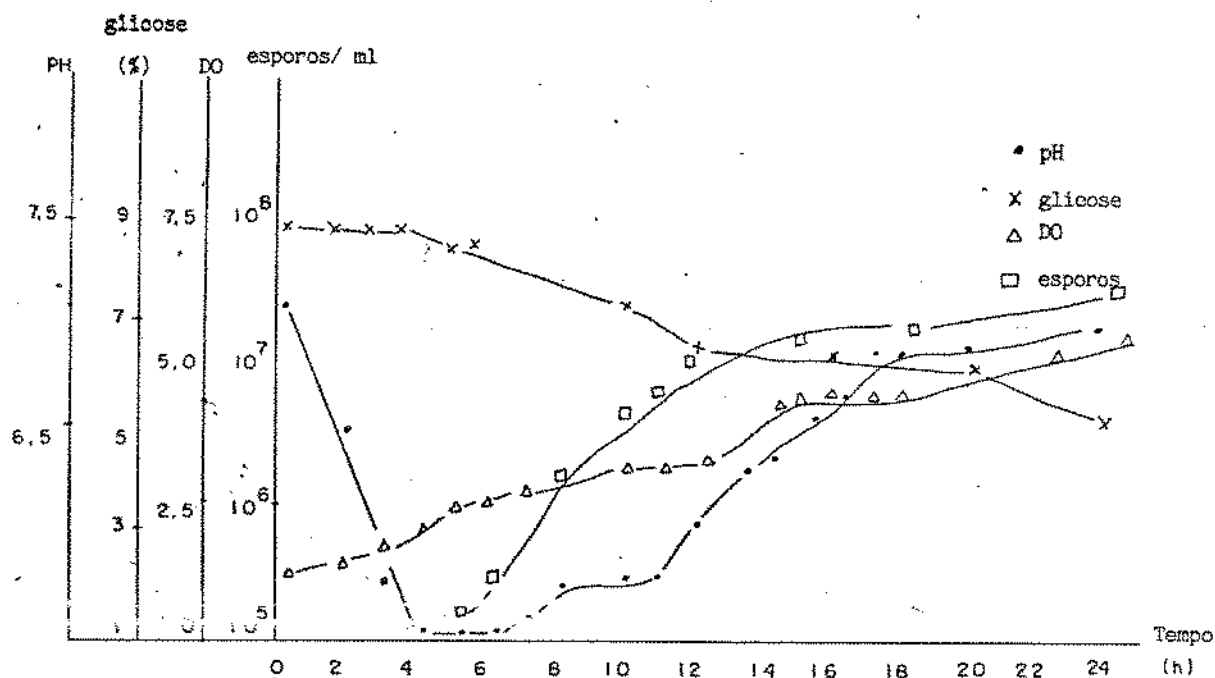
FERNANDEZ et al (1975) trabalhando com *Bacillus thuringiensis*, verificaram que a água de côco quando utilizada como diluente do meio de cultura em substituição à água comum, reduzia a esporulação. Os seus resultados podem ser observados no QUADRO V.

QUADRO V. Contagem em placas de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner / ml de meio (média de 5 repetições / série), pH não ajustado. Adaptado de FERNANDEZ et al (1975).

Meio de cultura	Contagem total	Contagem de esporos	pH
Caldo nutritivo com			
0% água de côco	$1,4 \times 10^7$	$1,4 \times 10^6$	6,6 - 6,8
50% água de côco	$3,4 \times 10^6$	$8,3 \times 10^4$	5,8 - 6,1
100% água de côco	$1,4 \times 10^6$	$8,9 \times 10^4$	5,5 - 6,0

MORAES & CAPALBO (1986) utilizaram água de côco como único constituinte do meio de cultura para crescimento de *Bacillus thuringiensis*, obtendo resultados significativos, conforme mostram as curvas da FIGURA I.

FIGURA I. Análises de pH, densidade ótica (DO), concentração de glicose e esporos formados em fermentação submersa com água de côco fresca, para *Bacillus thuringiensis* (MORAES & CAPALBO, 1986).



O soro de leite tem sido muito estudado, apresentando variações de acordo com o queijo produzido e o processo utilizado (CRAIG et al, 1978; KRASNIKOVA et al, 1982; WEISBERG & GOLDSMITH, 1969). De modo geral a composição costuma variar ao redor dos seguintes valores:

proteína	7,2 - 13,3%
cinzas	7,7 - 11,8%
lactose	63 - 72%
cálcio	0,6%
fósforo	0,6%

O melão cítrico obtido de casca, bagaço e sementes cítricas curados, é difícil de ser eliminado pelas indústrias e representa mais da metade do resíduo industrial segundo alguns autores (BRASIL, 1971a; KESTERSON & BRADDOCK, 1976; CHEMISTRY, 1956). Este resíduo, segundo os autores, contém cerca de 10-15% de sólidos solúveis, dos quais 50-75% são açúcares. A sua composição aproximada é apresentada no QUADRO VI.

QUADRO VI. Composição aproximada do melão cítrico (HENDRICKSON & KERSTERSON, 1951).

Composição	(%)	Composição	(%)
açúcares totais	45 - 57	proteína	3,7 - 12
açúcares reduzíveis	17,0 - 23,5	minerais	4 - 9
sacarose	20,5	magnésio	0,1
umidade	29	cálcio	0,8

pH : 5,4 - 6,4

Segundo SOBKOVIČ (1976), o melão de cana-de-açúcar ou de beterraba-açucareira tem como principal elemento a sacarose (cerca de 2/3 das perdas de açúcar em uma usina, estão representados no melão). Além de fonte de carbono orgânico (principalmente sacarose, glicose e frutose), o melão possui nitrogênio (0,8-2% na forma de aminoácidos, proteínas, amido,

nitratos e outros) e sais minerais (0,48% magnésio; 1,05% cálcio) e fatores de crescimento (ALMEIDA et al, 1966; FARTA, 1955).

A mistura de melão a outros subprodutos, como substâncias hidrolisadas (obtidas de resíduos de carne ou malte) e outros hidrolisados proteicos, é sugerida por SOBKOVIČS (1976) para se obter um equilíbrio adequado de compostos para o crescimento microbiano.

A utilização do melão de cana e do cítrico tem recebido bastante atenção nos últimos anos, e ambos tem sido utilizados para diferentes fins: produção de bebidas alcoólicas, licores, ácido láctico, bioflavonóides, vinagre, butileno-glicol, riboflavina, etc. (ALVES & De] BRANCO, 1971; KESTERSON & BRADDOCK, 1976; SERZEDELLO, 1966; SOBKOVIČZ, 1976; SOUZA, 1968).

SKOGMAN (1976) sugeriu a utilização de resíduos líquidos contendo alto teor de amido, para o crescimento de leveduras a serem utilizadas na alimentação humana. OOSTEN (1976) concordou com esta sugestão, descrevendo inclusive uma metodologia de aproveitamento das perdas. THANK & WU (1975) promoveram o crescimento de leveduras em águas residuárias originadas da obtenção de amido de tapioca, como forma de evitar o descarte de altos teores de material orgânico. SJHARD et al (1973) utilizaram *Rhodotorula glutinis* no tratamento das águas residuárias de indústria de batatas fritas. REISER (1954) utilizou este mesmo resíduo para o crescimento de *Torula*.

RHODES & ORTON (1975) descreveram a geração de água de maceração de milho em indústrias de amido e açúcar de milho.

Segundo estes autores, o amido e o açúcar de milho são extraídos do grão, mediante infusão ou por refluxo de uma solução diluída de SO_2 (cuja função é estabilizar o pH em valores ácidos e evitar putrefação). Essa extração dissolve as substâncias ricas em nitrogênio e sais minerais. A massa em maceração é filtrada, e o filtrado é concentrado por calor, até que se atinja cerca de 50% (peso/volume) em sólidos. Esse concentrado é denominado "água de maceração de milho", e costuma ser comercializado. Seu conteúdo, segundo RHODES & ORTON, 1975) e BADR ELDIN (1981) é de aproximadamente 4% de nitrogênio, 1-6% de cálcio, 2,5% de fósforo e 1,5% potássio (porcentagens em peso seco). Segundo a revisão de LIGGETT & KOFFLER (1948), a importância de sua utilização na microbiologia, é muito grande.

RHODES & FLETCHER (1969) descreveram como boa fonte de nitrogênio (na forma de proteína), os solúveis de destilaria. Segundo estes autores, após a destilação, os sólidos que restam são suspensos e eliminados. O efluente é então concentrado até 35% (peso/volume), obtendo assim um xarope que será submetido a secagem. A este material seco denominaram "solúveis de destilaria".

KRASNIKOVA et al (1982) utilizaram alguns extratos vegetais para desenvolvimento de *Streptomyces lactis*. Entre estes extratos incluíram o de malte e o de milho.

ESPINOSA et al (1977) sugeriram a utilização de águas residuais de indústria de processamento de café para geração de biomassa com fins de melhorar a ração animal. Sendo entretanto o café um produto sazonal, os autores sugeriram

alternar sua utilização com a de outros subprodutos com períodos de produção alternados, como o melaço de cana-de-açúcar, por exemplo.

3. Seleção dos subprodutos

Após a etapa de levantamento prévio, realizada com base em dados da literatura, foram efetivados contatos com mais de 70 indústrias (agroindústrias e indústrias de alimentos), Cooperativas, Empresas e Institutos de Pesquisa, visando detectar as possibilidades existentes de aquisição de resíduos sólidos (principalmente) ou líquidos.

Entretanto, obteve-se retorno de apenas 30% desses contatos, e destes, apenas 8 com respostas significativas. Deve-se ressaltar que essas respostas foram obtidas dos contatos realizados pessoalmente, através de visitas e entrevistas.

Assim, devido aos entraves ocasionados pela distância física dos geradores de resíduos de interesse, principalmente daqueles oriundos das regiões Norte e Nordeste, as buscas se concentraram na cidade de Campinas (SP), e região próxima. Contudo, tomou-se o cuidado de trabalhar com produtos que são gerados também nas demais regiões, embora em quantidades diversas das aqui geradas.

Mostraram-se interessantes os resíduos de indústrias de sabões, de papel e celulose, e de doces e biscoitos, por constituírem problema de descarte devido à sua carga poluente ou ao custo que isso acarreta (segundo informações obtidas junto às indústrias).

Os resíduos de indústria de cerveja e os de abatedouro avícola foram também estudados, pela grande quantidade gerada mensalmente, e por seu baixo custo de comercialização.

Todos possuem ainda, como característica, a produção durante todo o ano. Também, devido aos cuidados de controle de qualidade do produto principal, presumiu-se que esses produtos apresentassem uma composição relativamente constante.

Outrossim deve-se lembrar que o objetivo principal do estudo é a utilização dos subprodutos na forma como eles são descartados, sem que se proceda a nenhum pré-tratamento. Entretanto, para uniformizar os trabalhos, evitando flutuações de composição dos subprodutos, todos os resíduos foram secos em estufa (60 - 70 °C) até atingirem cerca de 8% de umidade, para que um mesmo lote obtido, pudesse ser armazenado durante todo o trabalho, à temperatura ambiente.

APÊNDICE 2

RESÍDUOS E SUBPRODUTOS UTILIZADOS:

CARACTERÍSTICAS DE PRODUÇÃO E DE COMPOSIÇÃO

RESÍDUOS E SUBPRODUTOS UTILIZADOS: CARACTERÍSTICAS DE PRODUÇÃO E DE COMPOSIÇÃO

Os resíduos selecionados para o estudo, estão aqui descritos: algumas características de produção bem como sua composição química (fornecida pela indústria geradora do resíduo ou subproduto). A quantidade gerada mensalmente, bem como o custo aproximado na época da obtenção das amostras, também estão descritos.

A sequência da apresentação seguirá a ordem numérica estabelecida na TABELA 5 do trabalho para facilitar a relação entre os dados aqui apresentados e os resultados alcançados, descritos no trabalho.

1. RESÍDUO SÓLIDO DA INDÚSTRIA DE SABÕES

A água residual de indústrias de gorduras e sabões, é inicialmente tratada por processo químico. A seguir o material é filtrado e segue, geralmente para o tratamento biológico, para posterior descarte em leitos de rios ou outra forma.

O resíduo sólido obtido na filtração, costuma apresentar entraves à sua utilização devido, principalmente às suas características físicas: compacto, quebra-se em pedaços grandes,

tem aspecto borrachento.

Segundo a indústria fornecedora, seu conteúdo em matéria orgânica e sais minerais poderia constituir interesse para o desenvolvimento de fermentação semi-sólida, ao mesmo tempo que auxiliaria a indústria a se desfazer do resíduo.

Não se pode encontrar na literatura qualquer citação sobre seu aproveitamento.

A composição química (fornecida pela indústria) é apresentada a seguir:

umidade	---	65 - 78%
resíduo fixo (principalmente cálcio e cloreto de sódio)		10 - 13%
cálcio		2,6 - 4,5%

Seu pH, medido segundo metodologia descrita no item 4.7.1 do trabalho, apresentou os seguintes valores:

pH antes da secagem	-	7,8
pH após a secagem	-	8,2

Também foi determinada a umidade da amostra fornecida conforme metodologia descrita no item 4.7.3. Os resultados obtidos são os que seguem:

umidade na coleta:	50,66%
umidade após secagem:	1,3%

A característica "empedrada" e "borrachenta" que se observou na amostra, se apresentou como um entrave no preparo do meio de cultura, pela dificuldade apresentada para esfarelar com as mãos.

2. RESÍDUO SÓLIDO DA INDÚSTRIA DE PAPEL E CELULOSE

Após a clarificação primária do resíduo processado na indústria de papel e celulose, resulta um resíduo sólido que é acumulado a céu aberto.

Sua produção mensal é estimada em 130 toneladas (peso úmido), sendo variável com o período do ano e do ritmo de produção.

Sua composição aproximada é a que segue (segundo dados de análises realizadas por terceiros, e fornecidos pela indústria):

umidade - 80%	matéria orgânica total - 13,1%
fósforo - 0,25%	resíduo mineral total - 7,0%
potássio - 0,35%	nitrogênio total - 0,40%
cálcio - 0,17%	magnésio - 0,11%

O pH e umidade, analisados segundo metodologia descrita no item 4.7.1 e 4.7.3, respectivamente, tiveram os seguintes valores:

	material na coleta	material seco
umidade	74,48 %	0,9 %
pH	7,9	7,7

Segundo informação pessoal prestada pela indústria, esse resíduo já foi testado como adubo e cobertura na área de reflorestamento da indústria, com bons resultados. Também foi testado como substrato para clones, com resultados promissores. Entretanto, problemas econômicos (principalmente o custo de transporte), não favoreceram a primeira alternativa, e a pouca quantidade utilizada na segunda alternativa não foi suficiente para solucionar o problema de descarte do material.

Um segundo e um terceiro lote deste material foram coletados em épocas distintas, bem como em situações diversas. Uma delas foi coletada na saída da clarificação, e a outra foi tomada do material acumulado já há alguns meses a céu aberto. Nestes dois lotes pode-se observar uma diferença de pH, apesar de não muito acentuada (valor mínimo 7,7; valor máximo 8,5) certamente devido às alterações ocorridas no material acumulado (maior valor de pH).

Quanto às características de crescimento do *Bacillus thuringiensis*, não se detectou diferenças entre os dois lotes, nos testes preliminares. Observou-se entretanto variações no conteúdo em açúcares totais e redutores, conforme resultados de análise junto ao Departamento de Tecnologia da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, que são apresentados a seguir:

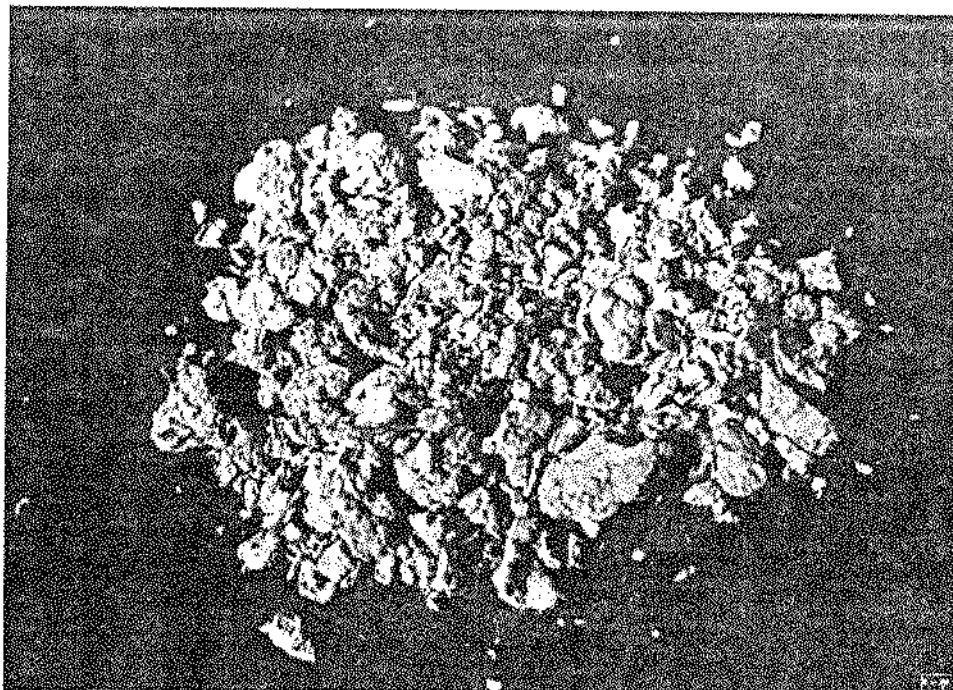
	Açúcares totais (mg/ 100 g)	Açúcares redutores (mg/ 100 g)
Amostra coletada na saída da clarificação	45,44	28,15
Amostra coletada no depósito a céu aberto	22,83	13,98

Deve-se salientar que o material coletado na saída da clarificação, sai com uma temperatura próxima ou superior a 70°C, e possui um cheiro desagradável, característico das indústrias de papel. Durante a secagem o odor se torna mais forte, e ao término desta, o odor, já menos acentuado, permanece.

O aspecto do resíduo na coleta, antes portanto da secagem, é semelhante ao do papelão úmido, amolecido e esfarelado. Após a secagem, ele se apresenta na forma de grumos de fácil separação com os dedos, desprendendo um pó fino e escuro. Sua densidade aparente se mostra ao redor de 0,28 g/ml, após secagem.

Seu aspecto, após secagem, pode ser observado na FOTO I.

FOTO 1. Aspecto característico do resíduo sólido de indústria de papel e celulose, utilizado nos trabalhos experimentais de fermentação semi-sólida.



3. FARINHA DE VISCERAS

A farinha de vísceras é obtida pela digestão e cozimento das vísceras das aves abatidas, bem como das partes condenadas provenientes da sala de abate e inspeção.

Após cozimento, a pasta obtida é espalhada no solo do compartimento destinado para este fim, na granaria, até seu resfriamento completo. O pó é então recolhido e ensacado.

Sua composição característica (fornecida pela indústria) é a seguinte:

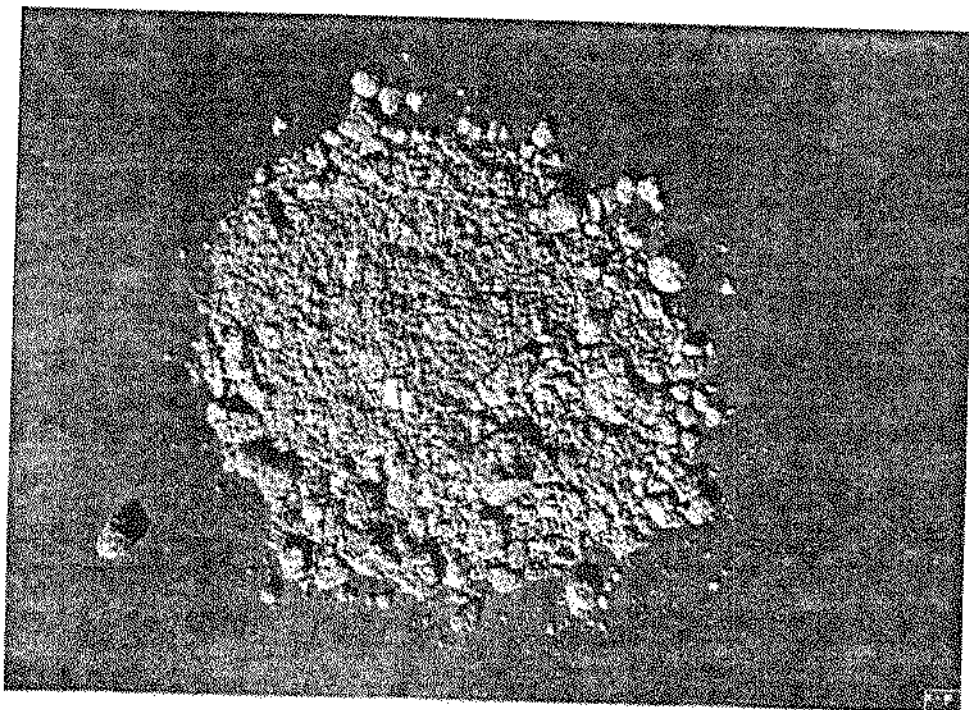
umidade	-	3,4 - 6,0%
cálcio	-	0,15 - 1,7%
proteína	-	37,0 - 56%
fósforo	-	0,8 - 2,5%
matéria graxa	-	20,2 - 27,0%

As medidas de pH e de umidade, efetuadas segundo metodologia indicada nos itens 4.7.1 e 4.7.3 do trabalho, foram:

pH	-	6,20
umidade	-	2,91%

Esta farinha tem aspecto de pó grosso, e possui cor marrom. Seu odor não é forte, porém é mais intenso do que o da farinha de penas. Seu aspecto característico pode ser observado na FOTO II.

FOTO II. Aspecto característico da farinha de vísceras utilizada nos experimentos de fermentação semi-sólida.



Seu custo, na granaria, em abril/86, era entre Cr\$ 4,00 e Cr\$ 5,00.

Segundo informação pessoal fornecida pela indústria, a farinha de vísceras costuma apresentar variação de composição de um para outro lote. Isso se explica pelo fato dela ser composta de descartes da sala de abate e de vísceras, e esses componentes variarem em quantidade e tipo de um para outro dia.

4. FARINHA DE PENAS

A farinha de penas é obtida pelo cozimento das penas recolhidas na etapa de depenagem das aves no abatedouro avícola.

O processo de secagem e ensacamento é o mesmo utilizado na obtenção da farinha de vísceras.

Sua composição típica (determinada em laboratório do próprio abatedouro) é a que segue:

umidade - 4,5%	cálcio - 0,20%
proteína - 77,0%	fósforo - 0,64%
matéria graxa - 5,7%	

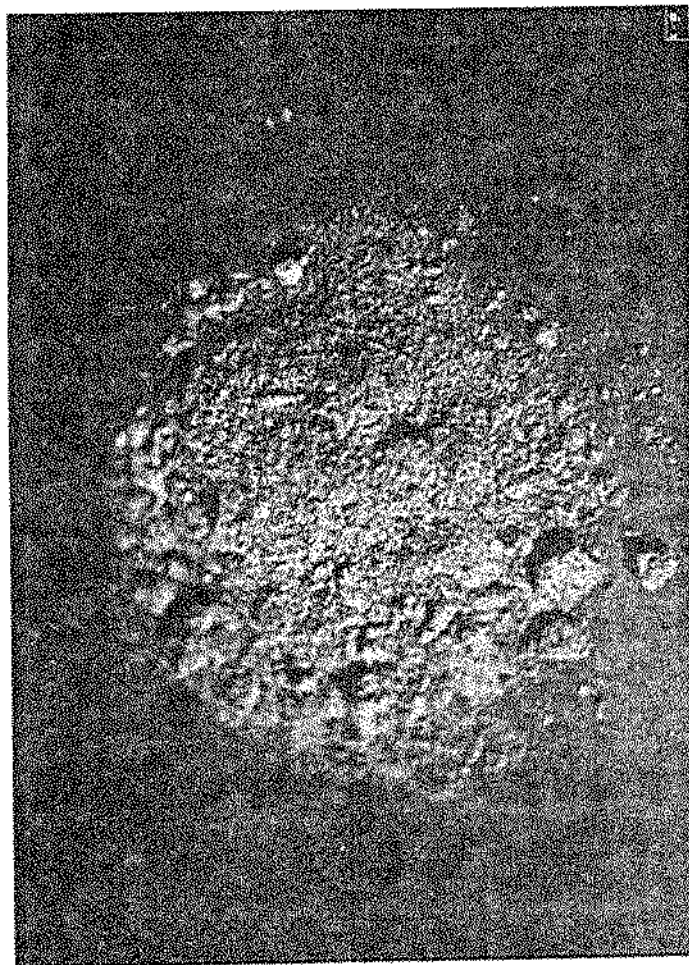
A umidade e o pH determinados segundo metodologia citada nos itens 4.7.3 e 4.7.3, respectivamente, são os seguintes:

pH - 6,00
umidade - 5,74%

A farinha se apresenta com aspecto de pó não muito fino, e de cor marrom. Seu odor não é muito intenso. Seu aspecto característico pode ser observado na FOTO III.

Seu custo, na graxaria é semelhante ao da farinha de vísceras.

FOTO III. Aspecto característico da farinha de penas utilizada nos experimentos descritos neste trabalho.



5. RESÍDUO SÓLIDO DE CERVEJARIA

No processo de obtenção da cerveja, a cevada germinada (denominada "malte") é macerada, para posterior fermentação. Esse malte macerado é posteriormente separado de seu caldo, por processo de decantação ou filtragem em filtro-prensa. O resíduo sólido proveniente do filtro-prensa, constituído do malte residual, é descartado. Ele costuma ser vendido para uso como complemento da ração animal.

Para cada 7 milhões de litros de cerveja (produção média de um mês), são descartados cerca de 135 toneladas deste resíduo sólido, que contém, em média, 80% de umidade. A sua composição média não foi determinada pela indústria.

O seu valor de comercialização, em 31/04/84 era de
3
Cr 59 000,00 / m .

É interessante destacar aqui, que as variações do processo de produção da cerveja de uma para outra indústria (como por exemplo o tipo de grãos utilizados - arroz, milho, etc. - em complementação à cevada; o processo de produção; o processo de separação) interferem muito na composição deste resíduo sólido. Como exemplo, pode-se citar que amostras obtidas de duas indústrias distintas, que operam com processos diversos, apresentaram valores de pH bem diferentes: uma, com pH 3,80, e outra com pH 6,20 (ver TABELAS 5 e 6 do trabalho).

Entretanto, para uma mesma indústria, a necessidade de manutenção de um padrão de qualidade do produto final, gera um resíduo muito mais uniforme durante o correr do ano. As variações de pH observadas em 4 amostras diferentes, obtidas em diferentes épocas de dois anos distintos, foram entre os valores 5,80 e 6,20.

O teor de nitrogênio determinado em nosso laboratório segundo metodologia sugerida por STRONG et al (1982), foi de 4,19% .

O conteúdo de açúcares totais e redutores, determinado pelo Departamento de Tecnologia da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, foi:

açúcares totais : 447,32 mg/100 g

açúcares redutores : 452,13 mg/100 g

indicando que todo açúcar presente é redutor.

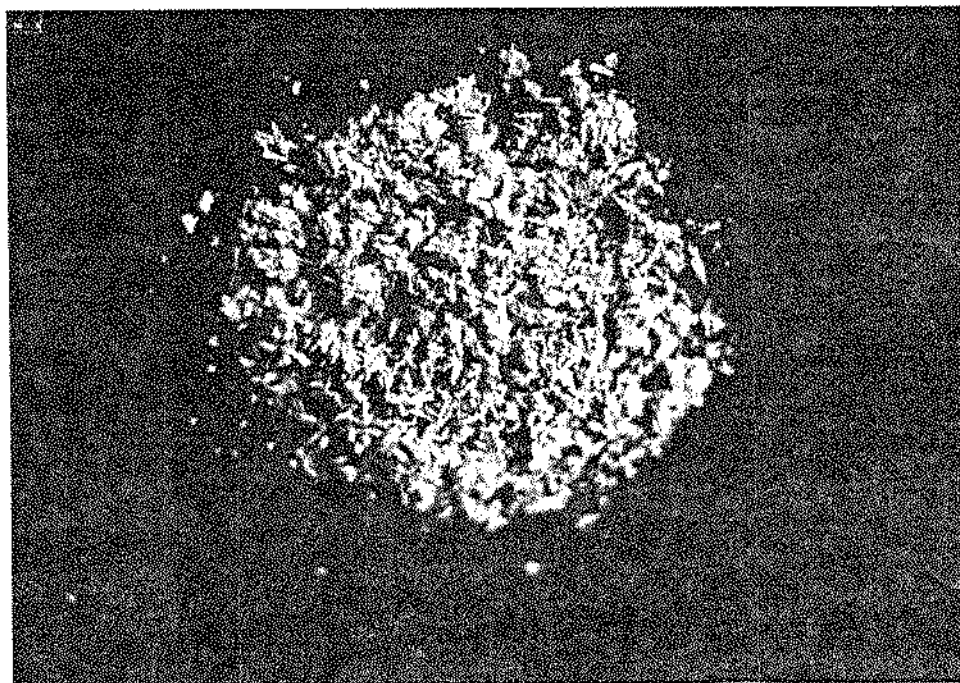
Este material, na coleta realizada no seu descarte imediato, logo na saída do filtro-prensa, apresenta temperatura superior a 50ⁿ C , e odor típico de grãos cozidos. A própria indústria armazena esse material quando necessário, em câmaras frias, por um curto espaço de tempo.

Para armazenar esse resíduo até se proceder à secagem, foi mantido em câmara fria por não mais de 2 dias. Um dos lotes obtidos para comparações de composição, foi armazenado em freezer por alguns meses, antes de ser seco. Mesmo este lote não apresentou diferenças marcantes quer em sua característica como

substrato da fermentação, quer em sua composição.

Seu aspecto na coleta é de uma massa de grãos cozida, com cascas. Após secagem, o resíduo lembra a palha de arroz e outros cereais, como se pode observar pela FOTO IV. Sua cor é clara e seu odor típico de cervejaria se mantém após a secagem.

FOTO IV. Aspecto característico do resíduo sólido de cervejaria utilizado nos experimentos de fermentação semi-sólida.



6. SUPLEMENTO MINERAL DE ALGAS

Esse produto comercial é obtido a partir de alga calcárea *Lithothamnium*, sem adição de outros produtos químicos, conforme afirmação da indústria que o comercializa. Ele é comercializado com a finalidade de suplementar a ração animal, pelo seu alto teor de minerais e alguns fatores de crescimento.

Segundo informação da indústria, sua composição é a que segue:

Componente	%	Componente	%
cálcio	47,00	ferro	0,27
magnésio	4,00	zinco	7,00
fósforo	0,068	manganês	24,00
potássio	0,04	níquel	22,00
sódio	0,43		

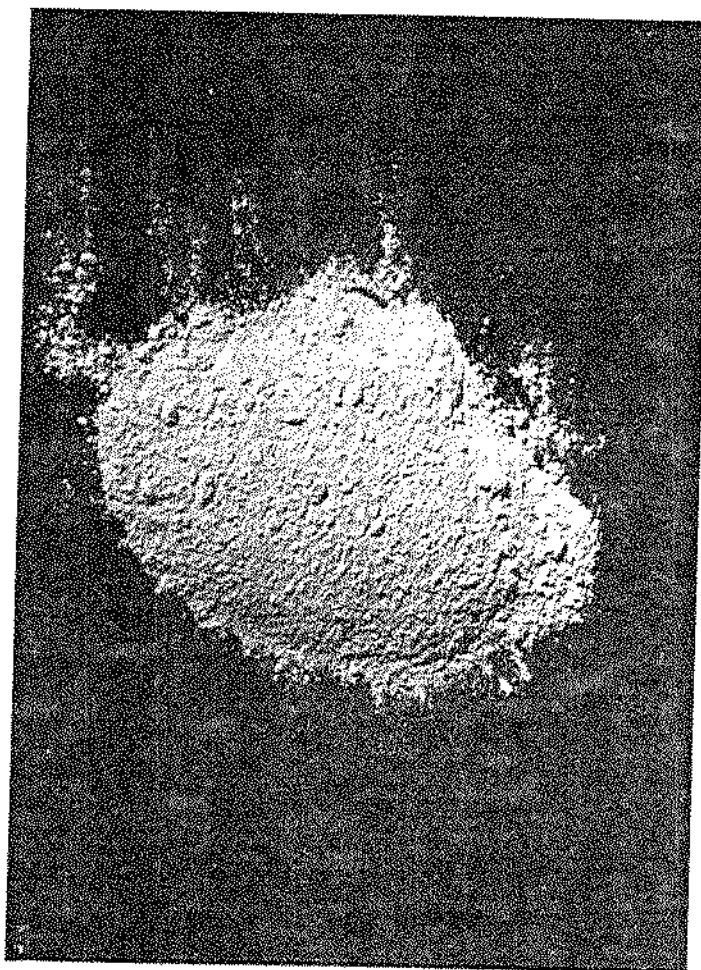
Entre as vitaminas, destacam-se:

tiamina (vitamina B ₁)	0,05 mg/100 g
ácido nicotínico (vitamina PP)	1,46 mg/100 g
ácido ascórbico (vitamina C)	7,04 mg/100 g

Seu pH, avaliado segundo metodologia indicada no item 4.7.1 é de 8,80; a umidade, avaliada segundo metodologia indicada no item 4.7.3, é de 0,18%.

O produto é comercializado na forma de um pó fino, de cor cinza claro, como pode se observar pela FOTO V.

FOTO V. Aspecto característico do suplemento mineral de algas utilizado como complemento de alguns meios de cultura, para fermentações semi-sólidas.



7. FARELO DE BOLACHAS E DOCES

A indústria de biscoitos e doces costuma descartar os produtos que sofrem qualquer dano durante o processo (produtos queimados, muito escuros, mal assados, defeituosos, etc.), e outros que são condenados pela inspeção ou no setor de embalagens. Esses descartes, muitas vezes denominados "varredura", são oferecidos a criadores de suínos das redondezas, ou então incinerados.

A varredura que se pode coletar como resíduo do trabalho de um dia da indústria, foi composta de bolachas doces, bolachas salgadas, bolachas recheadas, salgadinhos, doces variados (paçoca, suspiro, doces de fruta em pedaços, e outros), balas duras, balas moles, e pirulitas. Tal varredura, devido à heterogeneidade de seus componentes, foi moída em liquidificador semi-industrial (frasco com capacidade para 5 litros), e então armazenado em câmara fria, acondicionado em sacos plásticos de alta resistência mecânica.

Naturalmente, mesmo após este "pré-tratamento", o aspecto apresentado ainda é heterogêneo. Além desta característica não muito favorável ao desenvolvimento de uma fermentação semi-sólida, deve-se lembrar que a composição da varredura varia a cada dia em função do tipo de produto que está sendo manipulado na linha de produção. Também é muito variável a quantidade gerada diariamente.

O pH medido conforme metodologia indicada no item 4.7.1, foi de 6,60, e a unidade determinada segundo método indicado no

item 4.7.3, foi de 3,64%.

O resíduo apresenta um odor agradável de biscoitos, levemente aromatizado, e adocicado.

8. ÁGUA DE CÔCO

Uma indústria de processamento de côco que processe aproximadamente 300 000 côcos/dia, gerará cerca de 90 000 litros de água de côco (tomando-se por base 0,3 l/fruto). A água de côco possui cerca de 5 000 mg BOD/l (SISON, 1977), o que é muito elevado se lembrarmos que valores de BOD aceitáveis costumam se situar ao redor de 50 mg/l.

Apesar das indústrias de derivados de côco se encontrarem na região Nordeste do Brasil, se pode obter este resíduo líquido, junto à Planta de Processamento de Frutas do Instituto de Tecnologia de Alimentos - ITAL - Campinas, SP, quando o mesmo estava adaptando a técnica de processamento de côco ralado e leite de côco.

O fruto maduro, após autoclavagem, foi quebrado manualmente para extração da polpa que se destinava à pesquisa do ITAL. A água descartada, foi recolhida em baldes de aço inoxidável. Posteriormente essa água foi filtrada em peneira doméstica e em tecido de algodão "Perfox". A água assim

filtrada, foi armazenada em frascos de vidro, fechados com tampa rosqueável, em freezer (-18 C) até sua utilização.

O odor agradável da água de côco se manteve mesmo após 2 anos de estocagem, embora fosse enfraquecendo com o tempo.

Sua composição em açúcares totais foi determinada em laboratório pela técnica sugerida por SCOTT & MELVIN (1955), e seu valor foi de 1,5%.

A concentração de nitrogênio, determinada pelo método micro-Kjeldahl, sugerido por STRONG et al (1983), apresentou o valor 0,02%.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS - APÊNDICES

- AGUIRRE, J.M. et al. 1981. Secagem e armazenamento do resíduo resultante do processamento do extrato de soja. Bol. Inst. Tecnol. Aliment. 18(2): 227 - 243.
- ALMEIDA, J.R. 1966. Composição do mel final. In: SEMANA DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA, 2. Piracicaba. V. 1, p. 30 - 68.3
- ALVES, T.C. & DEL BRANCO, V. 1971. Produção de levedura - alimento e assimilação do nitrogênio em melaços brasileiros. In: INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGIA, Tecnologia dos processos bioquímicos. Rio de Janeiro, p. 45 - 65.
- AIWALAS, P. et al. 1968. Mass culture of *Rhodotorula pilomanae* Hedrich et Burke in coconut-water medium. Philipp. J. Sci. 97(1): 57 - 72.
- ARALHO, J.A. et al. 1982. Aproveitamento do "fundo de dorna". Bras. açucareiro 100(3/5): 25 -27.
- ASHLEY, J. 1972. Converting coffee waste into feedstuffs. In: BY-PRODUCTS of the Food Industry: Proceedings of a Symposium on by-products of food industry, , 1972. London, The British Food Manufacturing Industries Research Association, 1973. p. 34 - 35.

BADR ELDIN, S.M.; ATALLA, H.M.; EL-HAWAARY, S. 1981. Microbial protein production and BOD reduction in corn steep liquor. *Starch (Stärke)* 33(8): 279 - 280.

BALDENSBERGER, J. et al. 1985. Solid state fermentation of banana waste. *Biotechnol. Lett.* 7(10): 743.

BANCO DO NORDESTE DO BRASIL. 1973. A agroindústria do caju no nordeste - Situação atual e perspectivas. Fortaleza, ABC Gráfica. 320p.

BEN-GERA, I. & KRAMER, A. 1969. The utilization of food industries wastes. *Adv. Food Res.* 17: 77 - 152.

BRANDÃO, J.N. et al. 1981. Perfil técnico econômico da sericicultura no Estado do Rio Grande do Norte. Natal, Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Norte. 22p. (EMPARN. Boletim Técnico, 4).

BRASIL. Ministério do Interior. 1971a. Grupo Executivo de Irrigação para o Desenvolvimento Agrícola / Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia de Alimentos. Aspectos tecnológicos de alguns produtos agropecuários de interesse da área de irrigação do nordeste. Citrus. Campinas. 179p.

BRASIL. Ministério do Interior. 1971b. Grupo Executivo de Irrigação para o Desenvolvimento Agrícola / Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia de Alimentos. Aspectos tecnológicos

de alguns produtos agropecuários de interesse da área de irrigação do nordeste. Mamona. Campinas. 98p.

CASTRO, J.C. 1981. Valores de energia metabolizável, triptofano e metionina de alimentos utilizados em rações de aves.. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa. 47 p. (Tese, Mestrado)

CASTRO, J.C.; SILVA, D.J.; ROSTAGNO, H.S. 1981. Determinação de valores de energia metabolizável e triptofano de alguns alimentos utilizados em rações de galinha poedeira. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 18., Goiânia. Anais. Goiânia, 1981.

CHATT, F.N. 1953. In: ----- Cocoa - cultivation, processing, analysis. N.York, Interscience Publ. p.151 - 157.

CHEMISTRY and technology of citrus, citrus products and by-products. 1956. Washington, USDA. (Agriculture Handbook, 98).

CHURCH, B.D.; NASH, H.A.; BROSZ, W. 1972. Use of Fungi Imperfecti in treating food processing wastes. Dev.Ind. Microbiol. 13: 30 - 46. (Proceedings of the 28th. General Meeting of the Society of Industrial Microbiology, Colorado, 1971).

- COOPER, J.L. 1976. The potential of food processing solid wastes as a source of cellulose for enzymatic conversion. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 6: 251 - 271.
- CRAIG, T.W. et al. 1978. Protein from dairy products. In: AVI, *Protein resources and technology: status and research needs.* N.York, AVI. Cap. 20, p. 348 - 388.
- DAY, D.L. & HARMON, B.G. 1975. Properties related to utilization. In: CONFERENCE ON STANDARDIZING PROPERTIES AND ANALYTICAL METHODS RELATED TO ANIMAL WASTE RESEARCH. Conference papers. St. Joseph, ASAE s.d. 355p. (Special publication, SP - 0275).
- DETROY, R.W. & HESSELTINE, C.W. 1978. Availability and utilization of agricultural and agro-industrial wastes. *Process Biochem.* 13(9): 2 - 8.
- ESPINOSA, R. et al. 1977. Aerobic nonaseptic growth of *Verticillium* on coffee wastewaters and cane black strap molasses at a pilot plant scale. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 7: 35 - 44.
- FARIA, G. et al. 1955. Estudo sobre melaços de cana: composição química dos melaços, investigações relativas à fermentação alcoólica industrial. Rio de Janeiro, Instituto Nacional de Tecnologia. 36p.

- FERNANDEZ, W.L.; OCAMPO, T.A.; PEREZ, D.C. 1975. Coconut water in three media reduces cell yield of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner. *Phillip. Agric.* 58(7/8): 273-279.
- GADELHA, J.A. 1983. Comunicação pessoal.
- GADELHA, J.A. et al. 1981. Estudo da substituição do milho pelo feno do pseudo fruto do cajueiro (*Anacardium occidentale*) em rações de frango de corte. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 18., Goiânia, 1981. Anais. p. 146.
- GARGANTINI, H. 1965. Farinha de ossos. *O Agrônomo* 5/6: 10.
- GERONEL, E.J. & FOREYER, S.J. 1982. Princípios fundamentais em Tecnologia de Pescados. São Paulo, Secretaria de Estado da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia. Cap. 7, p. 99 - 113. (Série Tecnologia Agroindustrial, 11).
- GILLIES, N.T. 1978. Animal feeds from waste materials. Park Ridge, N.J., Noyes. 346 p. (Food Technol. Rev., n. 46).
- GOHES, R.P. 1976. A soja. 2.ed. São Paulo, Nobel. 152 p. (Biblioteca Rural).
- GONSALVES, A.D. 1955. O babaçu - considerações científicas, técnicas e econômicas. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura, Serviço de Informação Agrícola. (Série Estudos e Ensaios, 8).

GRANT, R.A. 1973. Protein recovery from food process effluents.
In: BY-PRODUCTS of the food industry: Proceedings of a
Symposium on by-products of the food industry,
1972. London, The British Food Manufacturing Industries
Research Association, 1973. p. 1- 10.

GRUPO EXECUTIVO DE IRRIGAÇÃO PARA O DESENVOLVIMENTO DA
AGRICULTURA. 1972a. Arroz. Campinas, GEIDA/Fundação Centro
Tropical de Pesquisa e Tecnologia de Alimentos. 165 p.
(Contribuição ao desenvolvimento da agroindústria, 8).

..... 1972b. Amendoim. Campinas, GEIDA/ Fundação Centro
Tropical de Pesquisa e Tecnologia de Alimentos. 134 p.
(Contribuição ao desenvolvimento da agroindústria, 13).

..... 1973. Milho. Campinas, GEIDA/Fundação Centro
Tropical de Pesquisa e Tecnologia de Alimentos. 178p.
(Contribuição ao desenvolvimento da agroindústria, 14).

HENDRICKSON, R. & KERSTERSON, J.W. 1951. Citrus by-products of
Florida: commercial production methods and properties.
Gainesville, Agricultural Experiment Stations, p. 6 - 56.
(Bulletin, 487).

..... 1964. Citrus molasses. Gainesville, Agricultural
Experiment Stations, 27 p. (Technical Bulletin, 677)

..... 1965. By-products of Florida citrus: composition,
technology and utilization. Gainesville, Florida Agricultural

Experiment Stations, 75 p. (Bulletin, 698).

HENRY, D.P. & THOMSON, R.H. 1979. Growth of *Candida ingens* on supernatant from anaerobically fermented pig waste: effects of temperature and pH. *Appl. Environ. Microbiol.* 37(6): 1132 - 1135.

IMRIE, F.K.E. & RIGHELATO, R.C. 1976. Production of microbial protein from carbohydrate wastes in developing countries. In: BIRCH, G.G., PARKER, K.J. & MORGAN, J.T. ed. *Food from waste*. London, Applied Science. p. 79 - 97.

KESTERSON, J.W. & BRADDOCK, R.J. 1976. By-products and specialty products of Florida citrus. Gainesville, University of Florida, Agricultural Experiment Stations. 119 p. (Technical Bulletin, 784).

KRASNIKOVA, I.V.; VORONINA, L.N.; SILEVA, M.N. 1982. Effects of vegetable extracts on the biosynthesis of nisin by *Streptococcus lactis*. *Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved., Pishch. Tekhnol.* 2: 24 - 27. apud *Food Science and Technology Abstracts* 15, 1983.

LANNA, P.A.S. et al. 1979. Tabela de composição de alimentos concentrados. I. Valores de composição química e de energia metabolizável determinados com pintos. *Rev. Soc. Bras. Zootec.* 8(3): 516 - 523.

- LAVORENTI, A. 1976. Alimentação de suínos: composição das rações para as diferentes categorias. In: SEMANA DE ZOOTECNIA, 4. (nutrição animal). Piracicaba, USP.
- LEFINER, M. & GASH, P. 1973. By-products from the meat processing and packaging industries. In: BY-PRODUCTS of the food industry: Proceedings of a Symposium on by-products of the food industry, 1972. London, The British Food Manufacturing Industries Research Association, 1973. p. 27 - 33.
- LIGGETT, R.W. & KOFFLER, . 1948. Corn steep liquor. Bacteriol. Rev. 12: 297 - 311.
- LUPCHINSKI, V.L.L. et al. 1970. Valor nutritivo da cama de frango para suínos. Rev. Soc. Bras. Zoot. 7(2): 303 - 320.
- MAIA, G.A., coord. 1981. Aproveitamento industrial do caju (*Anacardium occidentale*): relatório final. Fortaleza, Fundação Núcleo de Tecnologia Industrial. 44p. (Série relatório, 1).
- MATER, J.C. 1981. Comparação entre farelo de soja e farelo de colza em rações à base de sorgo para pintos. II. Substituição isocalórica e isoproteica. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 13., Goiânia, 1981. Anais. p. 150.

- MAIER, J.C. & OLIVEIRA, P.R.D. 1981. Comparação entre farelo de soja e farelo de colza em rações à base de milho para pintos. I. Substituição isométrica. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 13., Goiânia, 1981. Anais. p. 149.
- MANN, I. 1962. Animal by products : processing and utilization. Rome. FAO. 246p. (FAO Agriculture Development Paper, 75).
- MANTELL, C.L. 1975. In: SOLID wastes: origin, collection, and disposal. N. York, Wiley-Interscience. 1127 p.
- MARTELLI, H.L. & SOUSA, N.O. 1978. Obtenção de biomassa de *Candida utilis* crescendo em vinhoto de cana. Rev. Bras. Tecnol. 9(3/4): 157 - 164.
- MEDINA, J.C. et al. 1980. Mamão - da cultura ao processamento e comercialização. Campinas, Instituto de Tecnologia de Alimentos. 244p. (Série Frutas Tropicais, 7).
- MORAES, I.O. & CAPALBO, D.M.F. 1986. Agroindustrial residues as a medium for growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis*. In: SIMPÓSIO ANUAL DA ACADEMIA DE CIÊNCIAS DO ESTADO DE SÃO PAULO, 11., São Paulo, 1986. Anais. São Paulo, Academia de Ciências do Estado de São Paulo. p. 195 - 202. (ACIESP, 51-52).
- OOSTER, B.J. 1976. Protein from potato starch mill effluent. In: BIRCH, G.G., PARKER, K.J. & WORGAN, J.T. Food from waste. London, Applied Science. p. 196 - 204.

- OTABAKI, K.K. & MATSUMOTO, H. 1958. Passion fruit by products. Nutritive values and utility of passion fruit by-products. *Agric. Food Chem.* 6(1): 54 - 57.
- PFIXOTO, A.R. 1972. Plantas oleaginosas herbáceas. São Paulo, Nobel. 171 p. (Biblioteca Rural).
- 1973. Plantas oleaginosas arbóreas. São Paulo, Nobel. 282p. (Biblioteca Rural) .
- PFIXOTO, R.R. 1981. Comparação entre farelo de arroz e farelo de trigo na alimentação de pintos. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 13., Goiânia, 1981. Anais. p. 152.
- PEZZATO, L.E. et al. 1981. Subproduto da cervejaria (polpa seca de malte) em rações para frangos de corte. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 13., Goiânia, 1981. Anais. p. 147.
- PTINTO, G.P. & OLIVEIRA, A.R.C. 1962. Composição química e valor nutritivo da água de côco anão e de praia. In: REUNIÃO DE INVESTIGAÇÃO AGRONÔMICA DO NORDESTE, 2., Recife, 1962. Anais. V. 7, p. 41 - 43.
- REISER, C.O. 1954. Torula yeast from potato starch wastes. *Agricultural and Food Chem.* 2(2): 70 - 74.

- RADLEY, J.O. 1940. Starch and its derivations. London, Chapman & Hall. p. 245 - 248.
- RHODES, A. & FLETCHER, D. 1969. Princípios de microbiologia industrial. Trad. de E.C. Bergera. Madrid, Editorial Acribia. Cap. 6, p. 60 - 79.
- RHODES, R.A. & ORTON, W.L. 1975. Solid substrate fermentation of feedlot waste combined with feed grains. Trans. ASAE 18(4): 728 - 733.
- ROLFE, E.J. 1976. Food from waste in the present world situation. In: BERCH, G.G.; PARKER, K.J. & WORGAN, J.T., Food from waste. London, Applied Science. p. 1 - 7.
- ROLF, C. 1978. Particular problems of solid waste reclamation in developing countries. J. Appl. Chem. Biotechnol. 28(4): 321-339.
- ROLF, C. & HUMPHREY, A. 1982. Microbial biomass from renewables: review of alternatives. Adv. Biochem. Eng. 21: 1 - 53.
- SALMTO FILHO, U. ; GALINDO, I. T. ; MOREIRA, Z. E. 1977. Agroindústria para o nordeste. Fortaleza, Banco do Nordeste do Brasil. 48p.

- SANTANA, J.; SOUZA, S.O.; AROEIRA, L.J.M. Obtenção de resíduo proteico de destilaria de álcool - fundo de dorna - e sua utilização na nutrição de ruminantes. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 13., Goiânia, 1981. Anais. p.327.
- SCOTT, T.A. & MELVIN, E. H. 1953. Determination of dextran with anthrone. Anal. Chem. 25: 1656 - 1661.
- SFRZEDELIO, A. 1966. Outras aplicações biológicas do melão. In: SEMANA DE FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA, 2., Piracicabã, 1966. V. 2, p. 305 - 327.
- SHANNON, L.J. & STEVENSON, K.E. 1975a. Growth of fungi and BOD reduction in selected brewery wastes. J. Food Sci. 44: 824 - 829.
- 1975b. Growth of *Calvatia gigantea* and *Candida steatolytica* in brewery wastes for microbial protein production and BOD reduction. J. Food Sci. 44: 830 - 832.
- STWARD, R.F.; BUSQUE, G.; RIEL, R.R. 1973. Traitement biologique des eaux usées de croustilles par les levures. Can. Inst. Food Sci. Technol. J. 6(1): 32 - 36.
- SISON Jr., B.C. 1977. Disposal of coconut processing waste. Phillip. J. Coconut Stud. 2: 39 - 41.

- SKOGMAN, H. 1976. Production of symba-yeast from potato wastes. In: BERCH, G.G., PARKER, K.J. & WORGAN, J.T. Food from waste. London, Applied Science. p. 167 - 179.
- SIOMKFER, J.H. 1976. Agricultural residues, including feedlot wastes. Biotechnol. Bioeng. Symp. 6: 235 - 250.
- SMITH, M.E. & BILL, A.T. 1976a. Studies of the utilization of coconut water waste for the production of the food yeast *Saccharomyces fragilis*. J. Appl. Bacteriol. 41: 81 - 95.
- SMITH, M. E. & BILL, A.T. 1976b. Protein and other compositional analysis of *Saccharomyces fragilis* grown on coconut water waste. J. Appl. Bacteriol. 41: 97 - 107.
- SOBKOWICZ, G. 1976. Yeast from molasses. In: Birch, G.G., Parker, K.J. & Worgan, J.T. Food from waste. London, Applied Science. p. 42 - 57.
- SOUZA Jr., A.J. 1968. A indústria cítrica no Brasil. Bol. Cent. Trop. Pesq. Tecnol. Aliment. 14: 71 - 79.
- SOUZA, J.L.G. et al. 1981a. Subprodutos da industrialização do tomate em rações para frangos de corte. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 13., Goiânia, 1981. Anais. p. 143.
- 1981b. Farinha de resíduos de incubatório em rações para frangos de corte. Resultados econômicos. In: REUNIÃO DA

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 13., Goiânia, 1981. Anais.
p. 159.

STAMFORD, T.L.M. 1984. Comunicação pessoal.

STAMFORD, T.L.M. et al. 1983. Ração animal a partir de resíduos
de frutos fermentados. Parte I. Maracujá. Bol. Soc. Bras.
Cienc. Tecnol. Aliment. 17(1): 107 - 117.

STANTON, W.R. 1978. Microbiological utilization of
agroindustrial wastes in the tropics. Process Biochem.
13(12): 6 - 7.

STRONG III, F.C. et al. 1983. Determinação de proteína pelo
método semi-micro Kjeldahl. Apostila da Análise de alimentos.
I. Aulas Práticas. Campinas, FEA/UNICAMP, p. 19 - 26.

SUGIMOTO, H. 1974. Treatment of soybean spent solubles by means
of yeast cultivation. J. Food Sci. 39(5): 934 - 938.

TAKAHASHI, R. & KRONKA, R.N. 1981. Farinha de crisálida do bicho
da seda (*Bombix mori*) na alimentação de suínos em crescimento e
terminação. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE
ZOOTECNIA, 13., Goiânia, 1981. Anais. p. 202.

TANGO, J.S. 1965. Industrialização do caroço de algodão e dos
seus produtos. Bol. Cent. Trop. Pesq. Tecnol. Aliment. 4: 1-
19.

- TANGO, J.S. 1966. Semente do algodão - resíduo da extração do óleo de caroço de algodão. Bol. Cent. Trop. Pesq. Tecnol. Aliment. 7: 25 - 32.
- TANNENBAUM, S.R. & PACE, G.M. 1976. Food from waste: an overview. In: BENCH, G.G., PARKER, K.J. & WORGAN, J.T. Food from waste. London, Applied Science. p. 8 - 22.
- TANK, S.M. 1978. Efeito do tratamento com ácidos minerais em vinhaça, no desenvolvimento de *Candida utilis*. Cienc. Cult. 30(3): 350 - 353.
- 1979. Adaptação de leveduras à vinhaça e vinhaça suplementada com melação. Cienc. Cult. 31(5): 522 - 530.
- 1982. Culture of *Candida* in vinasse and molasses: effect of acid and salt addition on biomass and raw protein production. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 16(4): 223-227.
- THANH, N.C. & WU, J.S. 1975. Treatment of tapioca starch wastewaters by *Torula* yeast. Can. Inst. Food Sci. Technol. J. 8(4): 202 - 205.
- THATCHER, E.S. 1954. Foods and feeds from fungi. Annu. Rev. Microbiol. 8: 449 - 472.

- TRAVAGLINI, D.A. et al. 1980. Processamento de farinha composta de resíduo do extrato de soja e milho. Bol. Inst. Tecnol. Aliment. 17(3): 275 - 296.
- UPDEGRAFF, D.H. et al. 1973. The production of animal feed by the growth of fungi on wastes from the coffee and rum distilling industries. Dev. Ind. Microbiol. 14: 317 - 324. (Proceedings of the 29th. General Meeting of the Society for Industrial Microbiology).
- WEISBERG, S.M. & GOLDSMITH, H.I. 1969. Whey for food and feeds. Food Technol. 23(2): 52 - 56.
- WINKLER, M. 1983. Limitation of fermentation processes for utilization of food wastes. Topics Enz. Ferment. Biotechnol. 7: 271 - 306.
- WORGAN, J.T. 1972. Utilization of agricultural and food industry wastes by microbiological process. In: BY-PRODUCTS of the Food Industry: Proceedings of a Symposium on by-products of the food industry, , 1972. London, The British Food Manufacturing Industries Research Association, 1973. p.11 - 26.
- 1976. Wastes from crop plants as raw materials for conversion by fungi to food or livestock feed. In: BENCH, G.G.; PARKER, K.J. & WORGAN, T.J. Food from waste. London, Applied Science. p. 23 - 41.

ZANGELMI, A.C.B. et al. 1980. Produtos da soja: leite, farinha e outros. São Paulo, Secretaria de Estado da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia. Cap. 5, p. 38 - 47. (Série Tecnologia Agroindustrial, 10).

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer inicialmente à Professora Dra. Iracema de Oliveira Moraes pela orientação, amizade, estímulo e confiança dedicados.

Também à EMBRAPA/ CNPDA, através da Chefia (Dr. Murilo X. Flores) e Chefias Adjuntas (Dr. Gilberto J. Moraes e Dr. Manoel Moacir E. Macedo). Igualmente aos colegas do CNPDA que muito auxiliaram na realização dos bioensaios: Luis Alexandre N. Sá, Franco Lucchini e em especial à Enga. Regina de Oliveira Moraes pela manutenção e criação dos insetos, e execução dos bioensaios. Também aos demais colegas do CNPDA que tornaram possível a impressão desta tese através dos trabalhos de computação (Margarida M. Zanon, Cláudio J. Poscidônio e Marcelo A. Prado, entre outros), e aos que auxiliaram na obtenção de referências bibliográficas e na correção das citações feitas (Maria Amélia T. Leme, Leila M. Lenk e Nilce F. Gatax).

Gostaria de expressar também os sinceros agradecimentos ao auxílio inestimável prestado nos trabalhos técnicos de laboratório na EMBRAPA principalmente a Valmir Alves, Mereznice R. Sobrinho e Mara Denise Mendes; e na UNICAMP à Maria Isabel Rodrigues, Fátima A. A. Costa, Antonio Quirino Simões e Maria Domingos Gonsalves.

Ao Instituto Biológico de São Paulo, através da seção de Controle Biológico de Pragas, na pessoa do Dr. Antonio Batista Filho e seus colaboradores, pelo fornecimento de pupas de lagartas da soja.

Ao auxílio inestimável prestado pelo Centro Nacional de Pesquisa da Soja (EMBRAPA) no fornecimento de pupas para bioensaios, principalmente ao colega Dr. Flávio Moscardi e seus colaboradores.

À ABBOT Laboratórios, na pessoa do Sr. Renê Bertozo, pelas amostras de inseticida biológico e pelas informações prestadas.

As indústrias fornecedoras de amostras de resíduos e subprodutos: Champion de Papel e Celulose, Cervejarias Reunidas Skol/Caracu, Fermisa S.A., Abatedouro Avícola CARGIL, Indústrias Gessy-Lever e Cervejaria Antártica. Igualmente ao Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) pelo fornecimento de amostras de água de côco.

Aos colegas Dra. Gisela N. Zanim e Dr. Flávio F. Moraes, pela oportunidade de participar do II Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas, onde pudemos obter novas informações e realizar contatos muito importantes para o bom desenvolvimento dos experimentos.

Ao CNPq pela oportunidade de poder participar de Simpósios e Congressos Internacionais, bem como pelo auxílio prestado à esta pesquisa.

Aos colegas do curso de pós-graduação da Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP - que compartilharam dos momentos difíceis e das pequenas vitórias.

Aos professores da Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP - pelos ensinamentos. Em especial à professora Dra. Pilar R. de Massagner, pelo auxílio na metodologia de avaliação de amostras de bactérias; ao professor Dr. Emilio Contreras

Busmão, e técnicos colaboradores, que realizaram análises de conteúdo de açúcares nas amostras de maior importância.

Aos técnicos do laboratório de Microbiologia da Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP - pela execução da esterilização de alguns materiais especiais, e pelo uso das instalações para alguns trabalhos.

Ao laboratório de Análise de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP - pela acessoria nos trabalhos de análise realizados.

Ao colaborador Celso Clemente, que executou os desenhos em papel vegetal, bem como os gráficos apresentados neste trabalho, de forma incansável e perfeita.

À minha auxiliar Vitória Gonzalez de Carvalho que cuidou dos meus filhos de maneira exemplar e sem medir esforços, sempre pontual e responsável.

À minha cunhada Rosalice M. P. Capalbo, pelo apoio e cuidados constantes desde o início da execução dos trabalhos, e pela cessão de seu escritório para a realização da etapa escrita deste trabalho.

À Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação pelo auxílio prestado para impressão do trabalho.

Enfim, a todos os que direta ou indiretamente auxiliaram no desenvolvimento do trabalho,

meus sinceros agradecimentos.