

**Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia de Alimentos**

**ESTUDOS DE OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE
BIOINSETICIDA BACTERIANO A PARTIR DO ISOLAMENTO
DE NOVA LINHAGEM DE *Bacillus thuringiensis***

Teresa J. Césare Vidaurre

Prof. Dr. Gil Eduardo Serra
Orientador

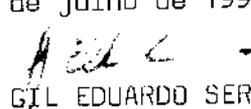
Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Título de *Doutor em Tecnologia de Alimentos*.

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por TERESA JACOBA CÉSARE VIDAURRE e aprovada pela Comissão Julgadora em 12.07.96.

Campinas
1996

Campinas, 12 de julho de 1996


PROF. DR. GIL EDUARDO SERRA
Presidente da Banca

UNIVERSIDADE	BC
INSTITUTO	
V. _____	Ex. _____
T. 14-10 07/28306	
PREÇO 667/96	
C <input type="checkbox"/>	D <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO 88,11,00	
DATA 16/08/96	
N.º CPD	

CM-00091202-4

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

C337e

Césare Vidaurre, Teresa Jacoba

Estudos de otimização da produção de bioinseticida bacteriano a partir do isolamento de nova linhagem de "*Bacillus thuringiensis*"/
Teresa Jacoba Césare Vidaurre. --Campinas, SP [s.n.], 1996

Orientador: Gil Eduardo Serra

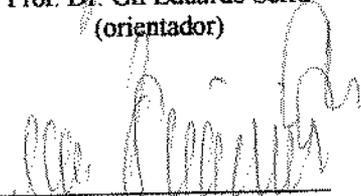
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. *Bioinseticida. 2. *Bacillus Thuringiensis*. 3. *Aedes aegypti*.
4. Otimização. I. Serra, Gil Eduardo. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

BANCA EXAMINADORA



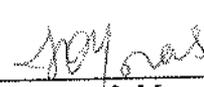
Prof. Dr. Gil Eduardo Serra
(orientador)



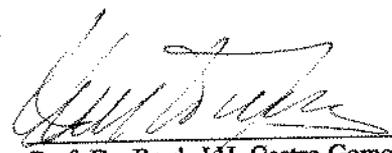
Prof. Dr. León Rabinovitch
(membro)



Prof. Dr. Roy E. Bruns
(membro)



Prof. Dra. Iracema de Moraes
(Membro)



Prof. Dr. Raul J.H. Castro Gomez
(membro)

Prof. Mauro Freitas Leitão
(membro)

Prof. Helia Sato
(Membro)

*A meus pais, Oscar e Ofelita com muito carinho
pelo exemplo de vida que me deram.*

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Gil Eduardo Serra pela orientação, compreensão, consideração, amizade e apoio que tornaram possível a execução deste trabalho. A minha gratidão.

Ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas CPQBA/UNICAMP, e em especial ao Laboratório de Biotecnologia, pela concessão do espaço físico e do apoio técnico na realização do trabalho.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro recebido.

Ao colega Edilberto Princi Portugal (CPQBA/UNICAMP) pela constante colaboração prestada ao longo do trabalho.

À Dra. Telma Franco (CPQBA) pela amizade, apoio e a valiosa ajuda durante a etapa de purificação e eletroforese.

Ao Dr. Silvio Andrietta (CPQBA) pela colaboração e paciência na etapa da planta piloto.

À Dra. Leccated, M. (*Institut Pasteur*) pelo fornecimento dos padrões e análises sorológicas.

Aos professores, funcionários, colegas de curso, amigos que direta ou indiretamente prestaram colaboração.

Agradeço com especial carinho, à Sirlene pela compreensão, apoio e companheirismo ao longo do curso de doutorado.

ÍNDICE

	Página
Resumo.....	i
Summary.....	ii
1. Introdução.....	1
2. Revisão bibliográfica.....	4
2.1. Vetores de importância na saúde pública.....	4
2.2. Controle microbiano de insetos.....	7
2.2.1 Uso de agentes biológicos para controle de vetores.....	10
2.3. <i>Bacillus thuringiensis</i>	12
2.3.1. Taxonomia.....	13
2.3.2. Principais toxinas do <i>B. thuringiensis</i> e seu modo de ação.....	14
2.3.3 Isolamento de novas linhagens.....	17
2.4. Produção de bioinseticidas por fermentação submersa.....	19
2.4.1. Seleção da linhagem.....	20
2.4.2. Variáveis do Processo.....	20
a) Substrato.....	20
b) Temperatura.....	22
c) pH.....	22
d) Aeração e Agitação.....	23
2.5. Aplicação de métodos de planejamento e otimização de experimentos.....	24
3. Material e Métodos.....	26
3.1. Isolamento de microrganismos esporuladores.....	27
3.1.1. Coleta de amostras.....	27
3.1.2. Isolamento seletivo das bactérias.....	27
3.2. Seleção de bactérias entomopatogênicas.....	28

3.2.1. Bioensaios	29
3.2.1.1. Determinação de CL ₅₀ e ITU.....	30
3.3. Caracterização do microrganismo.....	32
3.3.1. Testes morfológicos, bioquímicos e fisiológicos.....	32
3.3.2. Testes sorológicos.....	33
3.3.3. Eletroforese (SDS-PAGE) do cristal.....	34
a) Isolamento e Purificação do cristal.....	34
b) Electroforese (SDS-PAGE)	35
3.4. Otimização das condições da fermentação.....	36
3.4.1. Processo Fermentativo	36
3.4.1.1. Avaliação da Fermentação	37
3.4.2. Delineamento experimental e tratamento estatístico.....	38
3.4.3. Localização das condições ótimas	40
3.5. Seleção de fontes de carbono, nitrogênio e suplementação mineral.....	41
3.5.1. Substratos testados e pré-tratamentos	41
3.5.2. Seleção das fontes de carbono e nitrogênio	43
3.5.3. Seleção de suplementos minerais	45
3.5.4. Ajuste preliminar das concentrações dos componentes do meio	45
3.6. Otimização do meio de cultura.....	46
3.6.1. Delineamento estatístico.....	47
3.6.2. Localização das condições ótimas	49
3.7. Testes em Fermentador Piloto (“ Scale-up”).....	49
3.7.1. Características do Fermentador.....	50
3.7.2. Procedimentos Fermentativos.....	51
3.7.3. Teste de Scale-up e avaliação dos efeitos do oxigênio dissolvido	52
4. Resultados e discussões.....	53
4.1. Isolamento de <i>Bacillus</i> esporuladores.....	53

4.2. Seleção dos <i>Bacillus</i> entomopatogênicos.....	54
4.3. Caracterização do isolado SP-36 a nível de espécie.....	55
4.3.1. Características morfológicas.....	55
4.3.2. Características bioquímicas e fisiológicas.....	58
4.3.3. Caracterização da subespécie do <i>B. thuringiensis</i> SP-36.....	59
4.3.4. Perfil eletroforético das proteínas dos cristais por SDS-PAGE.....	60
4.4. Otimização das condições de fermentação.....	65
4.4.1. Análise geral dos resultados do planejamento experimental.....	65
4.4.2. Análise pela metodologia de superfícies de resposta (MSR)	
a) Efeito das condições de fermentação na contagem de esporos.....	70
b) Efeito das condições de fermentação no grau de formação do cristal...	76
4.4.3. Localização das condições ótimas.....	80
4.4.4. Aplicabilidade do modelo.....	82
4.5. Seleção dos componentes do meio de cultura.....	83
4.5.1. Seleção das fontes de carbono e nitrogênio.....	83
4.5.2. Seleção da suplementação mineral.....	85
4.5.3. Seleção final e ajuste preliminar da concentração dos componentes do meio de cultura	87
4.6. Otimização do meio de cultura.....	88
4.6.1. Análise geral dos resultados.....	89
4.6.2. Análise pela metodologia de superfícies de resposta.....	92
a) Efeito da concentração dos componentes do meio na contagem de esporos.....	92
b) Efeitos da concentração dos componentes do meio no grau de formação de cristal.....	98
4.6.3. Localização das condições ótimas.....	101
4.6.4. Aplicabilidade do modelo.....	103
4.7. Testes de scale-up.....	103
4.7.1. Comportamento do pH durante o crescimento do microrganismo.....	104
4.7.2. Influência do oxigênio dissolvido no crescimento do microrganismo.....	106

5. Conclusões.....	110
Referências Bibliográficas.....	112
Apêndice.....	134

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Vetores de doenças humanas e sua resistência a inseticidas químicos.....	4
Tabela 2. Casos de malária e dengue oficialmente registrados no Brasil.....	5
Tabela 3. Testes realizados para caracterização do isolado.....	33
Tabela 4. Preparo dos géis SDS-PAGE.....	35
Tabela 5. Equivalência entre morfologia celular e grau de formação de cristal	37
Tabela 6. Delineamento experimental dos ensaios de otimização das condições fermentativas	40
Tabela 7. Planejamento fatorial fracionário saturado 2^{7-4}	44
Tabela 8. Planejamento fatorial fracionário 2^{5-2}	46
Tabela 9. Níveis das variáveis do delineamento experimental 5^4	48
Tabela 10. Delineamento experimental 5^4 dos ensaios de otimização da concentração dos componentes utilizado na otimização do meio de cultura.....	49
Tabela 11. Atividade larvicida com <i>Aedes aegypti</i> (CL_{50} e ITU)	55
Tabela 12. Características fenotípicas do isolado SP-36.....	59
Tabela 13. Condições experimentais e resultados obtidos de acordo com o planejamento experimental 3^4 da metodologia de superfície de resposta.....	66

Tabela 14. Coeficientes de regressão e significância ¹ dos modelos das condições de fermentação submersa para a produção de complexo esporo- cristal por isolado <i>B.t. SP-36</i>	69
Tabela 15. Análise de variância dos resultados de esporos/ml (Y_1), obtidos no estudo dos efeitos das condições de fermentação	71
Tabela 16. Análise de variância dos resultados do grau de formação de cristal (Y_2), obtidos no estudo dos efeitos das condições de fermentação	76
Tabela 17. Testes de verificação das previsões do modelo para a produção do complexo esporo-cristal pelo isolado <i>SP-36</i>	82
Tabela 18. Atividade em CL_{50} e ITU do complexo esporo-cristal obtido com o isolado <i>SP-36</i> em condições otimizadas de fermentação.....	82
Tabela 19. Níveis de concentração dos componentes testados na 1ª etapa.....	83
Tabela 20. Matriz do delineamento experimental 2^{7-4} , resultados e efeitos na 1ª etapa.....	84
Tabela 21. Níveis de concentração dos componentes testados na 2ª etapa de seleção...	85
Tabela 22. Delineamento experimental, resultados e efeitos da 2ª etapa de seleção.....	86
Tabela 23. Níveis dos componentes testados na 3ª etapa.....	87
Tabela 24. Delineamento experimental, resultados e efeitos da 3ª etapa.....	87
Tabela 25. Condições experimentais e resultados obtidos de acordo com o planejamento experimental 5^4 por análise de superfície de resposta.....	90
Tabela 26. Coeficientes de regressão e significância ¹ da modelagem empírica da influência	

dos componentes do meio de cultura para a produção de complexo esporo-cristal com <i>B.t.</i> SP-36.....	91
Tabela 27. Análise de variância dos resultados de contagem de esporos (esp/ ml) (Y_1), dos efeitos da concentração dos componentes do meio.....	93
Tabela 28. Análise de variância dos resultados do grau de formação de cristal (Y_2), dos efeitos da concentração dos componentes do meio.....	99
Tabela 29. Resultados dos testes do scale-up.....	108
Tabela 30. Evolução da produção de esporo cristal pelo isolado <i>B.t.</i> SP-36 nas diversas etapas do processo de otimização.....	109

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Diagrama de fluxo das etapas de desenvolvimento de bioinseticida bacteriano a partir de novos isolados	26
Figura 2. Fluxograma do processo de purificação e isolamento dos cristais protéicos de <i>B. thuringiensis</i> em Sistema de Duas Fases Aquosas.....	34
Figura 3 Morfologia da colônia dos isolados SP-36, PR-38 e do <i>Bti</i>	56
Figura 4. Micrografia de células do isolado SP-36	57
Figura 5. Sistemas de purificação dos cristais por SDFA.....	61
Figura 6. Perfil electroforético SDS-PAGE das proteínas do cristal do isolado <i>B. t.</i> SP-36.....	63
Figura 7. Superfície de resposta para a função y_1 contagem de esporos (esp/ml), variando os níveis de agitação (X_2) e % de inóculo (X_3), fixando a temperatura em 30°C e pH inicial a 7,2.....	73
Figura 8. Superfície de resposta para a função y_1 (esp/ml), variando a temperatura (X_1) e pH inicial (X_4), e fixando a agitação em 250 rpm e inóculo em 3%.....	75
Figura 9. Superfície de resposta para a função y_2 (grau de formação do cristal), fixando o pH em 7,2 e temperatura em 30°C, variando a agitação (X_2) e % de inóculo X_3	78
Figura 10. Superfície de resposta para a função y_2 (grau de formação do cristal), fixando em 3% de inóculo (X_3) e 250 agitação (X_2), e variando a temperatura (X_1) e pH (X_4).....	79

Figura 11. Sobreposição das superfícies de resposta para a contagem de esporos e grau de formação de cristal, em função da agitação e % de inóculo, com pH e temperatura em níveis intermediários e indicando na região achuriada aquela da máxima contagem de esporos e lise combinadas.....	80
Figura 12. Sobreposição das superfícies de resposta para a contagem de esporos e grau de formação do cristal, em função da temperatura e pH inicial, fixando a agitação e inóculo em níveis intermediários (250 rpm e 3 %)	81
Figura 13. Superfície de resposta para a função y_1 (esp/ml), variando % de melação (X_1) e milhocina (X_2) fixando a água de levedura em 1.0 % e K_2HPO_4 em 0.5%....	94
Figura 14. Superfície de resposta para a função y_1 (esp/ml) variando os níveis de milhocina X_2 e água de levedura (X_3), fixando o melação e fosfato em níveis intermediários (0,5%) respectivamente	96
Figura 15. Superfície de resposta para a função Y_1 (esp/ml), variando os níveis de milhocina(X_2) e K_2HPO_4 (X_4), fixando o melação e água de levedura em (1,0 e 0,5 %).....	97
Figura 16. Superfície de resposta para a função Y_1 (GFC), variando melação (X_1) e milhocina (X_2) e fixando água de levedura (X_3) em 1,0 % e K_2HPO_4 (X_4) em 0,5 %	100
Figura 17. Sobre-posição das superfícies de resposta para a resposta y_2 (GFC) variando melação e milhocina fixando água de levedura e fosfato de potássio em (1,0 e 0,5 %)	102
Figura 18. Comportamento do pH durante o crescimento do isolado <i>B.t.</i> SP-36 em fermentador piloto com 50 % de oxigênio dissolvido (% OD)	105

Figura 19. Crescimento do <i>B.t.</i> SP-36 e comportamento do pH em fermentador com 30% oxigênio dissolvido	106
Figura 20. Crescimento e comportamento do oxigênio dissolvidado isolado SP-36 em fermentador com 50% OD.....	107
Figura 21. Crescimento do isolado SP-36 e comportamento do oxigênio dissolvido em fermentador com 30 % de OD.....	107

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e a otimização da produção de bioinseticida bacteriano a partir do isolamento e seleção de uma linhagem de *Bacillus thuringiensis* que apresentasse uma diferenciada e alta atividade inseticida contra larvas de mosquitos de importância na saúde pública. A partir de amostras de solo, isolou-se uma bactéria entomopatogênica, denominada SP-36. Este isolado apresentou uma atividade de 30.767 ITU/mg, contra larvas de *Aedes aegypti* quase duas vezes mais alta que a linhagem padrão *B. thuringiensis israelensis* IPS-82, e foi classificado taxonomicamente como sendo um *Bacillus thuringiensis*. Na sorotipagem do isolado, este foi classificado como uma cepa autoglutinante de *B.t.*. O perfil electroforético das proteínas que compõem os cristais do isolado (110, 68, 38 e 25 kDa) apresentou significativa diferenças com os polipeptídeos produzidos pela linhagem padrão. A otimização das condições fermentativas foram planejadas através da Metodologia por Superfícies de Resposta (MSR) com um delineamento experimental 3⁴. Os resultados experimentais demonstraram uma resposta de $1,37 \times 10^8$ para contagem de esporos, completa lise celular e atividade de 35.000 ITU/mg, utilizando-se meio basal em condições de 30°C, 350 rpm, 5 % de inóculo e 7,2 de pH inicial. Para seleção dos componentes de meio de cultura à base de sub-produtos agro-industriais, foram utilizados fatoriais fraccionários, permitindo a seleção das fontes de carbono, nitrogênio e suplementos minerais, assim como o ajuste preliminar das concentrações dos componentes. Foram selecionados os seguintes componentes: melão, água de maceração de milho, água de levedura e fosfato de potássio. Para a otimização da concentração dos componentes selecionados utilizou-se de delineamento central composto 5⁴ da metodologia por superfícies de resposta, obtendo-se contagem de $1,28 \times 10^8$ esporos/ml, em 24 horas com um meio otimizado: 3,5g/l de melão, 7,0g/l de água de maceração de milho, 16g/l de água de levedura e 6,0g/l de fosfato de potássio. Foram realizados testes de escalamento, com 30 e 50 % de oxigênio dissolvido, obtendo-se velocidades específicas de crescimento de 0,25 e 0,51 h⁻¹, e contagem de esporos de $1,76$ e $1,96 \times 10^9$ esp/ml respectivamente, em 24 e 18 horas.

SUMMARY

The purpose of this work was to develop and improve the production of bacterial bioinsecticide from a microbiological screening and selection of a *Bacillus thuringiensis* strain which presents a high and differentiated insecticide activity against mosquitoes larvae of public health importance. The entomopathogenic bacteria *B.t.* strain SP-36, has been isolated from soil samples, according to serotyping it as an auto-agglutinated *B.t.* strain. This isolate presented an activity of 30.767 ITU/mg against *Aedes aegypti* larvae, almost twice as high as the *B. thuringiensis israelensis* IPS-82 standard strain. The electrophoretic pattern of the proteins, which constitute the isolate crystals (110, 68, 38 and 25 kDa), has presented significant differences as to the polypeptides produced by the standard strain. The improvement of the fermentative conditions has been planned through the Response Surfaces Methodology (MSR) with an experimental design 3⁴. The experimental results have shown a response of 1,37 x 10⁸ for the spore count, complete cellular lysis and an activity of 35.000 ITU/mg, using a basal medium at 30°C, 350 rpm, 5% inoculum and initial pH 7,2. In order to select the culture medium based on agroindustrial by-products, fractional factorial designs have been used, so that the sources of carbon, nitrogen and mineral supplements could be selected, as well as the preliminary setting of the components concentration. The following components have been selected: sugarcane molasses, corn-steep liquor, yeast liquor and potassium phosphate. In order to improve the selected components concentration a central composite design 5⁴ of the response surfaces methodology was used, obtaining a count of 1,28 x 10⁸ spores/ml, in 24 hours, in an optimized medium: 3,5g/l of molasses, 7,0g/l of corn-steep liquor, 16g/l of yeast liquor and 6,0g/l of potassium phosphate. Scale-up tests have been performed, with 30 and 50% dissolved oxygen, obtaining specific growth rate of 0,25 and 0,51 h⁻¹, and spores count of 1,76 and 1,96 x 10⁹ spores/ml, in 24 hours, respectively

1. INTRODUÇÃO

Os dípteros de importância na saúde pública, como são algumas espécies das famílias *Culicidae* (*Anopheles*, *Aedes*, *Culex* e *mansonia*), *Simuliidae* (borrachudos), assim como *Moscidae*, que atuam na transmissão e disseminação de doenças endêmicas no Brasil e no mundo, causadas por vírus (febre amarela, dengue, encefalites), protozoários (malária e leishmaniose), filárias (filarioses como a elefantíase) e nematóides (oncocercoses) WORLD HEALTH ORGANIZATION/ WHO (1993).

Os programas tanto de controle como de erradicação de tais espécies são baseados quase que exclusivamente na utilização de larvicidas organo-sintéticos e piretróides nos criadouros destes insetos. Além destes compostos serem tóxicos ao homem e animais e causar problemas de poluição ambiental e desequilíbrio nas populações de insetos em geral, as espécies-alvo destes pesticidas estão apresentando populações resistentes a estes produtos (RUAS NETO & SILVEIRA, 1989; WHO, 1993; CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

A procura de métodos alternativos para o controle de população de insetos prejudiciais, levou à busca de agentes biológicos que causam toxemias em insetos, como é o caso das bactérias entomopatogênicas, especialmente da família *Bacillaceae*, e em particular algumas espécies do gênero *Bacillus*. Estas bactérias apresentam as características de esporular e formar corpos paraesporais ou "cristais" tóxicos; além da vantagem de inocuidade a vertebrados e ação bastante específica com alguns insetos (NORRIS, 1973; DULMAGE, 1981, HABIB & ANDRADE, 1986).

Formulações de inseticidas à base de inseticidas biológicos como o *Bacillus thuringiensis* vêm sendo utilizadas há mais de três décadas no controle de pragas agrícolas, e mais recentemente no controle de insetos vetores de doenças humanas e animais (DULMAGE, 1989; RAWLINS, 1989; PRIEST, 1992; FEITELSON *et al.*, 1992; KOZIEL *et al.*, 1993).

Entre as diferentes espécies de bactérias entomopatogênicas, apenas duas mostraram-se promissoras como agentes de controle para larvas aquáticas de dípteros: o *Bacillus thuringiensis* subespecie *israelensis* (*B.t.i.*) sorotipo H-14 e o *Bacillus sphaericus* (*B.s.*) (SUTHERLAND & KHOO, 1987; NICOLAS, 1992; PRIEST, 1992; BARJAC, 1989). No mercado internacional existem diversas formulações comerciais com estas espécies de bactérias, as quais vêm sendo utilizadas de forma crescente nos programas de controle integrado de mosquitos e simuliídeos (RIGBY, 1991; LAMBERT & PEFEROEN, 1992; PHILIPPE, 1995).

Até pouco tempo atrás, não haviam evidências observadas quanto à resistência do inseto alvo ao bioinseticida. Porém, pesquisas recentes indicam resistência de lepidópteros e dípteros a bioinseticidas à base de *B. thuringiensis* (MARRONE & MACINTOSH, 1993).

Dessa maneira pesquisadores e instituições como a WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), nos programas de controle de vetores, recomendam a procura de novos e mais eficientes microrganismos para eventual resistência dos insetos aos produtos comerciais à base de *B. thuringiensis* (MULLA, 1990; PRIEST, 1992; WHO, 1992; DOBROKHOTOV, 1993).

Alem disso, diversos pesquisadores ressaltam a importância de se realizar isolamento e seleção, nos respectivos países dos programas de controle, no esforço de procurar novos microrganismos com alto potencial larvicida e mais adaptados às condições de utilização, isolados do habitat natural (solo, lama, etc.) e com menor risco de alterar o meio ambiente. Esses autores ressaltam o potencial de biodiversidade do território brasileiro (BARJAC, 1989; DULMAGE, 1989; GUAYCURUS *et al.*, 1989; FRIDLENDER *et al.*, 1989; ZAHNER *et al.*, 1990; DIAS, 1994; CHARUNDATTAN, 1995).

A WHO (1993) no seu programa de Controle de Vetores, incentiva o desenvolvimento de tecnologia própria nos países em desenvolvimento, para a produção de bioinseticidas, à base de isolados autoctones de áreas endêmicas, utilizando-se meios de cultura à base de produtos regionais, recomendando realizar experimentos até escala piloto.

As previsões são que a utilização de bioinseticidas bacterianos para o controle de mosquitos deve expandir nesta década tanto no Brasil como no mundo. Assim em países com sérios problemas de endemias deve haver o máximo interesse em incentivar o uso destes produtos, principalmente em regiões urbanas e peri-urbanas, para evitar ou diminuir a utilização dos pesticidas químicos junto às populações (COUTINHO, 1990; EMBRAPA, 1994).

O Brasil apresenta-se como um excelente campo para o desenvolvimento e aplicação dos inseticidas bacterianos, devido à demanda e vantagens de um produto biológico e à existência de matérias-primas de baixo custo com composição adequada para a formulação dos substratos fermentativos a custo reduzido. Assim, é importante a disponibilidade de resíduos de diversas indústrias, especialmente alimentícias, que são sub-produtos ricos em carboidratos e proteínas, que viabilizariam economicamente os processos industriais de produção de inseticidas bacterianos (CAPALBO *et al.*, 1990; DIAS *et al.*, 1990; SILVA *et al.*, 1991; SANCHES *et al.*, 1994).

Na atualidade há um interesse das indústrias no investimento em inseticidas biológicos, devido à pressão da sociedade e dos ecologistas pela diminuição do uso dos agroquímicos e pelos

baixos custos do desenvolvimento de pesticidas biológicos em comparação aos químicos (EMBRAPA, 1995).

Há uma grande necessidade de pesquisas a nível nacional nas áreas de produção, principalmente da fermentação e de formulação de entomopatógenos, visando lançar no mercado brasileiro, produtos no mínimo com as qualidades dos atualmente importados (CAPALBO & MORAES, 1987; ZAHNER *et al.*, 1990; SILVA *et al.*, 1991; DIAS *et al.*, 1992; EMBRAPA, 1995).

Este trabalho teve por objetivo a obtenção e caracterização de novos isolados entomopatogênicos, assim como a otimização da produção do complexo esporo-cristal, visando contribuir para o desenvolvimento de novos bioinseticidas bacterianos, com as seguintes atividades específicas:

- Isolamento e seleção de bactérias esporuladoras que apresentem altas atividade contra larvas de vetores;
- Determinação da atividade larvicida e classificação taxonômica dos isolados selecionados;
- Estudos de caracterização das delta-endotoxinas dos cristais protéicos;
- Otimização das condições da fermentação em meio sintético, em função de uma máxima produção do complexo esporo-cristal;
- Seleção e otimização de substrato à base de subprodutos economicamente viáveis, em função de uma máxima produção do complexo esporo-cristal.;
- Testes de ampliação de escala em fermentador piloto.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Vetores de importância na saúde pública

Segundo dados da WHO (1993), as doenças transmitidas por vetores afetam mais de 3 bilhões de pessoas em países tropicais e subtropicais. A incidência anual da malária no mundo é de 270 milhões de casos, causando a morte de mais de 2,8 milhões de crianças só na África. As estimativas de pessoas com filariose no mundo é de 90 milhões. Também se estima no mundo 17,5 milhões de casos de oncocercose e 12 milhões de pessoas contaminadas pela *Leishmania*, com 1,5 milhões de novos casos por ano.

O uso de inseticidas sintéticos continua sendo o principal suporte dos programas de combate e controle de insetos vetores de doenças no mundo. No Brasil, o DDT é ainda o inseticida mais largamente empregado para o controle de vetores, por ser barato e ter elevado poder residual, mas por outro lado não é biodegradável, sendo acumulativo nas gorduras de animais de sangue quente, mostrando-se carcinogênico. A resistência dos mosquitos ao DDT foi observada na década dos 50. Na década de 1980, já havia populações resistentes de 84 espécies de culicídeos (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

No Rio Grande do Sul foi constatado que larvicidas organofosforados após 10 anos de uso mostravam-se ineficientes contra os simuliídeos, levando à necessidade da troca constante de produtos e sobredosagem, reduzindo-se desta forma a sua eficiência (RUAS NETO *et al.*, 1984; RUAS NETO & SILVEIRA, 1989). A relação entre algumas doenças, parasitas e vetores, bem como resistência dos vetores a produtos químicos está indicada na Tabela 1. Na atualidade a Superintendência de Controle de Endemias-SUCEN do Estado de São Paulo realiza o controle destes vetores utilizando quase exclusivamente organo-fosforados e piretróides (SUCEN, 1995).

Tabela 1. Vetores de doenças humanas e sua resistência a inseticidas químicos

doença	parasita	vetor	resistência
malária	<i>Plasmodium</i>	<i>Anopheles</i>	DDT, OPs, Cs, Cl
febre amarela e dengue	vírus	<i>Aedes</i>	DDT, OPs, Cs
encefalite	vírus	<i>Aedes e Culex</i>	DDT, OPs, Cs
filariose	<i>Wuchereria bancrofti</i>	<i>Aedes, Culex e Mansonia</i>	DDT, OPs, Cs
oncocercose	nematóide	<i>Simulium</i>	OPs
Leishmaniose	<i>L. braziliensis</i>	<i>Phlebotomus papatasi</i>	DDT
Numerosas doenças		<i>Musca domestica</i>	DDT, OPs, Cs

DDT: p-p'dicloro difenil tricloroetano, OPs: organofosforados e Cs: carbamatos, Cl: organoclorados

Fonte: modificado de Rawling (1989)

No Brasil a febre amarela e a dengue continuam sendo grave ameaça para o homem, tanto nas florestas como nas cidades. Assim, o Brasil é considerado como o país detentor de maior área enzoótica para febre amarela no Mundo. Os registros de casos de malária no Brasil vêm crescendo continuamente até 1992, (Tabela 2). Na região da Amazônia legal a malária é considerada endêmica com ocorrência de cerca de 99 % dos casos de malária no país. O fluxo migratório da Amazônia e Mato Grosso para o sul do país fez ressurgir o problema destas epidemias (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1995).

Tabela 2. Casos de malária e dengue oficialmente registrados no Brasil.

ANO	MALÁRIA	DENGUE
1982	221.939	12.000
1987	508.864	89.394
1990	560.396	40.462
1992	577.098	3.215
1994	568.311	56.621
1995	-----	111.586*

Fonte: Ministério da Saúde/Fundação Nacional da Saúde - FNS / SUCEN (1995);

* dados incompletos

O gênero *Anopheles* encerra todos os vetores conhecidos da malária humana ou paludismo. Além dessa parasitose, algumas espécies podem desempenhar papel na veiculação de outras moléstias, como a filariose e certas viroses. Dentre as espécies parasitárias frequentemente associadas a surtos de malária destacam-se: *Plasmodium vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*. Apresentando mais de 568,000 casos por ano, a maioria concentrados em Rondônia, no sul do Pará e norte de Mato Grosso, o agente causador é o protozoário *Plasmodium falciparum* considerado o mais perigoso, provoca uma morte a cada 10 pessoas infetadas, sendo preocupante o fato de que ainda não há vacina de segurança comprovada (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

No Brasil são encontradas mais de 50 espécies de mosquitos anofelinos vetores da malária, destacando-se principalmente o *Anopheles darlingi*, *A. aqualis*, *A. albitarsis*, como vetores primários e sendo considerados como vetores potenciais o *A. muneztovari*, *A. oswaldoi*, *A. triannulatus*, *A. strodei* e *A. evanse*, todos do subgênero *Nyssorhynchus*. Também é conhecido o papel de transmissor de paludismo dos anophelinos do subgênero *Kertessia*: *A. cruzii*, *A. homunculus* (DEANE, 1984 citado por CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

As espécies dos gêneros *Aedes* são importantes por serem transmissores das arboviroses que são enfermidades infecciosas causadas por vírus que se multiplicam nos tecidos dos artrópodes hematofagos, sendo transmitidas através de picadas para vertebrados susceptíveis. No Brasil temos quatro arbovirus de importância epidemiológica, por causarem doenças como: febre amarela,

dengue, oropuche e mayaro, acrescentando-se os arbovírus que causam encefalites (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

No Brasil o *A. aegypti* é o único vetor conhecido da febre amarela urbana e é também o único transmissor da dengue em nossos dias. A febre amarela silvestre é veiculada por mosquitos silvestres. O *A. albopictus* é o vetor natural em áreas rurais, sub-urbanas, e é considerado como vetor potencial "ponte" entre os ciclos silvestre e urbano de arbovírus no Brasil. O subgênero *Haemagogus* é o principal transmissor da forma silvestre de febre amarela em nosso país e em países limítrofes (Perú e Bolívia). A febre amarela urbana teve um declínio de casos, graças a medidas adotadas pelo governo no controle do vetor urbano (*A. aegypti*) e à vacinação da população. A transmissão da dengue tem como vetor primário o *A. aegypti*, e secundários o *A. albopictus*, *A. scutellares polynesiensis* e *A. shebridens*. Esta doença pode ser ocasionada por quatro tipos antigênicos do vírus *Flavivirus*, sendo que a forma de febre hemorrágica tem causado maior índice de mortalidade infantil em muitos países do sudeste asiático (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

Entre os insetos do subgênero *Culex*, o *C. quinquefasciatus* é o vetor principal da filariose bancroftiana no Brasil (o homem é o único hospedeiro da *Wuchereria bancrofti*). No continente americano o principal veiculador desta filaria é o *C. pipiens fatigans*. Assim também, este mosquito foi relacionado com o arbovírus Oropuche, doença que em 1991 atingiu cerca de 58000 pessoas em Rondônia. Além desse papel, a grande proliferação de algumas espécies como o *C. pipiens* pode constituir-se em problema para a população humana local pelo desconforto e inconveniências daí resultantes (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

Com comprovada especificidade e potência, o *Bacillus thuringiensis var. israelensis* (B.t.i) é considerado privilegiado entre os agentes altamente promissores de aplicação no controle de larvas de dípteros dos gêneros *Anopheles* e *Aedes*, e também dos simuliídeos (HABBIB, 1986; PRIEST, 1992). O *Bacillus sphaericus*, de introdução mais recente, tem também demonstrado ser bastante promissor ao combate a dípteros, principalmente *Culex* (SUTHERLAND & KHOO, 1987; FRIDLENDER, 1989).

O uso de produtos biológicos é recomendado para o controle de mosquitos em centros urbanos ou em cursos d'água, onde a aplicação de inseticidas químicos não é recomendada. Além da transmissão de doenças de saúde pública, esses insetos são os responsáveis pelas irritações decorrentes de picadas. Os dípteros também podem causar danos indiretos ao homem, como é o caso das pragas nas áreas agrícola e veterinária, como é o caso da mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans*), grande problema da pecuária brasileira (DIAS *et al.*, 1994).

2.2. Controle microbiano de insetos

Os insetos apresentam importante desempenho na natureza permitindo o reflorestamento do planeta através da polinização. Considerando esse aspecto, seria ideal controlar apenas os insetos transmissores de doenças ou nocivos à agricultura. O combate aos insetos tem sido feito com aplicação de pesticidas, como os organofosforados (OPs), carbamatos (Cs), e também o DDT e seus análogos, ciclodienos, etc. Estes produtos químicos apresentam largo espectro de ação, acarretando toxicidade ao homem e ao meio ambiente, podendo comprometer o equilíbrio do balanço biológico da natureza (ANDRADE, 1989).

Os insetos desenvolveram resistência a esses produtos químicos, havendo na atualidade 200 espécies de artrópodes resistentes aos pesticidas contemporâneos. Assim, as indústrias químicas desenvolvem mais inseticidas por sua vez mais potentes e mais caros. Como resultado o controle de vetores está sendo muito caro para os países em desenvolvimento (RAWLINS, 1989; DOBROKHOTOV, 1993; CHARUNDANTAN, 1995)

A resistência simultânea a vários inseticidas, apresentada por espécies de mosquitos vetores, tem dado crescente importância às pesquisas de métodos alternativos de controle de vetores. Assim se reportam diversos trabalhos com técnicas alternativas como o uso de extratos de vegetais, uso de hormônios, inibidores da formação de quitina das larvas, entre outros. O uso de agentes biológicos se apresenta como o mais promissor (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

Embora se saiba da existência de diversos microrganismos entomopatogênicos, poucos apresentam viabilidade para o uso como agente de controle biológico. Os vírus são os que apresentam maior variedade com mais de 650 tipos. No Brasil o *Baculovirus anticarsia* tornou-se um sucesso no controle da lagarta da soja (DIAS, 1994). Quanto ao uso de vírus no controle de mosquitos, nenhum tem demonstrado potencial promissor como agente de controle biológico de culicíneos (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

Alguns protozoários testados, *Nosema algerae*, *N. locustae*, *N. pyrausta*, *Vavraia culicis*, *culispora magna* e *Mattessi trogodermae*, apresentam propriedades inseticidas, mas não há perspectivas de sua utilização prática até o presente (RAWLINS, 1989; CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

Os fungos e bactérias são comercialmente mais promissores como agentes de controle biológico de insetos pela sua habilidade de produzir inseticidas por via fermentativa e pelo modo de atuação nos insetos alvo. Os fungos atuam por infecção e as bactérias através de toxinas. Os fungos *Metarhizium anisopliae*, *Hirsutella thompsoni* e *Bauveria bassiana* apresentam amplo espectro de

patogenicidade aos insetos, porém tem demonstrado baixa atividade em relação a outros agentes e baixa especificidade (DIAS, 1994).

Os fungos têm sido pesquisados quanto a seu potencial como controladores biológicos de mosquitos. Dentre os fungos imperfeitos têm sido considerados principalmente o *Culicinomyces clavosporus*, *Metarhizium anisopliae* e *Tohyopcladium cylindrosporium*; entre os zygomycetos destacamos *Oomycete fungi*, *Leptolegnia sp* e *Lagenidium giganteum*, além de numerosas espécies de *Coelomomyces*. Os problemas encontrados têm sido, a baixa especificidade, a alta dosagem necessária e as dificuldades de cultivo "in vitro". Atualmente pesquisa-se a capacidade entomopatogênica de novos fungos isolados de mosquitos brasileiros (COSTA *et al.*, 1991 apud CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

Entre os nematóides a família *Mermithidae* tem apresentado resultados positivos em experimentos visando o controle de larvas de mosquitos, inclusive em condições de campo. A dificuldade do cultivo *in vitro* tem limitado muito a produção em massa destes agentes. A espécie *Romanomermis culicivorax* é a mais estudada. São reportados numerosos invertebrados predadores, como a larva do gênero *Toxorhynchites*, com sucesso no controle de vetores da filariose bancroftiana no sudeste da Ásia. Também são estudados alguns peixes predadores, como possíveis agentes de controle (RAWLINS, 1989; CONSOLI & OLIVEIRA, 1994).

O interesse na utilização de bactérias entomopatogênicas para o controle de insetos, levou os pesquisadores a estudar as bactérias que formam esporos, pois é uma característica de persistência e um pré-requisito para que um agente possa ser produzido em escala comercial. Existem poucas espécies com alto potencial de uso, como a família *Bacillaceae* envolvendo dois gêneros, *Bacillus* e *Clostridium* (HABBIB, 1986).

As espécies do gênero *Bacillus* por suas características bioquímicas e fisiológicas, geralmente aeróbias ou facultativas e capacidade de usar diversos substratos, devido ao amplo complexo enzimático que possuem, assim como a formação de esporos e toxinas, fazem estes microrganismos privilegiados entre os agentes de controle biológico, além da vantagem de inocuidade a vertebrados e ação bastante específica com alguns insetos. Entre os principais agentes tem-se o *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* (*B.t.*), *B. larvae*, *B. sphaericus*, *B. lentimorbus* e *B. popilliae*. Entre os entomopatogênicos do gênero *Clostridium*, temos o *C. brevifasciens* e *C. malacosamae* (HABBIB, 1986).

As principais vantagens do uso de bactérias no controle de insetos são: alta segurança ambiental, alta especificidade e toxicidade para as pragas alvo, compatibilidade com métodos de controle químico (exceto alguns) e biológicos (outros patógenos, parasitoides e predadores),

possibilidade de utilização em manejo integrado de pragas, assim como o difícil desenvolvimento de resistência dos insetos (DIAS, 1994).

As diferentes linhagens de *Bacillus thuringiensis* *B.t.* produzem mais de 25 tipos de cristais protéicos tóxicos, sendo atualmente o agente de maior sucesso para o controle biológico de certos lepidópteros (mais de 182 espécies), coleópteros, dípteros e mais recentemente nematóides. O mercado mundial de produtos biológicos em 1990, estava em torno de 120 milhões de dólares, sendo que 80 % era de produtos à base de *B. thuringiensis* (LAMBERT & PEFEROEN, 1992).

Nos últimos anos o sucesso das pesquisas de clonagem de genes de proteínas do cristal, e da expressão destes em microrganismos endófitos associados a plantas de interesse, assim como em plantas transgênicas, estimulou o uso do *B.t.* como alternativa contra insetos na agricultura (FRANKENHUYZEN, 1993; FEITELSON *et al.*, 1992; KOZIEL, 1993).

Trabalhos recentes com as técnicas de DNA recombinante e de engenharia genética estão possibilitando a obtenção de novas linhagens de *B. thuringiensis* que apresentam amplificado espectro de ação, mutantes cristalíferos que não produzem esporos, e mutantes de *B.thuringiensis* que produzem cristal encapsulado (BOSH *et al.*, 1994; PORTER *et al.*, 1993; LERECLUS *et al.*, 1995). Assim numerosas patentes destes produtos estão sendo constantemente relatadas.

O *Bacillus sphaericus* 2362 tem uma ação toxigênica para larvas de *Aedes* aproximadamente dez vezes maior em relação à linhagem parental, com a introdução do gene da delta toxina de *B.thuringiensis* (PORTER *et al.*, 1993).

Estão sendo constantemente lançados no mercado produtos mais eficientes, como *Rhizobium* contendo toxinas de *B.thuringiensis* subsp. *tenebrionis*, contra coleópteros; toxina empacotada em células de *Pseudomonas fluorescens*, conhecida como "Cell Cap technology", originando o MVP[®] da Mycogem contra *Plutella xylostella*, *etc.* (RIGBY, 1991).

RIGBY, 1991 faz uma revisão completa sobre a situação dos produtos comerciais no mundo. Dentre os produtos geneticamente manipulados, com maior espectro de ação, o FOIL[®] que combina o *B. thuringiensis kurstaki* e *B. thuringiensis* subsp. *san diego* da Ecogen, além de muitos outros produtos de diversas empresas. Assim, também temos as algas azul esverdeadas transgênicas e vegetais como o tomate e o tabaco transgênicos, da Zéneca.

Até pouco tempo atrás, não haviam evidências observadas da resistência do inseto alvo ao bioinseticida. Porém, trabalhos de McGAUGHEY em 1979 apud MARRONE & MACINTOSH (1993) reportaram o primeiro caso de resistência ao Dipel[®] à base de *B.t.k* em laboratório.

TABASHNIK (1990) reportou o primeiro caso de resistência de lepidópteros a produtos a base de *B.t.* no campo nos EUA. Tem se notado também, a resistência de *C. quinquefasciatus* ao *Bacillus sphaericus* 2363 (SCHROEDER, *et al.*, 1989).

CHARUNDATAN (1995) ressalta a importância de se trabalhar com organismos isolados da região onde o bioinseticida será utilizado, por apresentar menor risco ao meio ambiente; também comenta que nos Estados Unidos hoje em dia é possível registrar um novo tipo de *B.t.* em apenas 3 a 6 meses, pois já existem muitos dados sobre o produto.

O mercado mundial de inseticidas é estimado em 4 bilhões de dólares, onde os produtos à base de *B. thuringiensis* ocupam a modesta faixa de 1,5 a 2 % do total, devido principalmente aos elevados custos de produção, à sua especificidade, assim como a sua baixa persistência no campo. Mas diversos estudos prospectivos apontam que novos produtos estão em desenvolvimento, combinando espécies mais potentes com melhores formulações para obtenção de produtos mais eficientes e estáveis (BERNHARD & UTZ, 1993; NICOLAS, 1992).

Os menores custos (US\$ 1 a 2 milhões) em menor tempo (3 a 5 anos) no desenvolvimento dos inseticidas biológicos, em comparação ao desenvolvimento de novas moléculas químicas, (US\$ 15-30 milhões em 7-9 anos), estão tornando economicamente atrativos a produção destes inseticidas. O crescimento da produção de *B.t.* aumentou em quase cinco vezes nestes últimos nove anos; no entanto, esta produção é ainda muito pequena (US\$ 10 milhões/ano) em relação aos produtos químicos (US\$ 13 bilhões) LAMBERT & PEFEROEN (1992).

2.2.1 Uso de agentes biológicos para controle de vetores

O *Bacillus thuringiensis*, espécie que foi considerada durante muito tempo como específica apenas para larvas de lepidópteros apresenta a subespécie *israelensis* (*B.t.i.*) que produz uma toxina especialmente ativa contra larvas de dípteros, principalmente larvas de *Culicidae* e *Simulidae* (GOLDBERG & MARGALIT, 1977). Assim, o *B.t.i.* H-14 sorotipado por Barjac e colaboradores apresenta-se na atualidade como o patógeno mais usado para o controle de larvas aquáticas de dípteros (BARJAC, 1990; BECKER & MARGALIT, 1993).

Trabalhos mostrando a atividade larvicida deste bacilo em *Aedes aegypti*, *Culex pipiens*, *Anopheles albimanus*, *Aedes albopictus* e outros insetos como *Choristoneura fumiferana*, *Spodoptera frugiperda* e *Trichoplusia ni* (lepidópteros), foram publicados por alguns pesquisadores (THOMAS & ELLAR, 1983; PEARSON & WARD, 1985).

O *Bacillus sphaericus*, tem também demonstrado ser bastante promissor para o combate de dípteros (SUTHERLAND & KHOO, 1987). Na sua fase parasítica, as células vegetativas do *Bacillus sphaericus* 2362 liberam toxinas capazes de afetar os tecidos e desencadear a bacteriose em larvas de dípteros. Este bacilo apresenta uma elevada atividade residual devido à sua alta capacidade de reciclagem, e alta persistência no ambiente aquático mesmo com alto teor de poluentes (SUTHERLAND & KHOO, 1987; BARJAC, 1989; NICOLAS, 1992).

Os larvicidas biológicos obtidos a partir do *B.t.i.* apresentam algumas limitações como sua baixa atividade residual, especialmente em águas poluídas. Entretanto os produtos à base do *Bacillus sphaericus*, além da alta atividade residual agem sobre as diferentes espécies de *Culex*, e não têm ação contra o *Aedes aegypti*. Deste modo, através do uso da engenharia genética, estão sendo realizados trabalhos para amplificar o espectro de ação dos bioinseticidas, onde o *B. sphaericus* seria recombinado expressando a toxina do *B.t.i.* (SUTHERLAND, 1987; NICOLAS, 1992; PORTER, 1993).

Outro problema no uso destes agentes é a sedimentação dos produtos em ambientes aquáticos, saindo da zona de alimentação dos insetos filtradores, como são as larvas dos dípteros. Nos esforços de superar os problemas de sedimentação, estão sendo testadas outras bactérias hospedes para a expressão destas toxinas, como as espécies *Caulobacter* e *Cyanobacterias*, que mostraram relativo êxito devido às baixas toxicidades obtidas (FEITELSON, 1992; LERECLUS *et al.*, 1993; PORTER *et al.*, 1993).

Entre os programas de sucesso no controle de vetores usando-se produtos à base de *B.t.i.*, temos o da Alemanha no vale do Reno em 1978, diversos programas piloto e grande escala nos E.U.A e vários países europeus. Na China a partir de 1987, implantou-se um amplo programa ao longo do rio Yang-Tsé, para controle da malária. Assim também na África a WHO tem vários programas implantados com êxito para controle de mosquitos principalmente transmissores da oncocercose (SALAMA & MORRIS, 1993; WHO, 1993).

No Brasil, alguns produtos à base de *B.t.i.* são importados e utilizados eventualmente. O único programa que está sendo mantido com regularidade é o de controle de mosquitos e simulídeos no litoral norte do Estado de São Paulo (Ubatuba, Caraguatatuba e Ilhabela). O programa mantido pela SUCEN há 3 anos tem resultados satisfatórios em relação ao controle dos simulídeos SUCEN (1995). Em Recife e Olinda (PE) duas cidades brasileiras com maior índice de filariose, o Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da FIOCRUZ está realizando trabalhos de controle integrado de mosquitos, usando o produto SPHAERIMOS® da Novo-Nordisk à base de *B. sphaericus* (EMBRAPA, 1994).

No Estado de Santa Catarina a EPAGRI-Empresa de Pesquisa Agropecuária de Santa Catarina está implantando um programa de controle de borrachudos em diversos municípios, com produtos à base de *B.t.i.* (GLOBO RURAL, 1995).

As limitações do uso dos bioinseticidas bacterianos se devem principalmente aos altos custos de produção, a pequena disponibilidade dos produtos no mercado, a estreita faixa de hospedeiros, bem como a baixa persistência (ou atividade residual no ambiente) e também a sensibilidade destes produtos a fatores físicos (radiação solar, temperatura, umidade, pH (EMBRAPA, 1994). Somam-se ainda a estes fatores, o fato de que no Brasil estes produtos ainda não poderem ser patenteados, embora estejam sendo realizados esforços para legislação do uso de agentes microbianos (EMBRAPA, 1995).

2.3. *Bacillus thuringiensis*

O *Bacillus thuringiensis* é uma bactéria mesófila com crescimento ótimo entre 28 e 35°C, anaeróbia facultativa, Gram-positiva, podendo usar diversos substratos devido ao complexo enzimático produzido pelas células. Suas principais características são: produção de um ou mais cristais paraesporais durante o ciclo da esporulação, e a patogenicidade a larvas de insetos (BULLA *et al.*, 1980). O mesmo autor cita NICKERSON (1974), que estudando a esporulação do *Bacillus thuringiensis* demonstrou a existência do ciclo do ácido tricarboxílico, TCA, no crescimento desta bactéria.

Trabalhos de ARONSON *et al.*, 1984 e BULLA *et al.*, 1980 descrevem em detalhes as mudanças morfológicas e fisiológicas associadas à formação do cristal, ocorrendo concomitantemente com a esporulação, sendo estas mudanças similares a as observadas nas outras bactérias formadoras de esporos.

De acordo com NORRIS (1973) o primeiro isolado de *Bacillus thuringiensis*, posteriormente denominado *B. thuringiensis* var. *sotto*, foi obtido por Ishiwata no Japão, em 1902, de uma lagarta de bicho-da-seda (*Bombix mori*). Em 1915, na Alemanha, a partir de *Anagasta kuehniella* -traça de farinhas, Berliner isolou uma bactéria que denominou *Bacillus thuringiensis*. Entretanto, apenas em 1953 foi demonstrada a presença de um corpo paraesporal na célula esporulada desta bactéria, o qual foi associado à sua atividade larvívica (NORRIS, 1973; NICKERSON & BULLA, 1974).

Logo após o início da II Guerra Mundial foi comercializado na França o primeiro inseticida à base de *B.t.* (Sporeine), visando o combate a um pequeno número de espécies de lepidópteros.

Posteriormente, foram descritas linhagens de *B.thuringiensis* com toxicidade mais abrangente, como as subespécies *kurstaki*, *finitimus*, *thompsoni* e *indiana*, com atividade para diversas espécies de lepidópteros (NORRIS, 1973).

Assim, Dulmage em 1971, isola a potente estirpe HD-1 da subespécie *kurstaki*, tornando economicamente factível a produção destes produtos (DULMAGE,1981). O *B.thuringiensis israelensis* (*B.t.i.*) foi isolado em 1976, de uma lagoa de alta salinidade, tornando-se rapidamente importante do ponto de vista ecológico e tecnológico, sendo o mais eficiente contra as espécies de *Aedes* (MARGALIT & DEAN, 1985).

Várias subespécies são relatadas a partir da década de 80. A subespécie *tenebrionis* isolada em 1983 e a *san diego*, têm revelado atividade larvicida em coleópteros (HERSNSTADT *et al.*, 1986). Foram relatadas linhagens de *B. t.* como as subespécies *ostrineae*, *indiana*, *colmeri*, *tohokuensis*, *kumamotoensis*, *tochigiensis* e *neoleonensis*, com cristais de composição e toxicidade desconhecida. Assim também, se relataram linhagens com atividade com fitonematóides como o *Heterodera glycines* (LAMBERT & PEFEROEN, 1992).

2.3.1. Taxonomia

O *Bacillus thuringiensis* é um bastonete, anaeróbio facultativo, com capacidade de produção de endosporos com forma elipsóide e que cataboliza poucos açúcares; a principal característica do *B. thuringiensis* é a presença de inclusões cristalinas responsáveis pela toxicidade a larvas de insetos.

Heimpel em 1967 (apud BARJAC, 1980), fazendo uma revisão sobre o *B.t.*, apresentou a taxonomia e discutiu os estudos desenvolvidos por diversos pesquisadores, que estabeleceram chaves de identificação dos microrganismos pertencentes ao grupo do *Bacillus cereus* entre os quais figura o *B. thuringiensis*. O Manual de Bacteriologia de BERGEY (1975), apresenta o *B. thuringiensis* distinguindo-o do *B. cereus* a cujo grupo pertence, pela patogenicidade a larvas de lepidópteros e produção de cristal protéico tóxico durante a fase de esporulação.

BARJAC & BONNEFOI, 1972 desenvolveram a metodologia de análise dos sorotipos baseados em análises sorológicas dos antígenos flagelares H. Assim, propostas foram feitas no sentido de se dar aos sorotipos o caráter de variedade, e diversos microrganismos foram divididos em variedades conforme as propriedades bioquímicas e/ou patogenicidade.

Porém estes testes apresentam algumas contradições de correspondência sorológica e atividade patogênica, e assim algumas subespécies do mesmo sorotipo apresentam delta-endotoxinas diferentes (BARJAC & FRANCHON, 1990).

Outro critério proposto de classificação do *B. thuringiensis* é através dos perfis de plasmídios. Este tipo de análise apresenta a mesma deficiência que a sorologia do antígeno flagelar H com respeito à atividade larvicida, devido ao fato de que a maioria dos genes dos cristais protéicos é codificada nos plasmídeos e estes podem ser transferidos a outras linhagens por conjugação, gerando um novo tipo de toxina, o que pode causar a falta de correlação entre sorotipo e o tipo de toxina previamente existente em uma dada linhagem (GONZALES *et al.*, 1982). A tendência atual é classificar os *B. thuringiensis* com base na estrutura dos genes e no perfil de patogenicidade (DEBABOV *et al.*, 1984; HÖFTE & WHITELEY, 1989; KAJI, 1993).

2.3.2. Principais toxinas do *B. thuringiensis* e seu modo de ação

As diferentes espécies de *B. thuringiensis* podem sintetizar vários tipos de toxinas; entre as principais exotoxinas temos a α , β e γ , destacando-se as δ -endotoxinas por sua alta atividade inseticida (HÖFTE & WHITELEY, 1989). A atividade tóxica do *B.t.* se deve principalmente à inclusão paraesporal ou cristal, descoberto por Hannay em 1953, que consiste em um agregado de moléculas protéicas, cujas proteínas conhecidas como δ -endotoxinas, nome sugerido por Heimpel em 1967, apresenta alta atividade inseticida. Algumas espécies de *B. thuringiensis* sintetizam uma exotoxina termoresistente denominada β -exotoxina ou thuringiensina com atividade contra dípteros, que apresentou atividade teratogênica para vertebrados, o qual levou nos EUA a proibição do uso de linhagens que produzem essa toxina (DULMAGE, 1981).

HABIB (1986) relatou quem em 1953 Toumananoff descobriu uma toxina solúvel em água, termolábil e tóxica para insetos que foi denominada α -exotoxina. Citou também a Gingrich *et al.*, que em 1974 reportaram uma toxina que tinha atividade contra piolhos de mamíferos, que foi denominando fator piolho "louse factor".

Foi reportada a presença da fosfolipase e a protease chamada inibidor imuno A (InA), tóxica a larvas de lepidópteros e dípteros LOVGREN *et al.*, 1990 apud KAJI (1993).

O cristal é formado durante a segunda fase da esporulação. As características químicas, sorológicas e patogênicas das proteínas do cristal são idênticas às proteínas da parede do esporo, entretanto a quantidade de proteína nas paredes é bem menor que no cristal (BULLA *et al.*, 1989; ARONSON *et al.*, 1984). Os genes da proteína do cristal do *B. thuringiensis* encontram-se

distribuídos em um ou mais plasmídeos de tamanho entre 45 a 225 Kb e no cromossomo de algumas linhagens (DEBABOV *et al.*, 1984).

As diferentes subespécies de *Bacillus thuringiensis* produzem cristais diferentes tanto em número como em forma (bipiramidal, cubóide, ovóide, amorfa etc.), como na composição protéica das δ -endotoxinas, o que proporciona os diferentes espectros inseticidas. Assim, os genes dos cristais de várias espécies de *B. thuringiensis* podem ter sido recombinados acarretando toxinas com estruturas e propriedades funcionais diferentes (HÖFTE & WHITELEY, 1989).

Baseado na atividade biológica e características moleculares as δ -endotoxinas se classificam em 5 tipos principais: Cry I, tóxica a lepidópteros; Cry II, a dípteros; Cry III, a coleópteros; Cry IV, a dípteros e lepidópteros e Cry V a lepidópteros e coleópteros e, ultimamente, foi reportada a CryB, com atividade contra nematóides, além da Cyt (Cytolisina) de especificidade citolítica não específica (LERECLUS *et al.*, 1993).

A maioria dos cristais protéicos é denominada de protoxina por apresentar toxicidade a larvas dos insetos apenas quando convertida em polipeptídeos pequenos, através da proteólise no intestino do inseto. A síntese da protoxina corresponde de 33 a 43 % do total da síntese de proteína e compreende aproximadamente 20 - 30 % do peso das células esporuladas (ARONSON *et al.*, 1984; AGAISSE & LERECLUS, 1995).

A diferença do *B.t.i.* em relação a outras subespécies é que o cristal, de 0,7 a 1,2 μ m de diâmetro, apresenta 3 inclusões cristalinas de diferentes formas e tamanhos, rodeada por um envelope protéico de composição desconhecida (FEDERICI *et al.*, 1990). Os genes associados com a produção da toxina do cristal do *B. t. israelensis* residem no plasmídeo 72-mD e plasmídeo 112 Kb (ARONSON *et al.*, 1984).

O cristal do *Bacillus thuringiensis israelensis* consiste de várias proteínas de 135 (cry IVA), 128 (CryIV), 65 (CryD) e 27 KDa (CytA) atuando sinergisticamente para uma efetiva ação tóxica contra dípteros, sendo observada que nenhuma das proteínas apresenta alta toxicidade isoladamente em relação ao complexo total do cristal (PEARSON & WARD, 1985; FEDERICI *et al.*, 1990).

FEDERICI *et al.* (1991) relatou que os cristais com propriedades mosquiticidas estavam compostos de proteínas de 28, 68, 125 e 135 kDa. Inclusive para distintas sub-espécies aos do *B.t.i.* como a linhagem PG-14 da sub-espécie *morrisoni* e *kurstaki*.

Na atualidade se conhecem diferentes cepas e sorotipos de *B. thuringiensis* com propriedades mosquiticidas. São classificadas de acordo com sua atividade larvicida e composição dos polipeptídeos do cristal: Grupo I; microorganismos com cristais compostos de

proteínas de 28, 68, 125 e 135 kDa, similares aos do *B.t. israelensis*, inclusive para distintas sub-espécies como a sub-espécie *morrisoni* PG-14 (H8a8b), *canadensis* 1152-1 (H5a5c), *thomsoni* (H-12), *malaysiensis* (H-36) e dois isolados autoaglutinantes K6 e B51; Grupo II; apresenta cristais com diferentes polipeptídeos como as subespécies *medellin* (H30) com polipeptídeos de 100 a 30 kDal, *jegathesan* (H28a 28c) com proteínas de 77 a 23 kDa; e o Grupo III, com baixa atividade, como as subespécies *kyushuensis* com proteínas de 140 a 25 Kdal e *kukuokaensis* que apresenta cristais com polipeptídeos de 90 a 27 kDa. Todos estes isolados apresentam a toxina citolítica com peso molecular de 25 a 30 kDa, (DELÈCLUSE *et al.*, 1995).

GILL *et al.*, 1992 e KHAWALED *et al.*, 1992 reportaram os mecanismos de ação das endotoxinas, causando a morte das larvas por intoxicação ou septicemia após a ingestão dos esporos e dos cristais. A eficiência de uma toxina em particular é dependente da solubilidade do cristal, atuação proteolítica na protoxina e a afinidade deste com os receptores disponíveis no intestino das larvas. Estas toxinas interagem com as células do epitélio do intestino das larvas de insetos susceptíveis; estudos indicam que as toxinas induzem à formação de pequenos poros na membrana das células provocando um desbalanço osmótico e, conseqüentemente, as células do tecido epitelial do intestino incham até a lise e a larva pára de se alimentar e morre.

CHILCOTT *et al.*, 1990 e KHAWALED *et al.*, 1992 reportaram os mecanismos da ação das toxinas do *Bti* em larvas de *Aedes aegypti*. O esporo também atua no controle de insetos quando penetra a parede do tubo digestivo destes e pode reproduzir-se em seu interior. Neste caso, o inseto morrerá com características de septicemia e não de toxemia como no caso de morte pelo cristal (HABBIB & ANDRADE, 1986).

Vários fatores, em conjunto, podem proporcionar o grau de especificidade inseticida. A eficiência da solubilização do cristal e ativação proteolítica das proteínas do cristal no intestino das larvas codeterminam a especificidade destas pela alta afinidade pelos sítios de ligação das células do epitélio intestinal. O nível de toxicidade parece estar correlacionado com a concentração e ou afinidade de tais sítios de ligação (HOFMANN *et al.*, 1988 apud KAJI, 1993).

GILL *et al.* (1992) sugerem que embora a ação tóxica seja devida à parte terminal -N da proteína do cristal do *B.t.*, a parte -C terminal determina as ligações específicas com os receptores das membranas do intestino das larvas. A região -N terminal é hidrofóbica enquanto que a região do -C terminal é hidrofílica.

Em geral, as toxinas do *B. thuringiensis* são instáveis no meio ambiente e podem ser degradadas após 48 horas; assim a aplicação do produto deve ser repetida regularmente

encarecendo o combate aos vetores. No entanto, a carcaça de larvas de *A. aegypti* mortas pelo *B.t.i.* pode propiciar o reciclo de bactérias e multiplicação dos esporos (ALY *et al.*, 1985; KHAWALED *et al.*, 1992 e PANTUWATANA & STTABONGKOT, 1990).

2.3.3 Isolamento de novas linhagens

O descobrimento de novas linhagens de *B. thuringiensis* com diferentes atividades inseticidas, além de lepidópteros, tais como a do *B.t.i.* contra dípteros por GOLDBERG & MARGALIT em 1977, impulsionou enormemente o mercado dos bioinseticidas, tornando de grande importância os programas de "screening" à procura de novas linhagens de *B. thuringiensis*, com ação contra insetos economicamente importantes (LAMBERT & PEFEROEN, 1992; PORTER, 1993, KOZIEL, 1993; PHILIPPE, 1995).

A partir desses esforços, principalmente de empresas comerciais, foram encontradas linhagens com atividade contra coleópteros (HERRSNSTADT *et al.*, 1986). Recentemente foi relatada patente de linhagem de *B.t.* com atividade contra nematóides; também são relatadas várias linhagens com atividade desconhecida (LAMBERT & PEFEROEN, 1992).

Assim, observa-se numerosas patentes de organismos modificados geneticamente, apresentado espectro de ação amplificado, assim como de plantas transgênicas protegidas com genes de *B.t.*. Dessa modo, na atualidade há um grande esforço à procura de microrganismos com atividade contra insetos domésticos, de jardins, pragas de interesse agropecuário de todos os possíveis insetos a serem controlados.

Até há pouco tempo não haviam evidências da resistência do inseto alvo ao bioinseticida. Porém, pesquisas recentes indicam resistência de lepidópteros e dípteros a bioinseticidas à base de *B. thuringiensis* (McGAUGHEY, 1985; TABASHNIK *et al.*, 1990; DAVIDSON, 1990; MARRONE & MACINTOSH, 1993).

Também foi observada a resistência de *Culex quinquefasciatus* ao *Bacillus sphaericus* 2362 (SCHROEDER *et al.*, 1989). Embora a resistência a produtos comerciais de *B.t.* não seja frequente, este fato se tornou importante para as empresas comerciais à procura de novas linhagens com diferentes espectros de ação inseticida para posterior substituição do produto.

Embora na atualidade existam dois agentes (*B.t.i.* e *B.s.*) de alta atividade e largamente utilizados contra vetores, assim como duas espécies promissoras em estudos (*Clostridium bifermentans* var *malaysia* e *B. t. medellin*), é importante continuar a procura de novos isolados,

que se diferenciem significativamente na sua potência, modo de ação e toxinas em caso de ocorrer resistência aos produtos usados.

Existem programas de isolamento e de formação de bancos e germoplasma de Bacilos entomopatogênicos em diversas instituições em todo o mundo; o catálogo da Unité des Bacteries Entomopathogenes do *Instituto Pasteur* (Paris, França) é recomendado como referência pela WHO. No Brasil, o CENARGEN/EMBRAPA e FIOCRUZ incentivam os programas de “screening”, recomendando aos pesquisadores o depósito das linhagens nos bancos de germoplasma, especialmente os organismos que apresentem atividades de interesse econômico ou acadêmico.

Dessa maneira, renomados pesquisadores recomendam o levantamento de cepas brasileiras de *B.t.i.* e *B.s.* enfatizando a grande biodiversidade brasileira em ambientes aquáticos e criadouros de pernilongos e borrachudos (BARJAC, 1989; HABBIB, 1989; ZAHNER *et al.*, 1990; DIAS, 1994).

O *B. thuringiensis* é um microrganismo de ampla distribuição no mundo sendo encontrado em quase todas as partes onde foi procurado (DE LUCCA & SIMONSON, 1981; OHBA, 1986; MARTIN *et al.*, 1989; ORDUZ *et al.*, 1992; CHILCOTT *et al.*, 1993, KAWALEK *et al.*, 1995; RABINOVITCH, *et al.*, 1995).

ORDUZ *et al.*, 1992 mencionam que isolaram na Colômbia uma nova subespécie de *B.t.*, denominada sorotipo H-30 (*B. t. medellin*) com atividade larvicida para mosquitos. KAWALEK *et al.*, 1995 relatam a subespécie *jegathesam* na Malásia, com atividade mosquiticida e sorotipo H-28a28c. RABINOVITCH *et al.* (1995) relataram as subsp. *oswaldocruzi* e *braziliensis* com sorotipos H-38 e H-39.

MARTIN & TRAVERS *et al.*, 1987 recomendam o uso de meios de cultura seletivos contendo altas concentrações de acetato, para o isolamento de *Bacillus thuringiensis* do solo, sendo esta uma metodologia de “screening” altamente seletiva.

A procura de novas toxinas deve ser constante e não ser confinada só aos bacilos, já que recentemente foi reportada uma linhagem de *Clostridium bifermentans* var. *malaysia* (*C.b.m.*) com alta atividade contra Anofelinos (PORTER, 1993). Assim, a WHO (1993) recomenda a procura de microrganismos que apresentem altas atividades e amplos espectros de ação, especialmente contra moscas e usando-se de técnicas que possibilitem encontrar microrganismos não esporuladores; recomendam também o “screening” de fungos.

2.4. Produção de bioinseticidas por fermentação submersa.

A produção do *B. thuringiensis* por fermentação submersa não envolve técnicas diferentes daquelas utilizadas tradicionalmente para a produção de enzimas e antibióticos ou outros produtos fermentados. A produção comercial de inseticidas microbianos requer uma linhagem selecionada com alta atividade larvicida e bem adaptada ao processo fermentativo; as condições de cultivo devem ser estabelecidas em função da máxima produção de esporos associados ao cristal tóxico, porém o que mais interessa é sua potência tóxica final ao inseto de interesse. Os produtos à base deste bacilo geralmente contém duas frações ativas: o esporo e o cristal proteico, também chamados complexo esporo-cristal. (DULMAGE & RHODES, 1971; DULMAGE *et al.*, 1990; BEEGLE *et al.*, 1991).

VAN BRUNT (1986) menciona que os processos fermentativos são dispendiosos, devido principalmente a: equipamentos caros; os altos custos de energia para as operações de esterilização, agitação e aeração do meio; e por último as operações de recuperação, que encarecem ainda mais estes processos. A viabilidade técnico-econômica dos processos fermentativos é obtida mediante a otimização das suas condições, e formulação adequada do meio, de modo que resultem em taxas elevadas de conversão dos nutrientes em biomassa.

Segundo WINKLER, 1988 os fatores econômicos a serem considerados nas indústrias de biotecnologia são: a obtenção de altos rendimentos do produto final, altas produtividades e altas taxas de conversão do substrato. O mesmo autor reporta que os custos do meio de cultura na produção comercial de produtos biotecnológicos podem ser de até $\frac{3}{4}$ do total dos custos do processo de fermentação. Assim sendo, os principais objetivos dos processos fermentativos são uma maximização da concentração do produto em um mínimo tempo.

Um fator muito importante para a diminuição dos custos de produção dos bioinseticidas bacterianos é através da utilização de matérias primas de baixo custo na formulação dos meios de cultura. É o caso de resíduos, especialmente da indústria de alimentos, que são sub-produtos complexos e ricos em carboidratos e proteínas, que podem viabilizar economicamente os processos industriais de produção de inseticidas bacterianos (WINKLER, 1988; MORAES *et al.*, 1990; DIAS, 1992; SANCHES *et al.*, 1994).

Em geral, o meio de cultura consiste de fontes de carbono e nitrogênio, além de alguns sais minerais. Como regra geral pode-se estipular que a temperatura varia entre 28 e 30°C, visto que o *B. thuringiensis* é bactéria mesófila. O pH inicial costuma ser ajustado ao redor de 7,0 e a aeração e agitação são indispensáveis. Ao final do processo, que geralmente dura de 20 a 60 horas, são obtidas cerca de 10^8 - 10^9 esporos/ml de meio fermentado. Este então é filtrado e centrifugado ou concentrado por evaporação, e finalmente secado geralmente por liofilização (VANDEKAR & DULMAGE, 1982; DULMAGE *et al.*, 1990; BEEGLE *et al.*, 1991).

A formulação do produto final envolve o ajuste da concentração a um nível adequado de Unidades Internacionais UTI/mg, a adição de coadjuvantes, fotoprotetores, espalhantes e adesivos, de forma a garantir uma boa cobertura das superfícies (COUCH & IGNOFFO, 1981; DULMAGE, 1981; MULLA, 1990).

2.4.1. Seleção da linhagem

As variedades de *B. thuringiensis*, também denominadas linhagens ou cepas, utilizadas em formulações comerciais variam de uma a outra empresa, e são substituídas quando novas variedades com maiores atividades são obtidas. Segundo o processo de fermentação utilizado e produto final desejado, se deverá optar pela linhagem mais adequada (COUCH & ROSS, 1980; CAPALBO & MORAES, 1987; LERECLUS *et al.*, 1993).

2.4.2. Variáveis do Processo

a) Substrato

A escolha do meio, depende principalmente de três fatores: disponibilidade local, custo e exigências do microrganismo. Assim, meios simples (minimizando o número de componentes) são desejados. Assim também, há que ter presente as etapas finais de recuperação ou “downstream” do processo, onde geralmente são usados filtros, assim, é recomendável selecionar meios que não interfiram nestas operações, sendo preferível usar produtos com partículas finas, inferiores a 200 mesh (DULMAGE, 1989).

Uma vez que a atividade inseticida está relacionada principalmente com o cristal e com o esporo bacteriano, o que se deseja ao final da fermentação é um alto rendimento destes elementos. A produção de metabólitos microbianos pode ser controlada pela escolha correta das condições de cultura utilizadas, bem como pela escolha da variedade do microrganismo (COUCH & ROSS, 1980; DULMAGE *et al.*, 1981; BEEGLE *et al.*, 1991).

A natureza das fontes de carbono e nitrogênio é determinante na formação do esporangio, e o balanço carbono:nitrogênio (C:N) pode determinar quando ocorrerá a formação do esporo (FALOCI *et al.*, 1990; AVIGNONE-ROSSA *et al.*, 1990).

SMITH (1982) trabalhando com *B. thuringiensis israelensis* observou também variação na esporulação e atividade biológica decorrentes da variação de composição do meio. O mesmo autor, observou que o glicerol se mostrou a fonte de carbono mais indicada para a obtenção de um produto com alto poder tóxico. Do mesmo modo, FALOCI *et al.*, 1990 reportaram os mesmos efeitos na produção da endotoxina com o *B.t. israelensis*.

SCHERRER & LUTHY, 1973 estudaram a influência da concentração de glicose sobre a endotoxina do *B. thuringiensis* e um meio definido acrescido com extrato de levedura. Os autores determinaram que a concentração ótima de glicose estava entre 6 e 8 g/l, e verificaram uma correlação direta entre a concentração de glicose e o tamanho de cristal, além da alteração da potência tóxica.

Foi verificado que altas concentrações de nutrientes orgânicos (acima de 25 g/l) podem retardar a formação do esporo e reduzir a porcentagem de células em estado de esporulação (ARCAS & YANTORNO, 1987). FODA *et al.*, 1985 realizaram estudos fisiológicos com *B.thuringiensis var. entomocidus*, confirmando a importância da taxa de oxigenação na presença de altas concentrações de glicose (até 25 g/l), nos níveis de crescimento, esporulação e potência do cristal. Do mesmo modo, ARCAS *et al.*, 1987 ressaltam a importância de estudar os efeitos de altas concentrações de nutrientes (até 56 g/l) no rendimento das fermentações em batelada alimentada ("fed-batch").

A presença de nitrogênio no meio de cultura para a produção de *B. thuringiensis* é considerada importante na biossíntese do cristal tóxico (SALAMA *et al.*, 1983; PEARSON & WARD, 1988).

AVIGNONE *et al.*, 1990 ressaltam a importância do estudo da relação entre nitrogênio orgânico e inorgânico, afirmando que as combinações dessas fontes afetam mais a produção das endotoxinas do *B.t.i.* do que as relações C:N, recomendando estudar as interações da concentração do $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ com fontes orgânicas.

DHARMISTHITI & PANTUWATANA (1985) estudando a produção do *B.t.i.* e *B. 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, e produção de cristal tóxico.

A presença de ions manganês, cálcio, zinco e ferro tem sido recomendada com frequência, para a esporulação de diferentes bactérias, salientando-se a importância do cálcio na esporulação e termo-estabilidade das mesmas (NICKERSON & BULLA, 1974; ARCAS *et al.*, 1984). O potássio também é importante no crescimento, esporulação e formação da endotoxina do *B.t.* conforme salientado por FODA *et al.*, 1985 e WASISAKA *et al.*, 1982.

Alguns trabalhos reportam a utilização de matérias primas nativas e resíduos da agricultura, como meios de cultura, com excelentes resultados e a custos reduzidos (OBETA & OKAFOR, 1984; EJIFOR & OKAFOR, 1989; ABDEL-HAMED *et al.*, 1990b e 1991; SALAMA & MORRIS, 1993).

Concluindo que a produção de toxina pode variar entre isolados de um mesmo sorotipo de *B. thuringiensis*, e que não há um substrato único recomendado, este deve ser selecionado para cada isolado (DULMAGE & RHODES, 1971; SMITH, 1982; SALAMA *et al.*, 1983; FALOCI *et al.*, 1990).

b) Temperatura

Alguns autores (IGNATENKO, 1983; NICKERSON & BULLA, 1974) observaram que a redução da temperatura de incubação poderia promover a formação de células e esporos anormais, bem como a termoestabilidade dos esporos poderia ser afetada; esporos formados a temperaturas elevadas, da ordem de 35-40°C, são mais termo-resistentes. IGNATENKO (1983) sugere que se mantenha a temperatura de 30°C durante o crescimento do *B. thuringiensis* até o estágio estacionário e, a seguir a temperatura seja elevada até 35°C (estágio de esporulação); agindo desta forma os autores afirmam que se obtém um maior rendimento em esporos termoestáveis viáveis. BEEGLE *et al.*, 1993 citam trabalhos que recomendam 30°C antes da fase log, 28°C durante a fase log, e 32°C após esta fase.

c) pH

Vários pesquisadores trabalhando com *B. thuringiensis* observaram que o pH do meio de cultura inicialmente ajustado para 7,0 diminui nas primeiras duas a três horas do processo fermentativo. Essa queda no valor de pH foi explicada pela utilização da glicose do meio, com formação dos ácidos acético e pirúvico. Nos estágios seguintes estes ácidos são metabolizados, provocando um retorno do pH à neutralidade, chegando a atingir valores ao redor de 8,0 nas fases de esporulação e lise (YOUSTEN & ROGOFF, 1969; BULLA *et al.*, 1980).

Observações de CAPALBO & MORAES, 1988 indicaram que o controle do pH do meio de cultura durante a fermentação do *B. thuringiensis* não promove o aumento da esporulação, chegando em alguns casos a reduzir o número de esporos formados. Deste modo, os autores sugerem que o acompanhamento de uma fermentação submersa com *B. thuringiensis* pode ser realizado de forma simples e rápida, através da evolução do pH do meio de cultura. Desta forma, o pH do meio de cultura é monitorado, mas não corrigido, nas fermentações de *B. thuringiensis*.

d) Aeração e Agitação

Dentre os elementos que constituem o meio de cultura, o oxigênio mostra-se como um componente necessário, pois ocupa um lugar de destaque na respiração dos microrganismos aeróbios e facultativos. As finalidades de aeração e agitação nas fermentações são de suprir oxigênio aos microrganismos e homogeneizar o meio de cultura, de forma a permitir uniformidade na suspensão dos microrganismos e acelerar a velocidade de transferência de massa (HARRINSON, 1973).

O *B. thuringiensis* sendo uma bactéria anaeróbia facultativa, o oxigênio é importante no seu desenvolvimento, auxiliando também na utilização efetiva dos nutrientes. Porém essa necessidade é menor nos estágios de esporulação do que durante as etapas de germinação e crescimento (BULLA *et al.*, 1983).

SCHERRER *et al.*, 1973 tentaram relacionar a taxa de aeração do processo de produção do *B. thuringiensis* com a toxicidade 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 proteico 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.

As necessidades de altas taxas de aeração na esporulação e síntese da delta-endotoxina por *B. thuringiensis* foram reportadas por vários pesquisadores (FODA *et al.*, 1985; PEARSON & WARD, 1988; AVIGNONE-ROSSA *et al.*, 1992).

Especificamente em relação à influência do oxigênio dissolvido (% OD) na síntese da delta-toxina por *B. thuringiensis*, as informações são escassas e mostram-se contraditórias. Deste modo temos que SANTANA (1980) relata os efeitos do oxigênio dissolvido no crescimento do *B. thuringiensis*, encontrando que a máxima velocidade específica de 0.61 h⁻¹ de crescimento foi atingida com 10 % O.D.

KARIN *et al.*, 1993 reportaram os efeitos da % OD na esporulação e toxicidade do *Bacillus sphaericus*, relatando que entre 20 a 50 % OD o substrato era consumido em 6 horas de fermentação obtendo-se toxicidade semelhantes. Entretanto acima de 50 % OD elevava-se a velocidade de crescimento e reduzia-se a atividade das toxinas.

AVIGNONE-ROSSA *et al.*, 1992 reporta que concentrações elevadas de 50 % de OD deve continuamente ser suprida aos fermentadores para alcançar altas concentrações da delta-endotoxina, relatando também que taxas acima de 60 % OD inibem a produção da toxina.

Fica bastante evidente que o potencial tóxico do produto final é grandemente afetado pelas condições de cultura, a seleção do meio e da escolha da linhagem adequada. Assim para a produção em escala comercial deve-se observar não apenas o alto rendimento em esporos de *B. thuringiensis*, 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 fermentado (DULMAGE *et al.*, 1990; MORAES & CAPALBO, 1988; BEEGLE, 1991).

2.5. Aplicação de métodos de planejamento e otimização de experimentos

Geralmente, os processos fermentativos envolvem muitas variáveis. Quando o número destas é muito grande, torna-se praticamente inviável realizar todos os experimentos necessários para estudar a influência de todas as variáveis pelos métodos tradicionais. Entretanto, escolhendo um método de planejamento adequado é possível programar os experimentos para estudar um grande número de variáveis de maneira compacta, e então selecionar aquelas que realmente são importantes para estudos mais detalhados. É importante ressaltar, entretanto, que por mais sofisticadas que sejam as teorias matemáticas ou estatísticas envolvidas num método experimental, estas não podem substituir medidas experimentais precisas e exatas, exigem o bom senso e o conhecimento do problema.

BARROS NETO *et al.* (1995) comentam que a decisão de adotar um método de planejamento experimental para a realização de um estudo envolvendo muitas variáveis, possibilita o planejamento e execução de forma organizada de um número de ensaios reduzidos ao mínimo necessário. Permite ainda a verificação dos efeitos individuais e interação de todas as variáveis sobre a resposta, a definição das variáveis mais importantes para o processo, e a avaliação dos erros experimentais

Vários trabalhos reportam revisões sobre as diferentes estratégias na otimização de processos fermentativos, recomendando o uso de técnicas estatísticas para a simplificação da otimização,

devido ao grande número de variáveis a serem avaliadas, assim como as interações a serem consideradas na otimização destes processos (WINKLER, 1988; DAVIES 1993; KENNEDY *et al.*, 1994).

Números trabalhos utilizando técnicas de otimização para o estudo das condições da fermentação de diferentes processos, são constantemente publicados (MORESSI & SEBASTIANI, 1979; BOWMAN & GEIGER, 1984; SARRA *et al.*, 1993; WOSIACKI *et al.*, 1995).

Observando-se o uso das técnicas de planejamentos por fatoriais fracionarios na formulação de meios, os quais possibilitariam em poucos ensaios, a triagem de variáveis usando um número mínimo de ensaios (CHRISTEN & RAIMBAULT, 1991; MARTINEZ *et al.*, 1993; LIU & LIAO, 1994). Estas técnicas permitem a avaliação dos efeitos principais de até 7 parâmetros, em dois níveis, em apenas 8 ensaios (BOX *et al.*, 1978).

O método de planejamento experimental por análise de superfície de resposta tem como base o método de planejamento fatorial. Consiste num grupo de técnicas usadas para o estudo empírico das relações entre uma ou mais respostas medidas analiticamente (como rendimento, produtividade) e um número de variáveis de entrada que possam ser controladas (temperatura, concentração, pH, etc). Para realizar um estudo pelo método de análise de superfície de resposta, inicia-se programando os ensaios que devem ser feitos através de um planejamento fatorial, que consiste em selecionar um número fixo de variáveis de entrada e então executar experimentos com todas as possíveis combinações (COCHRAN & COX, 1957; BOX *et al.*, 1978; BARROS NETO *et al.*, 1995).

Como se deseja reduzir o número de ensaios ao mínimo possível, um planejamento fatorial com 2 níveis (nível -1 e nível +1) para cada variável é especialmente eficiente. Se "*n*" variáveis estão envolvidas no estudo de um determinado sistema, o número de experimentos que deverão ser realizados seria 2^n . Acrescentam-se ainda ensaios em triplicatas realizados nas condições correspondentes aos níveis intermediários para cada variável (nível zero ou ponto central de planejamento), com o objetivo de estimar o erro experimental associado aos ensaios. Com os dados obtidos após a execução dos ensaios, é possível calcular os efeitos simples e de interação das variáveis sobre as respostas e determinar quais são os efeitos mais significativos (BOX *et al.*, 1978, BARROS NETO *et al.*, 1995).

O uso de planejamentos centrais compostos têm a vantagem, em muitos casos, exigir menor número de tratamentos do que os fatoriais completos correspondentes. Assim, delineamentos com três níveis de BOX & BEHNKEN (1960) e os planejamentos de configuração estrela com 5 níveis (BOX & DRAPER, 1987), são também bastantes utilizados nos estudos de otimização de processos fermentativos WINKLER (1988).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O diagrama de fluxo (figura 1) apresenta as etapas envolvidas neste trabalho no desenvolvimento de bioinseticida bacteriano a partir do isolamento e seleção de nova linhagem de *Bacillus thuringiensis*.

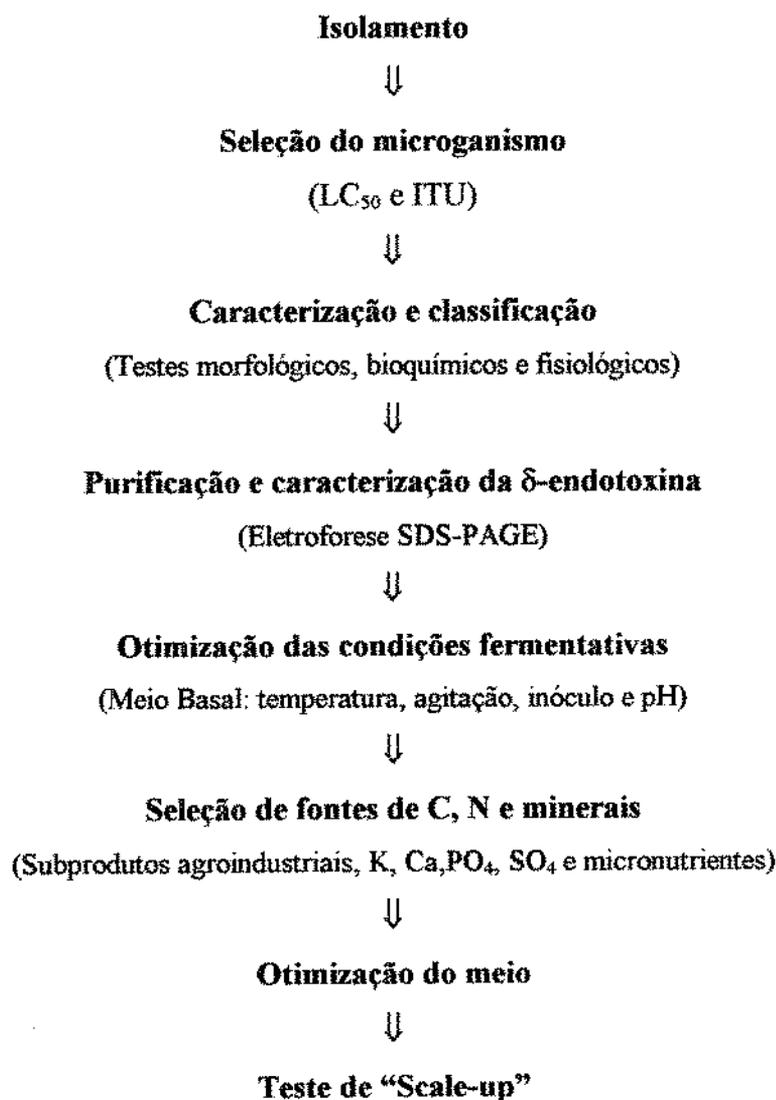


Figura 1. Diagrama de fluxo das etapas de desenvolvimento de bioinseticida bacteriano a partir de novos isolados.

3.1. Isolamento de microrganismos esporuladores

A primeira fase do trabalho visa a obtenção de um microrganismo esporulado e cristalogênico, com alta atividade larvívica contra *Aedes aegypti*. O material para o isolamento do microrganismo são amostras de solo coletadas nos territórios brasileiro e peruano.

3.1.1. Coleta de amostras

Foram coletadas amostras de solo de setenta e cinco diferentes localidades do sul e sudeste do Brasil assim como da região central do Perú. A principal área de coleta compreende o Estado de São Paulo, a região norte do Paraná, a região costeira de Santa Catarina e região central do Mato Grosso do Sul. A maioria das 41 amostras de solo brasileiro são provenientes de zonas geograficamente classificadas como regiões de floresta nativa sub-tropical; as 10 amostras do Mato Grosso do Sul são classificadas como provenientes de região de mata nativa típica do cerrado (EMBRAPA, 1994). Do território do Perú foram coletadas 24 amostras, a maioria provenientes de florestas de trópico úmido da vertente oriental dos Andes, zona onde se registrou um surto de dengue em 1993. As amostras abrangeram solos agrícolas de zonas urbanas; amostras de solo e barro de locais infestados de mosquitos foram preferidos.

A coleta de solo foi realizada segundo as recomendações do "Guia para o isolamento de bactérias esporuladas com potencial larvívica", do *Instituto Pasteur*. Foram coletadas de 10 a 20 g de material em sacos de plástico posteriormente os solos foram secados a temperatura ambiente, por 4 dias e armazenados até o isolamento (INSTITUTE PASTEUR, 1981).

3.1.2. Isolamento seletivo das bactérias

Os isolados foram obtidos segundo os procedimentos recomendados pelo INSTITUTE PASTEUR (1981), modificados mediante o uso de meio seletivo com acetato de sódio recomendado por TRAVERS (1987). Uma quantidade de 0,5 g de solo foi homogeneizado em 10 ml de caldo-L (triptona 10 g/l, extrato de levedura 5 g/l, NaCl 5 g/l) tamponado com acetato de sódio 0,25 M. Esta mistura foi agitada por 4 horas a 250 rpm e 30°C. Ao final deste tempo a amostra foi submetida

a tratamento térmico a 80°C por 15 min, e em seguida deixada no gelo por 5 minutos. Finalmente diversas diluições foram plaqueadas em ágar-L e incubadas a 37°C por 48 horas.

As colônias que cresceram foram selecionadas de acordo com sua forma, borda, elevação e textura, conforme recomendações para a classificação de colônias de *Bacillus* entomopatogênicos de PRIEST & YOSTEN (1991) e DIAS *et al.* (1994).

A purificação dos isolados foi obtida por esgotamento em estrias, em ágar nutriente a 30°C. A presença dos cristais (mesmo não distintamente reconhecidos) e características morfológicas dos isolados foram observadas a fresco por microscopia com contraste de fase e aumento de 1000 x para seleção dos isolados nesta fase.

Os isolados foram mantidos no freezer a -20°C, em tubos com caldo nutriente com glicerol 20%. Para ativação, foram riscados em placa com ágar triptona, e incubados *overnight* a 30°C verificando-se as colônias ao microscópio para observar a presença de esporos e cristais.

3.2. Seleção de bactérias entomopatogênas

Os procedimentos de seleção tiveram por objetivo selecionar um microrganismo com alto potencial larvicida, para o desenvolvimento das etapas seguintes de produção bioinseticida bacteriano.

- Criação dos mosquitos

Os ensaios biológicos para avaliação da entomopatogenicidade ou atividade larvicida dos isolados, foram realizados com larvas de *Aedes aegypti*, mantido em laboratório, fornecido pela Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo.

Os mosquitos no estágio adulto eram mantidos em gaiola telada (40x35x35 cm) contendo recipiente com solução aquosa de açúcar para a alimentação dos mosquitos machos. Foi também colocado na gaiola um funil com papel de filtro imerso em um recipiente de plástico com água, de forma a mantê-lo sempre úmido para deposição dos ovos. Os ovos eram transferidos para recipientes

de plástico de 10 x 20 cm com uma profundidade de 4 cm, contendo água potável filtrada. Os diferentes estádios de desenvolvimento larval eram mantidos em recipientes separados. Como as larvas de *Aedes* se desenvolvem preferencialmente em água limpa, esta foi renovada periodicamente (3 vezes por semana) a fim de evitar o desenvolvimento de microrganismos e protozoários indesejáveis. As larvas de mosquito eram alimentadas com ração de peixe e os mosquitos fêmeas hematófagos alimentavam-se com sangue de camundongo 3 vezes por semana ou de acordo com a quantidade de larva requerida. A criação dos mosquitos foi realizada segundo recomendações da American Mosquito Control Association - AMCA (1970).

3.2.1. Bioensaios

A atividade ou potencia da δ -endotoxina produzido pelo *B. thuringiensis* são quantificadas principalmente por sua atividade biológica, através de bioensaios. O bioensaio consiste em se expor um determinado inseto teste a um determinado patógeno e observar o efeito produzido em certo tempo em condições padronizadas. A avaliação dos resultados geralmente consiste em verificar o número de indivíduos afetados no bioensaio (geralmente o critério é morte), os dados são avaliados e expressos sob a forma de Concentração Letal CL_{50} para determinação da potência, sendo esta a concentração media letal que produz 50 % de mortalidade na população-alvo (HABIB, 1986). Estes parâmetros são calculados pelo método de próbits ou cálculo por regressão linear de probits das percentagens de mortalidade versus logaritmo das doses HADDAD (1986).

Para se atribuir certa potência a um produto é necessário compará-lo a um padrão; assim as comparações da atividade larvicida do complexo esporo-cristal de novos isolados são comparados com as preparações padrão. A ITU é expressa em ITU/mg e representa a atividade tóxica em Unidades Tóxicas Internacionais por mg de produto; essa potência em ITU foi calculada segundo a seguinte fórmula:

$$\text{Potência da amostra (ITU/mg)} = \frac{CL_{50} \text{ padrão} \times \text{Potência padrão}}{CL_{50} \text{ amostra}}$$

- Bioensaio preliminar de seleção

Para os bioensaios preliminares ou bioensaios seletivos, se usam menor número de insetos teste e suspensão concentrada de bactérias (sem diluição). Assim, os isolados selecionados segundo o item 3.1.2. foram testados quanto à sua atividade larvicida em *Aedes aegypti* segundo recomendações do INSTITUTE PASTEUR (1981). Os isolados foram cultivados em agar a 30°C por 7 dias, e foi retirada uma alçada que foi homogeneizada em 10 ml de água destilada. A seguir eram colocadas 10 larvas de 2° ou 3° estágio na suspensão de células. A contagem de larvas mortas e vivas era realizada após 24 horas; os isolados que causaram mais de 70% de mortalidade das larvas foram selecionados e repicados para testes posteriores.

3.2.1.1. Bioensaio para determinação do CL₅₀ e ITU

Os bioensaios para a determinação da atividade larvicida expressa em CL₅₀ (concentração letal para 50 % da população) e ITU (Unidades Tóxicas Internacionais) dos isolados selecionados, foram realizados a partir da biomassa microbiana obtida pelo processo fermentativo descrito em sub-ítem a seguir. A recuperação e secagem da biomassa contendo a toxina foi realizada pela co-precipitação com acetona e lactose, segundo metodologia proposta por DULMAGE *et al.* (1970); este material foi utilizado para o preparo das suspensões bacterianas, e a metodologia é descrita em outro sub-ítem (b) a seguir.

O padrão para produtos biológicos para controle de larvas aquáticas de dípteros é constituído por uma preparação à base da linhagem IPS-82 de *B. thuringiensis israelensis* sorotipo H-14, fornecida pelo *Instituto Pasteur*, cuja potência arbitrada é de 15.000 ITU/mg para larvas de *Aedes aegypti*. É utilizada para os cálculos de comparação da atividades larvicida, de novos isolados (PRIEST & YOUSTEN, 1991).

A CL₅₀ neste trabalho, foram expressas em mg/l e representa a concentração média letal do produto que provocou 50 % de mortalidade em larvas de *Aedes aegypti*. Os cálculos da CL₅₀ foram realizados através da análise de Probitos, utilizando-se o programa POLO PC, cedido pelo CENARGEN/EMBRAPA.

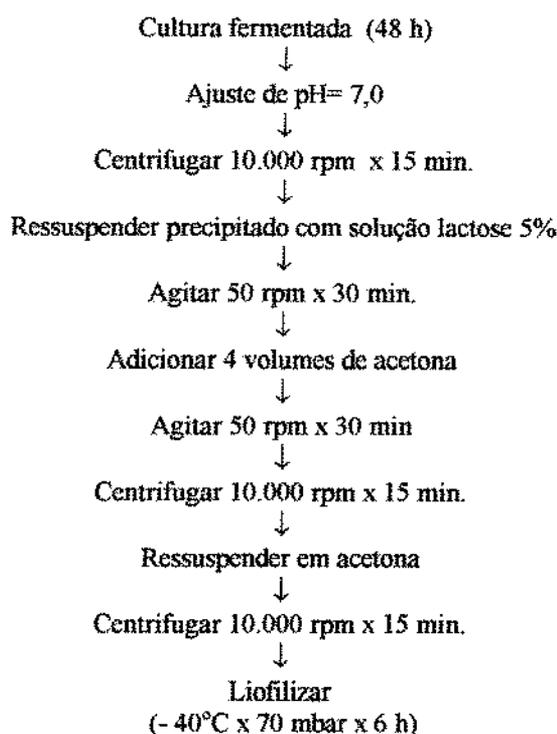
Os bioensaios foram realizados de acordo com o protocolo da WHO (1987). A determinação da CL_{50} foi realizada com larvas de *Aedes aegypti* de 3º estágio colocadas em frascos com água destilada e deionizada, com diferentes concentrações da suspensão bacteriana. Após 24 horas foi quantificada a mortalidade das larvas. Foram conduzidos três bioensaios para cada isolado, em períodos diferentes; cada bioensaio era preparado com diluições em duplicata da suspensão bacteriana, e mantidos controles.

a) Processo fermentativo

As condições do processo fermentativo para a multiplicação dos isolados, foram os recomendados pela literatura para a produção de bactérias entomopatogênicas (DULMAGE *et al.*, 1990; PRIEST & YOUSTEN, 1991; PORTUGAL *et al.* 1993). Os isolados foram produzidos em agitador rotativo a 30°C, 250 rpm e 48 horas (até lise total das células) em Meio Basal (MB) com a seguinte composição (g/l): K_2HPO_4 6,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,12; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,014; $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0,002; $FeSO_4$ 0,02; $CaCl_2 \cdot 4H_2O$ 0,183; peptona 7,5; glicose 1,0. O pH foi ajustado a 7,2 e a autoclavagem foi realizada a 121°C por 15 min. Foram utilizados 100 ml de meio em frascos erlemeyer de 500 ml.

b) Recuperação e secagem da biomassa microbiana

A recuperação e secagem do complexo esporo-cristal foi realizada segundo recomendações de DULMAGE *et al.* (1970) seguindo a sequência:



3.3. Caracterização do microrganismo

Para a caracterização, identificação e classificação dos isolados, foram utilizados testes morfológicos, bioquímicos e fisiológicos.

3.3.1. Testes morfológicos, bioquímicos e fisiológicos

As colônias bacilares foram caracterizadas de acordo com sua forma, borda, elevação e textura, conforme recomendações para a classificação de colônias de *Bacillus* entomopatogênicos; a caracterização morfológica dos isolados por microscopia, foi realizada segundo as mesmas recomendações (PRIEST & YOUSSTEEN, 1991; EMBRAPA, 1994).

As observações microscópicas dos cristais foram também realizadas após coloração, segundo técnica recomenda por CHILCOT & WIGLEY (1989), com algumas modificações; utilizou-se o Amido Black 10-B (Sigma) e Giemsa stain (Sigma) em substituição ao Naftaleno Black e Gurr's R66-Giemsa. As observações microscópicas foram realizadas em microscópio Baush & Lomb com aumento de 1000 vezes. Os testes bioquímicos para a caracterização do *Bacillus* cristalogênico

foram os recomendados por MARTIN *et al.*, 1985; BARJAC & FRANCHON, 1990 e PRIEST & YOUSSTEEN, 1991. As técnicas bioquímicas foram realizadas segundo GATTI *et al.*, 1992. A classificação taxonômica foi segundo BUCHANAN & GIBBONS, 1974 e BARJAC & FRANCHON, 1990.

As observações, meios de cultivo e os reagentes utilizados para a caracterização do isolado encontram-se sumarizados na Tabela 3 ou descritos no apêndice. As observações realizadas foram: morfologia das colônias, células, esporos e cristal; reação de Gram; testes de catalase, oxidativo/fermentativo e Voges-Proskauer; produção de ácido a partir de glicose, arabinose, celobiose, galactose, manose, sacarose, salicina, xilose e manitol; hidrólise de amido e tween; produção de lecitinase, urease, β -galactosidase e H_2S ; utilização de citrato, esculina e desaminação da fenilalanina.

Tabela 3. Testes realizados para a caracterização do isolado SP-36

Testes	Meio de cultura	Soluções / reagentes
morfológico esporos cristais reação de Gram catalase	ágar nutriente	verde malaquita e safranina amido black e Giemsa KOH a 3 % água oxigenada 3 %
produção de ácidos	meio de fermentação	glicose, arabinose, celobiose, galactose, manose, sacarose, salicina, xilose e manitol (concentração de açúcar final 0,5%)
oxidativo/fermentativo Voges Proskauer hidrólise de amido hidrólise de tween	meio O/F caldo de glicose ágar nutriente com amido 1 % meio tween-80	α -naftol 15% em etanol e NaOH 40% solução de iodo lugol
produção da lecitinase urease β -galactosidase produção de H_2S utilização do citrato utilização da esculina Fenilalanina	ágar nutriente com Lecitina ágar uréia de Christensen meio ONPG meio complexo 0,03 % de citrato de Fe meio citrato de simmons ágar esculina 0.1 % ágar fenilalanina	citrato férrico 0.05 % cloreto férrico 2 %.

3.3.2. Testes sorológicos

Os testes sorológicos do isolado foram realizados no CENARGEN/EMBRAPA através do teste de aglutinação com antisoros cedidos pelo *Instituto Pasteur* e de acordo com a as técnicas de

BARJAC, 1981. O isolado foi também enviado ao Instituto Pasteur (Paris, França) para caracterização do sorotipo.

3.3.3. Eletroforese (SDS-PAGE) do cristal

O cristal protéico do *B. Thuringiensis* purificado por partição em sistema de duas fases aquosas foi analisado por eletroforese em SDS-PAGE. Para a multiplicação do microorganismo foi utilizado o meio basal descrito em 3.2.1.1.

a) Isolamento e Purificação do cristal

O caldo fermentado (10ml) foi inicialmente submetido a um processo de isolamento e purificação do cristal por partição em sistema de duas fases aquosas (SDFA) de acordo a técnica desenvolvida por FRANCO *et al.* (1995), utilizando polietileno-glicol, sais de fosfato de sódio e potássio e água, na seguinte proporção (m/m): 15% de PEG-4000 e 15% de sais de fosfato, sendo o pH final 7,0. Na técnica de SDFA a interface entre as fases é enriquecida com os cristais.

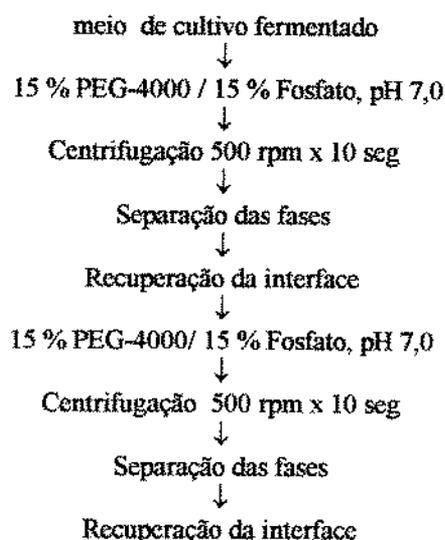


Figura 2. Fluxograma do processo de purificação e isolamento dos cristais protéicos de *B.thuringiensis* em Sistema de Duas Fases Aquosas.

b) Eletroforese (SDS-PAGE)

O perfil electroforético do corpo paraesporal do isolado foi determinado por eletroforese (SDS-PAGE), de acordo com LAEMMLI (1970), em um equipamento BIO-RAD® modelo 3000XI programável.

- Preparo das amostras

A interface do sistema SDEA (rica em cristais), foi resuspendida em tampão de lise (Tris-HCL 0,0625M, pH 6,8; SDS 2 % (p/v), 2- mercaptoetanol 5% e glicerol 10 %), na proporção 1:4; seguido de aquecimento a 98°C por 10 minutos. Após resfriamento da suspensão das células a temperatura ambiente, estas foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos. Os sobrenadantes foram armazenados a -20°C.

- Preparo dos géis

As soluções, reagentes e preparo do gel de separação SDS-PAGE 12 % e do gel de empacotamento SDS-PAGE 4 %, de 1,5 mm de espessura, estão indicados na Tabela 4, conforme recomendações do fabricante (BIO-RAD, 1990).

TABELA 4. Preparo dos géis SDS-PAGE

Solução estoque	gel de separação	gel de empacotamento
Acrilamida/bis (30%)	40,0 ml	1,3 ml
Água destilada	33,5 ml	6,1 ml
1,5 M tris-HCL, pH 8,8 (I)	25,0 ml	---
0,5 M-HCL, pH 6,8 (II)	---	2,5 ml
SDS 10% (p/v)	1,0 ml	100 ul
Persulfato de amônio 10%	500 ul	50 ul
TEMED	50 ul	10 ul

Volume calculado para o preparo de 2 géis de separação e 2 de empacotamento. Todas as soluções foram estocadas a 4°C, exceto o persulfato de amônio que deve ser recém preparado; o SDS foi mantida a temperatura ambiente.

Primeiramente foi preparado o gel de separação SDS-PAGE 12 % com a adição das soluções na sequência indicada na Tabela 4. As soluções de acrilamida, tampão I e água foram colocadas em *kitassato* e homogeneizadas sob vácuo com a finalidade de exaurir o oxigênio inibidor da polimerização. Posteriormente, foi acrescentado solução de SDS, o iniciador (persulfato de amônio) e o catalizador da reação (TEMED). Imediatamente foi transferida para as placas de vidro.

O gel de empacotamento “Stacking gel” foi preparado da mesma maneira descrita para o outro gel. A mistura líquida do gel foi despejada sobre o gel de separação e sobre esta uma barra de *teflon* com 15 canaletas para a formação de espaços vazios para subsequente aplicação das amostras. A polimerização foi feita à temperatura ambiente por 30 minutos.

Após a aplicação das amostras os géis foram transferidos para a cuba de eletroforese contendo solução tampão de corrida (25 mM Tris, 192 mM glicina, 1 % SDS, pH 8,3) recomendada pelo fabricante. A eletroforese foi realizada sob 60 V x 110 mA por 14 horas. Os padrões de proteínas de peso molecular conhecido foram adquiridos da Pharmacia, *Biotech LMW electroforesis calibration kit MW-SDS*, contendo fosforilase b (94 kD), albumina (67 kD), ovoalbumina (43 kD), anidrase carbônica (30 kD), inibidor de tripsina (20,1 kD) e lactoalbumina (14,4 kD).

A coloração das proteínas foi realizada segundo recomendações de ANDREWS (1988), utilizando-se uma solução de metanol: ácido acético: água (5:1:4) com Coomassie blue R-250 0,1 %. Para a descoloração utilizou-se a mesma solução sem o corante.

3.4. Otimização das condições da fermentação com meio sintético

O microrganismo isolado e selecionado segundo o item 3.1. e 3.2. foi submetido a estudos com o intuito de otimizar a sua multiplicação em condições que visam maximizar o crescimento, a esporulação e produção da toxina com meio sintético.

3.4.1 Processo fermentativo

Os estudos das condições de fermentação foram realizados em agitador rotativo em frascos erlenmeyer de 500 ml, com 100 ml de meio basal, segundo condições e procedimentos relatadas no item 3.2.1.1. A ativação da cepa do isolado, mantido na geladeira em tubo com glicerol, foi realizada riscando uma alçada em placa de ágar nutriente, incubado a 30°C por 24 horas; as colônias foram verificadas ao microscópio para observar a presença de esporos, cristais e possíveis contaminantes. O inóculo foi então preparado através de alçada da cultura em 100 ml

de Meio Triptona-MT (composição em g/l: triptona, 10; NaCl, 5,0; pH 7,0); o frasco foi mantido em agitador rotativo a 30°C e 250 rpm por 14 horas.

Na otimização das condições fermentativas foram consideradas as variáveis de processo como temperatura de incubação, agitação, inóculo e pH inicial, segundo as recomendações da literatura, para a produção de bactérias entomopatogênicas (VANDEKAR & DULMAGE, 1982; DULMAGE *et al*, 1990). As combinações e faixas das variáveis estudadas são apresentadas no delineamento experimental.

3.4.1.1. Avaliação das fermentações

O controle e avaliação das fermentações nos diversos ensaios realizados compreenderam:

a) Contagem do número de esporos (esp/ml): Após 24 horas de fermentação, foram determinados os esporos viáveis, considerados aqueles capazes de crescer em ágar nutriente após tratamento térmico (80°C por 15 min). Para contagem de número de células foram feitas diluições e plaqueamento em superfície em ágar nutriente, incubado a 30°C e a leitura após 18 horas após plaqueamento. Para efeito de análise estatística, os dados foram transformados em Log_{10} .

b) Grau de formação de cristal (GFC): O grau de formação do cristal foi avaliado através de contagens microscópicas a 24 horas de fermentação, atribuindo-se um valor conforme as características morfológicas e % das células em cada ensaio. As células eram contadas em três campos visualizados no microscópio. As observações microscópicas foram realizadas segundo item 3.3.1.

Tabela 5. Equivalência entre morfologia celular e grau de formação de cristal (GFC)

Morfologia celular		Valor
100	% células vegetativas	0
0 - 25	% células apresentando esporo/cristal	1
25 - 50	% ídem	2
50 - 75	% "	3
75 - 100	% "	4
90 - 100	% células lisadas	5

c) **Atividade da toxina** : Para a realização dos bioensaios a biomassa microbiana foi recuperada através da co-precipitação com acetona e lactose, de acordo com DULMAGE *et al.*, (1970) segundo diagrama no item 3.2.1.1. Os bioensaios foram realizados apenas para produtos obtidos em condições otimizadas. Os bioensaios foram realizados segundo o item 3.2.1.1, determinando-se a CL₅₀ e ITU.

3.4.2. Delineamento experimental e tratamento estatístico

O estudo dos efeitos e otimização das condições fermentativas, na produção do complexo esporo-cristal pelo isolado, foi realizado mediante a Metodologia de Superfícies de Resposta (MSR). Foi empregado um delineamento fatorial 3⁴ incompleto, com 4 variáveis em 3 níveis equidistantes (BOX & BEHNKEN, 1961). O planejamento foi constituído de 24 tratamentos e 3 repetições no ponto central para se medir a variabilidade dos experimentos (Tabela 6).

Os níveis do delineamento foram determinados com auxílio da literatura (DULMAGE *et al.*, 1990; PRIEST & YOUSSTEEN, 1991). Foi estabelecido um tempo máximo de 24 horas de fermentação, através de testes preliminares. Os fatores estudados, ou variáveis independentes, foram: temperatura (X₁): 23, 30, e 37 °C; agitação (X₂): 150, 250, e 350 rpm; concentração de inóculo (X₃): 1, 3 e 5 %; pH inicial (X₄): 6,2; 7,2 e 8,2. As respostas ou variáveis dependentes, foram: número de esporos Y₁ (esp/ml) e grau de formação do cristal (Y₂), à 24 horas do processo fermentativo.

Os níveis das variáveis foram codificadas em -1, 0, e +1, conforme a equação abaixo:

$$x_i = \frac{Xi - \bar{X}}{q}$$

onde:

x_i = número codificado

Xi = valor real dos níveis

\bar{X} = média dos níveis

q = diferença entre níveis sucessivos das variáveis.

O processamento dos dados foi realizado com o programa "Statistical Analysis System" no módulo RSreg (SAS, 1985). As respostas foram modeladas pela seguinte equação polinomial quadrática :

$$\hat{Y} = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=1}^k \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon$$

$(i < j)$

onde;

\hat{Y} = resposta ou variável dependente

X_i = variáveis independente

β_0 = coeficiente do efeito de ordem zero

β_j = coeficiente dos efeitos de primeira ordem

β_{ii} = coeficiente dos efeitos de segunda ordem

β_{ij} = coeficiente dos efeitos de interação

ε = resíduo que mede o erro experimental.

TABELA 6. Delimitação experimental 3^4 pela metodologia MSR dos ensaios de otimização das condições fermentativas, do isolado SP-36 fermentativas

Ensaio	variáveis codificadas				variáveis decodificadas			
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	°C	rpm	% inóculo	pH inicial
1	-1	-1	0	0	23	150	3	7,2
2	1	-1	0	0	37	150	3	7,2
3	-1	1	0	0	23	350	3	7,2
4	1	1	0	0	37	350	3	7,2
5	0	0	-1	-1	30	250	1	6,2
6	0	0	1	-1	30	250	5	6,2
7	0	0	-1	1	30	250	1	8,2
8	0	0	1	1	30	250	5	8,2
9	0	0	0	0	30	250	3	7,2
10	-1	0	0	-1	23	250	3	6,2
11	1	0	0	-1	37	250	3	6,2
12	-1	0	0	1	23	250	3	8,2
13	1	0	0	1	37	250	1	8,2
14	0	-1	-1	0	30	150	1	7,2
15	0	1	-1	0	30	350	5	7,2
16	0	-1	1	0	30	150	5	7,2
17	0	1	1	0	30	350	3	7,2
18	0	0	0	0	30	250	3	7,2
19	0	-1	0	-1	30	150	3	6,2
20	0	1	0	-1	30	350	3	6,2
21	0	-1	0	1	30	150	3	8,2
22	0	1	0	1	30	350	3	8,2
23	-1	0	-1	0	23	250	1	7,2
24	1	0	-1	0	37	250	1	7,2
25	-1	0	1	0	23	250	5	7,2
26	1	0	1	0	37	250	5	7,2
27	0	0	0	0	30	250	3	7,2

3.4.3. Localização das condições ótimas

A localização das condições ótimas pela metodologia MSR, representa uma solução de compromisso entre as respostas em estudo. Uma forma simples de se identificar tais condições seria através da sobreposição dos gráficos de superfície de resposta das respostas em estudo, permitindo a identificação da região de interesse, onde as máximas respostas seriam obtidas simultaneamente (BOX *et al.*, 1987; BARROS NETO *et al.*, 1995).

3.5. Seleção de fontes de carbono, nitrogênio e suplementação mineral

A seleção dos constituintes do meio de cultura foi realizada em três etapas. Na primeira, foram selecionadas as fontes de carbono e nitrogênio; na segunda, foram testados os efeitos de suplementos de minerais; e por último, foi realizado um ajuste preliminar da concentração dos componentes selecionados.

Como fontes de carbono e nitrogênio foram testados os seguintes subprodutos agro-industriais de composição complexa: melão de cana-de-açúcar, água de levedura, água de maceração de milho (milhocina) ou "corn-steep", hidrolizado líquido da produção de glutamato monossódico "Hidrolized Liquor" (HDL), farelo de soja, e as fontes de carbono glicerol e amido. Também foram testados os efeitos do $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, K_2HPO_4 , CaCl_2 e uma mistura de sais minerais.

3.5.1. Substratos testados e prétratamentos

Os materiais utilizados foram os seguintes, e foram sempre usados do mesmo lote para condução dos experimentos. Vários subprodutos e resíduos agroindustriais apresentam composição que permite sua utilização como fonte carbono nitrogênio e de nutrientes a baixo custo:

- Melão é utilizado principalmente como fonte de carbono. O melão foi proveniente da Usina Cruz Alta, Olímpia (SP). Os componentes de interesse que caracterizam o material utilizado são: sacarose 17-25%, glicose 30-40 % e frutose 4-9 %, açúcares redutores 10-25 % outros carboidratos 2-5 %, nitrogênio 0,8-2,0 % na forma de aminoácidos e proteínas. Também é fonte de diversos minerais como K, Ca, mg, Na e outros, o melão utilizado apresentou 84° bx com 7,12g/l de açúcares redutores totais.

O melão foi diluído 1:1 (m/m); a clarificação foi realizada pela adição de Na_2HPO_4 (1,5 g/l) seguido de autoclavagem por 30 min, repouso por uma noite para decantação e retirada do sobrenadante. O melão clarificado apresentou 42 °Brix e foi estocado em "freezer".

- A água de maceração de milho ou milhocina é utilizada principalmente como fonte de nitrogênio e de carbono. A milhocina foi proveniente das Refinações Milho, Brasil Ltda.,

Mogi Guaçu (SP). A milhocina é um produto obtido da maceração dos grãos de milho para a produção de amido, mediante refluxo de uma solução diluída de SO₂. Essa extração dissolve substâncias ricas em nitrogênio e sais minerais. A massa em maceração é filtrada e concentrada, até atingir aproximadamente 50% (p/v) em sólidos. A milhocina contém em sua composição química os principais aminoácidos, vitaminas e minerais como Ca, P, Mn, Fe, Mg, K, etc. A composição aproximada segundo a Refinações Milho, Brasil Ltda., é bastante variada assim a composição aproximada é: água 55 %, a sua composição em base seca é ácido láctico 10 %, proteína 22 %, óleo 1 %, cinzas 4,5 %, açúcares redutores 4 %, diversos solúveis 43 % e carboidratos 7%.

- A água de levedura utilizada principalmente como fonte de substâncias nitrogenadas tem algumas vantagens como matéria prima industrial uma vez que a levedura pode ser obtida a partir de fermento de panificação ou como subproduto das destilarias de etanol, da produção de cachaça e cervejarias. Este material foi preparado a partir de células de levedura *Saccharomyces cereviceae*, de fermento Fleischman, por razões práticas de limpeza e homogeneidade do produto. O procedimento foi segundo recomendações de DIAS *et al.* (1991). O preparo partiu de 100 g de fermento prensado comercial úmido, dissolvido em água potável e elevando-se o volume para 1 (um) litro. Autoclava-se a suspensão a 121°C por 30 min, deixa-se em repouso por uma noite para decantação e sifona-se o sobrenadante.

- O HDL ou Hidrolizado líquido da produção de glutamato monossódico foram provenientes do (2º licor mãe), da Ajinomoto Interamericana, de Limeira (SP) é utilizado principalmente como fonte nitrogênio, rico em ácido glutâmico e L-tirosina. Este subproduto tem uma composição aproximada de: sólidos totais de 39,47 %, sendo este composto principalmente de ácido glutâmico 9 %, nitrogênio total 10,83 % e K, Ca, Mg e 65,5 % de umidade.

- O farelo de soja testado como fonte de nitrogênio vegetal, foi obtido do Moinho da Lapa S.A. da divisão de rações balanceadas, Campinas (SP). Este foi peneirado com tamiz tyler de 200 mesh. A obtenção do sobrenadante foi segundo EJIOPFOR & OKAFOR (1989), assim pesou-se 100 gr do farelo moído e colocado em 1 litro de água, seguido de autoclavagem a 121°C por 15 min, e finalmente filtrado.

- O amido foi testado como fonte carbono, utilizando-se amido de milho, fornecido pela Refinações Milho do Brasil, Ltda. conhecido como Maizena.

- Glicerol, também foi testado como fonte de carbono alternativo, segundo recomendações de SMITH (1982), o glicerol usado foi proveniente da MERK.

3.5.2. Seleção das fontes de carbono e nitrogênio

Os procedimentos de seleção dos componentes e formulação de meios por fatoriais fracionários foram realizados de acordo com a metodologias relatadas por CRISTEN & RAIMBAULT (1991) e MARTINEZ *et al.* (1993).

- Procedimentos fermentativos

Os ensaios foram realizados em agitador rotativo (New Brunswick G-27), com erlenmeyers de 500 ml contendo 100 ml de meio, segundo condições otimizadas das variáveis descritas no item 3.4.: 30°C, agitação de 300 rpm, 5 % de inóculo e pH inicial de 7,2, com incubação de 24 horas. Foram utilizados os procedimentos e técnicas de controle e avaliação citados no item 3.4.1.

- Delineamento experimental

Nas duas primeiras etapas, de seleção das fontes de carbono e nitrogênio e de suplementação de minerais, foram utilizados planejamentos fracionários saturados 2^{7-4} , conforme Tabela 7. Os sinais (+) e (-) representam os dois níveis de concentração de cada fonte testada. Este delineamento é recomendado para triagem de variáveis, permitindo calcular os contrastes de 7 variáveis, em apenas 8 ensaios (BOX *et al.*, 1987).

As respostas avaliadas foram: número de esporos e grau de formação do cristal. Cada análise foi realizada em duplicata e as médias foram utilizadas para os calculos. A seleção foi realizada a partir dos contrastes ou efeitos, produzidos pelos substratos testados.

Tabela 7. Planejamento fatorial fracionário saturado 2⁷⁻⁴

Ensaio	V a r i á v e i s						
	A	B	C	D	E	F	G
1	-	-	-	+	+	+	-
2	+	-	-	-	-	+	+
3	-	+	-	-	+	-	+
4	+	+	-	+	-	-	-
5	-	-	+	+	-	-	+
6	+	-	+	-	+	-	-
7	-	+	+	-	-	+	-
8	+	+	+	+	+	+	+

Variáveis: fontes de C e N e suplementação mineral; (+) e (-) concentração das fontes

Os níveis dos substratos testados, foram determinados a partir de informações da literatura e através de ensaios prévios, para adequação das concentrações dos substratos para a aplicação do delineamento experimental.

Substratos (variáveis)	Concentração (%)	
	-	+
A) Farelo de soja.....	0,1	0,6
B) Água de levedura.....	0,1	0,5
C) Milhocina.....	0,1	0,5
D) HDL.....	0,2	0,8
E) Amido.....	0,2	0,8
F) Melão.....	0,1	0,5
G) Glicerol.....	0,2	0,8

Foram determinados os contrastes para cada parâmetro, calculados de acordo com a seguinte fórmula:

$$I_j = \frac{1}{4} \sum_{i=1}^8 A_{ij} \cdot Y_i$$

onde:

I_j = contraste dos componentes

A_j = níveis dos componentes (+/-)

Y_i = respostas

3.5.3. Seleção dos suplementos minerais

Na segunda etapa foi determinado o efeito de nutrientes minerais segundo recomendações da literatura (FODA *et al.*, 1985; NICKERSON & BULLA, 1984; SIKDAR, 1991), os minerais testados foram: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, K_2HPO_4 e sais minerais (FeSO_4 0,02; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,002 e $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,010 g/l). Também se procedeu ao ajuste da concentração das fontes de C e N selecionadas na etapa anterior. Foi utilizado o mesmo delineamento experimental (Tabela 7).

Os níveis dos substratos selecionados foram programados em função dos resultados da etapa anterior :

Componentes (variáveis)	Concentração	
	-	+
A) Melaço (%)	0,2	0,8
B) Água de levedura (%)	0,2	0,8
C) Milhocina (%)	0,2	0,6
D) K_2HPO_4 (g/l)	0,1	0,3
E) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/l).....	0,2	0,5
F) CaCl_2 (g/l)	0,2	0,8
G) Mistura de sais	ausência	presença

3.5.4. Ajuste preliminar das concentrações dos componentes dos meios

A terceira etapa que visou o ajuste preliminar da concentração de fontes de C e N e suplementação de minerais selecionados, utilizou o delineamento fatorial fracionário 2^{5-2} (Tabela 8).

Tabela 8. Planejamento fatorial fracionário 2⁵⁻²

VARIÁVEIS					
	A	B	C	D	E
Ensaio					
1	-	-	-	+	-
2	+	-	-	+	+
3	-	+	-	-	+
4	+	+	-	-	-
5	-	-	+	-	+
6	+	-	+	-	-
7	-	+	+	+	-
8	+	+	+	+	+

Variáveis: fontes de C e N, e suplementação mineral ; (+) e (-) concentração dos componentes testados

Os níveis programados em função dos resultados da etapa anterior:

Componentes (variáveis)	Concentração	
	-	+
A) Melaço (%).....	0,2	0,4
B) Milhocina (%).....	0,2	0,8
C) Água de levedura (%).....	0,5	1,0
D) K ₂ HPO ₄ (g/l)	0,2	0,6
E) Sais minerais.....	-	+

Em relação a concentração dos sais minerais o nível (-) equivale a concentrações relatadas no item anterior 3.5.3 e o nível (+) é igual a três vezes esta concentração.

3.6. Otimização do meio de cultura

Estes ensaios visam a otimização da concentração dos componentes do meio de cultura a partir dos componentes selecionados, no item 4.5. A otimização da concentração dos componentes selecionados foi planejada mediante a aplicação de delineamento composto central com cinco níveis de variação.

Os procedimentos e técnicas de controle e avaliação das fermentações foram os mesmos relatados no item 3.4.1. Foram realizados bioensaios para determinação da CL₅₀, segundo

EMBRAPA (1994); o método usado foi das diluições seriadas do cultivo final. A atividade expressa em CL_{50} da diluição do caldo de cultivo final, é aquela necessária para matar 50 % da população alvo.

3.6.1. Delineamento estatístico

Foi empregado um delineamento central composto rotacional da metodologia de superfície de resposta (MSR) com quatro variáveis em cinco níveis. O delineamento compreende um total de 29 ensaios; os ensaios de planejamento fatorial inicial 2^4 referem-se aos 16 experimentos iniciais e 3 no ponto central; os ensaios para o planejamento central composto “configuração estrela” foram realizados em 8 ensaios (2^n) e mais duplicata no ponto central (BOX *et al.*, 1987).

Os níveis do delineamento da Tabela 9 foram determinados pelos ensaios prévios do ajuste preliminar dos componentes selecionados no item 4.5., assim como pela literatura (SALAMA *et al.*, 1983; FODA *et al.*, 1985; DHARMISTHITI & PANTUWATANA, 1985; ARCAS & YANTORNO, 1987; FALOCCHI *et al.*, 1990; DULMAGE *et al.*, 1990).

Foi adotado um tempo máximo de 24 horas de fermentação. As respostas ou variáveis dependentes foram: número de esporos/ml (y_1) e grau de formação do cristal (y_2), a 24 horas do processo fermentativo.

Os fatores, ou variáveis independentes, foram: melaço de cana-de açúcar (X_1): 0,02 - 0,20 - 0,5 - 0,8 - 1,0 %; de milhocina (X_2): 0,16 - 0,40 - 0,80 - 1,20 - 1,44 %; água de levedura (X_3): 0,2 - 0,5 - 1,0 - 1,5 - 1,8 %; K_2HPO_4 (X_4): 0,18 - 0,30 - 0,50 - 0,70 - 0,82 %. O cálculo dos níveis dos ensaios e as análises estatísticas pela metodologia MSR foram realizados tal como no item 3.4.2.

Tabela 9. Níveis das variáveis do delineamento central composto

Compostos		Níveis (%)				
		-1,6	-1	0	+1	+1,6
Melaço	(X ₁)	0,02	0,20	0,50	0,80	1,00
Milhocina	(X ₂)	0,16	0,40	0,80	1,20	1,44
Levedura	(X ₃)	0,20	0,50	1,00	1,50	1,88
K ₂ HPO ₄	(X ₄)	0,18	0,30	0,50	0,70	0,82

A tabela seguinte (Tabela 10) do delineamento experimental apresenta as variáveis codificadas e as decodificadas que foram utilizadas na otimização das concentrações do meio de cultura para a produção do complexo esporo-cristal pelo microrganismo isolado.

TABELA 10. Delineamento experimental 5⁴ dos ensaios de timização da concentração dos componentes em (%) utilizados na otimização do meio de cultura.

Ensaio	variáveis codificadas				variáveis decodificadas (%)			
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	melaço (X ₁)	milhocina (X ₂)	levedura (X ₃)	K ₂ HPO ₄ (X ₄)
1	-1	-1	-1	-1	0,2	0,4	0,5	0,3
2	+1	-1	-1	-1	0,8	0,4	0,5	0,3
3	-1	+1	-1	-1	0,2	1,2	0,5	0,3
4	+1	+1	-1	-1	0,8	1,2	0,5	0,3
5	-1	-1	+1	-1	0,2	0,4	1,5	0,3
6	+1	-1	+1	-1	0,8	0,4	1,5	0,3
7	-1	+1	+1	-1	0,2	1,2	1,5	0,3
8	+1	+1	+1	-1	0,8	1,2	1,5	0,3
9	-1	-1	-1	+1	0,2	0,4	0,5	0,7
10	+1	-1	-1	+1	0,8	0,4	0,5	0,7
11	-1	+1	-1	+1	0,2	1,2	0,5	0,7
12	+1	+1	-1	+1	0,8	1,2	0,5	0,7
13	-1	-1	+1	+1	0,2	0,4	1,5	0,7
14	+1	-1	+1	+1	0,8	0,4	1,5	0,7
15	-1	+1	+1	+1	0,2	1,2	1,5	0,7
16	+1	+1	+1	+1	0,8	1,2	1,5	0,7
17	0	0	0	0	0,5	0,8	1,5	0,5
18	0	0	0	0	0,5	0,8	1,5	0,5
19	0	0	0	0	0,5	0,8	1,5	0,5
20	-1,6	0	0	0	0,02	0,8	1,5	0,5
21	+1,6	0	0	0	1,5	0,8	1,5	0,5
22	0	-1,6	0	0	0,5	0,16	1,5	0,5
23	0	+1,6	0	0	0,5	1,44	1,5	0,5
24	0	0	-1,6	0	0,5	0,8	0,2	0,5
25	0	0	+1,6	0	0,5	0,8	1,8	0,5
26	0	0	0	-1,6	0,5	0,8	1,5	0,18
27	0	0	0	+1,6	0,5	0,8	1,5	0,82
28	0	0	0	0	0,5	0,8	1,5	0,5
29	0	0	0	0	0,5	0,8	1,5	0,5

3.6.2. Localização das condições ótimas

A localização das concentrações ótimas, foi realizada segundo item 3.4.3.

3.7. Testes em Fermentador Piloto (“Scale-up”)

Os testes de scale-up em fermentador piloto consistiram de dois ensaios para observação do comportamento da fermentação, pelo isolado *B. thuringiensis* SP-36, em duas condições de aeração,

na produção do complexo esporo-cristal. Os testes foram: a) fermentação com controle de oxigênio dissolvido em 50 % e b) fermentação com controle de oxigênio dissolvido em 30 %. Estes níveis de oxigênio dissolvido são relatados na literatura, adequados para a produção da δ -endotoxina para *B. thuringiensis israelensis* segundo AVIGNONE-ROSSA, *et al.* (1992).

3.7.1. Características do Fermentador

Os testes de "Scale-up" foram realizados em fermentador New Brunswick *MICROS*[®] de 30 litros de capacidade, equipado com sistema de controle "Multiloop ML-4100" para pH, oxigênio dissolvido (OD), temperatura, agitação, alimentação e esterilização. Todas as partes em contato com o meio de cultura são de aço inoxidável 316L.

- Tanque: 28 cm de diâmetro x 53 cm de altura.
- Esterilização: sistema de esterilização a vapor "*in situ*"; inclui o tanque, válvulas de recuperação e de coleta de amostras.
- Temperatura: termômetro de resistência de platina com sistema controlador PID com faixa de operação de 5 a $80 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ e 121°C durante a esterilização.
- Agitação: o sistema de agitação é constituído de um eixo com 3 turbinas de 6 pás cada um e quatro deflectores (ou chicanas) junto à parede. Os agitadores são acionados por um motor de 11/2 HP. Agitação de 50 a 1000 rpm ± 2 rpm.
- Aeração: fluxo de 0 a 50 vvm através de orifícios. A medida da concentração do oxigênio dissolvido no fermentador é realizada através de sensor tipo polarográfico, *Ingold*.
- Controle de pH: o sensor é um eletrodo de pH *Ingold*, esterilizável.

3.7.2. Procedimentos fermentativos

Os testes de scale-up foram conduzidos nas condições otimizadas em agitador rotativo, ou seja, 30°C, 5% de inóculo, pH inicial de $7,2 \pm 1$ e meio de cultura formulado com melaço 3,5 g/l; milhocina 7,0 g/l; água de levedura 16 g/l; e K_2HPO_4 6,0 g/l, conforme itens 4.4.3 e 4.6.3.

- Preparo do inóculo

A partir de inóculo obtido conforme o item 3.4.1., foi preparado 750 ml de inóculo para o fermentador, utilizando o mesmo meio de cultura formulado. O processo foi realizado em frasco erlenmeyer de 2000 ml, esse frasco era com tampa perfurada para passagem de tubos de aeração, respiro e coleta de amostra; o frasco, juntamente com o meio, foi esterilizado a 121°C por 20 min. Esse frasco era com tampa perfurada para passagem de tubos de aeração, respiro e coleta de amostras. Após resfriamento foi semeado com 5% (v/v) de caldo fermentado obtido conforme item 3.4.. A aeração do meio foi realizada mediante fluxo de ar comprimido estéril. A fermentação foi de aproximadamente 14 horas (final da fase exponencial). Este processo foi realizado a temperatura ambiente e foi avaliado mediante as técnicas citadas no item 3.4.1.1. As contagens de células obtidas, foram, em média de $3,0 \times 10^6$ ufc/ml.

- Esterilização

O volume de 14,250 l de meio de cultura foi colocado no tanque de fermentação, cujo aquecimento foi por circulação de vapor através de camisa, até 121°C. Essa temperatura foi mantida por 30 minutos com agitação contínua de 150 rpm, sendo posteriormente resfriado pela circulação de água fria através da camisa do tanque, até atingir a temperatura de $30^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$.

A inoculação do fermentador contendo o meio de cultura estéril foi realizada asseticamente transferindo os 750 ml do mosto (5,0 % v/v) com 14 horas de fermentação, completando-se assim os 15 litros de volume de trabalho.

- Técnicas de avaliação

O controle analítico foi realizado segundo as técnicas citadas no item 3.4.1.1. O melaço e água de levedura foram obtidos segundo item 3.5.1.

Durante a fermentação foram monitorados o comportamento de pH e oxigênio dissolvido, mediante amplificadores “in-line” e determinada a concentração celular. As amostras para determinação do crescimento celular foram retiradas em intervalos de uma hora, e realizadas através de medições da absorbância em espectrofotômetro em comprimento de onda de 650 nm, usando-se o meio de cultura como branco. Foi determinada a velocidade específica de crescimento (μ) pelo método de *Monot*, no qual as velocidades específicas são calculadas ajustando uma relação linear do tempo e crescimento, na fase logarítmica de crescimento, pelo método dos mínimos quadrados. Efetuaram-se também observações microscópicas da morfologia das células.

Foram determinados os açúcares totais iniciais e finais do processo; estas análises foram realizadas com o método fenol-sulfúrico de WHISTLER (1962). Ao final da fermentação foi determinado o número dos esporos (esp/ml) e o grau de formação do cristal.

3.7.3. Testes de avaliação dos efeitos do oxigênio dissolvido

O fermentador foi usado com um volume útil de 15 litros, dos quais 750 ml (5% v/v) eram de inóculo. As fermentações foram realizadas à temperatura de $30 \pm 0,1^\circ\text{C}$. O pH não foi controlado durante o processo.

a) fermentação com 50 % de oxigênio dissolvido : Este processo foi realizado nas seguintes condições, 30°C , agitação de 210 rpm e aeração inicial de 7,5 l/min, sendo monitorados o pH e % OD durante a fermentação. As contagens celulares iniciais foram de $2,00 \times 10^5$ ufc/ml e o pH inicial foi de 7,13.

b) fermentação com 30 % de oxigênio dissolvido: as condições foram de 30°C , pH sem controle, agitação a 211 rpm e aeração inicial de 6 l/min, com sistema de controle do oxigênio dissolvido constante em 30 % de OD, sendo monitorados automaticamente o pH e % OD. As contagens celulares iniciais foram $1,55 \times 10^5$ ufc/ml e o pH inicial foi de 7,31.

4. RESULTADOS & DISCUSÃO

4.1. Isolamento de *Bacillus* esporuladores

Os *Bacillus* entomopatogênicos foram isolados a partir de solos de diferentes regiões e ecossistemas brasileiros e peruanos. Foram coletados 51 amostras de solo do território brasileiro (regiões de florestas sub-tropicais e cerrado) e 24 do território peruano (regiões de florestas de trópico úmido).

As 75 amostras de solo (item 3.1.1.) foram submetidas a uma pre-seleção dos bacilos esporuladores, mediante o uso de meio seletivo contendo alta concentração de acetato e tratamento térmico a 80°C por 20 min, segundo as recomendações de TRAVERS *et al.* (1987). Esta técnica é recomendada pelos ótimos resultados no isolamento de *Bacillus thuringiensis* a partir de amostras de solo.

Através desta metodologia foram obtidas várias centenas de colônias isoladas dos diferentes solos. Destas, através de seleção de colônias de *Bacillus* (item 3.1.2) foram selecionados cerca de 40 isolados. Estas colônias foram submetidas a seleção com bioensaios preliminares (item 3.2.), obtendo-se oito isolados. Destes oito isolados, seis deles perderam sua capacidade de formar cristal e portanto sua capacidade larvicida, sendo que esta perda ocorreu na etapa de armazenamento. Os isolados foram mantidos em tubos com ágar nutriente, em condições de refrigeração. Este fenômeno também foi observado por KAJI (1993). Esta perda da capacidade de formar cristais provavelmente ocorreu devido à perda de plasmídeos que codificam a produção destas toxinas, neste período (GONZALES *et al.*, 1982).

Os dois isolados restantes, denominados como SP-36 e PR-38 que se apresentaram altamente tóxicos às larvas de *Aedes aegypti*, foram coletados de florestas sub-tropicais, na região de São José de Rio Preto - Estado de São Paulo e região de Londrina - Estado do Paraná, respectivamente.

Nas amostras de solo peruano, não foram encontrados *bacillus* cristalíferos, estes dados confirmam que solos de florestas tropicais úmidas não são ricos em *Bacillus thuringiensis* MARTIN & TRAVERS (1989).

Ainda foi observada a presença de inúmeras colônias com características similares aos do *Bacillus sphaericus* (*B.s*) com colônias circulares, convexas, borda lisa, superfície lisa, úmida, opaca amarelada, as quais ao serem observadas ao microscópio apresentavam células com esporos esféricos e esporângio entumescido. Estes resultados também foram encontrados no trabalho desenvolvido por LOPES *et al.* (1993).

Estas colônias, com características de *B.s.* foram submetidas a bioensaios contra larvas de *Aedes aegypti*, não mostrando atividade larvicida. Mas, tendo em conta que o *B.s.* não apresenta atividade contra esta espécie de mosquito, estes isolados foram preservados com o intuito de serem testados posteriormente contra larvas de *Culex*.

4.2. Seleção de bacilos entomopatogênicos

Com a finalidade de selecionar um isolado que apresentasse a maior potência larvicida, e ainda poder comparar com a linhagem padrão para controle de vetores, os dois isolados selecionados foram multiplicados em meio de cultura e recuperados segundo metodologia de DULMAGE *et al.* (1970), citados no item 3.2.1.1.

Os resultados dos bioensaios estão apresentados na Tabela 11, onde pode-se observar as excelentes atividades apresentadas por ambos isolados, em comparação à preparação fornecida pelo *Instituto Pasteur* da linhagem de referência de *Bacillus thuringiensis var. israelensis* IPS-82. O isolado SP-36 apresentou a mais alta atividade 30.767 ITU/mg, mais de duas vezes mais alta que a preparação da linhagem padrão IPS-82 com 15.000 ITU/mg; o isolado PR-38, apresentou 20.043 ITU/mg. Assim, foi selecionado o isolado denominado SP-36.

Outro fato importante de ressaltar é aquele referente à estabilidade apresentada pelo isolado selecionado (SP-36), pois em mais de um ano de estocagem e de sucessivas repicagens, não apresentou perda da atividade larvicida.

Tabela 11. Atividade larvicida com *Aedes aegypti* (CL₅₀ e ITU)

Linhagem	CL ₅₀	ITU/mg
	(mg/l)	
IPS-82	7,22 (5,13 - 10,15)	15.000 ¹
SP-36	3,52 (1,23 - 4,81)	30.767
PR-38	4,50 (4,02 - 5,03)	20.043

¹ ITU padrão da linhagem IPS-82 (Institute Pasteur)

4. 3. Caracterização do isolado SP-36

Os resultados dos testes morfológicos, bioquímicos e fisiológicos obtidos para a linhagem selecionada neste estudo estão indicados na Tabela 12.

4.3.1. Caráterísticas morfológicas

As colônias de *Bacillus* podem apresentar aspecto e tamanho bastante variado, principalmente em função de fatores ambientais, nutrientes, assim como quantidade de colônias presentes na placa. Os isolados selecionados não apresentaram grandes diferenças na morfologia das colônias em relação às colônias de *B.t.i.* Os isolados apresentaram colônias de 3 a 5mm de diâmetro, forma circular e elevada, borda ondulada, superfície granulosa, opaca, branca e de consistência úmida ver na figura 3.

Ao microscópio as células se apresentaram isoladas, em pares ou em cadeias relativamente longas (ver figura 4). Os dois isolados (SP-36 e PR-38) apresentaram forma de bastonete, com esporos e inclusão cristalina.

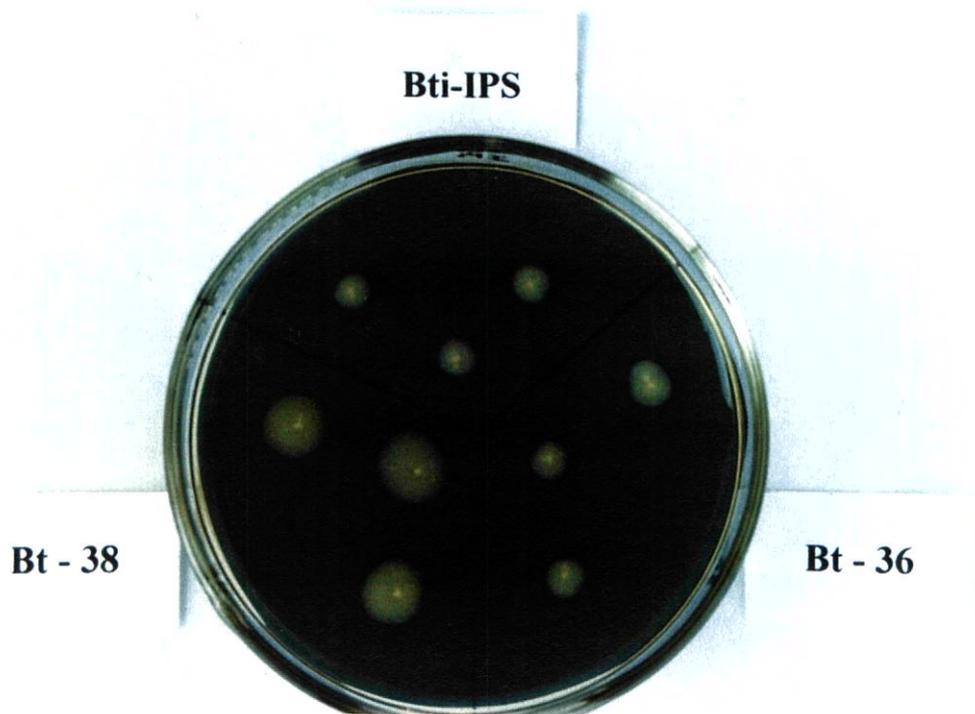


Figura 3. Morfologia das colônias dos isolados e do *B. thuringiensis israelensis*

Entre os métodos tradicionais de taxonomia, o tamanho do esporângio, morfologia e localização dos esporos são bastante significativos na classificação dos bacilos. As características dos isolados, como esporo elipsóide de posição sub-terminal, assim como a presença de cristais que apresentavam forma arredondada e irregular, são bastante semelhantes às características do *B. thuringiensis* var. *israelensis* (PRIEST & YOUSTEN, 1991).

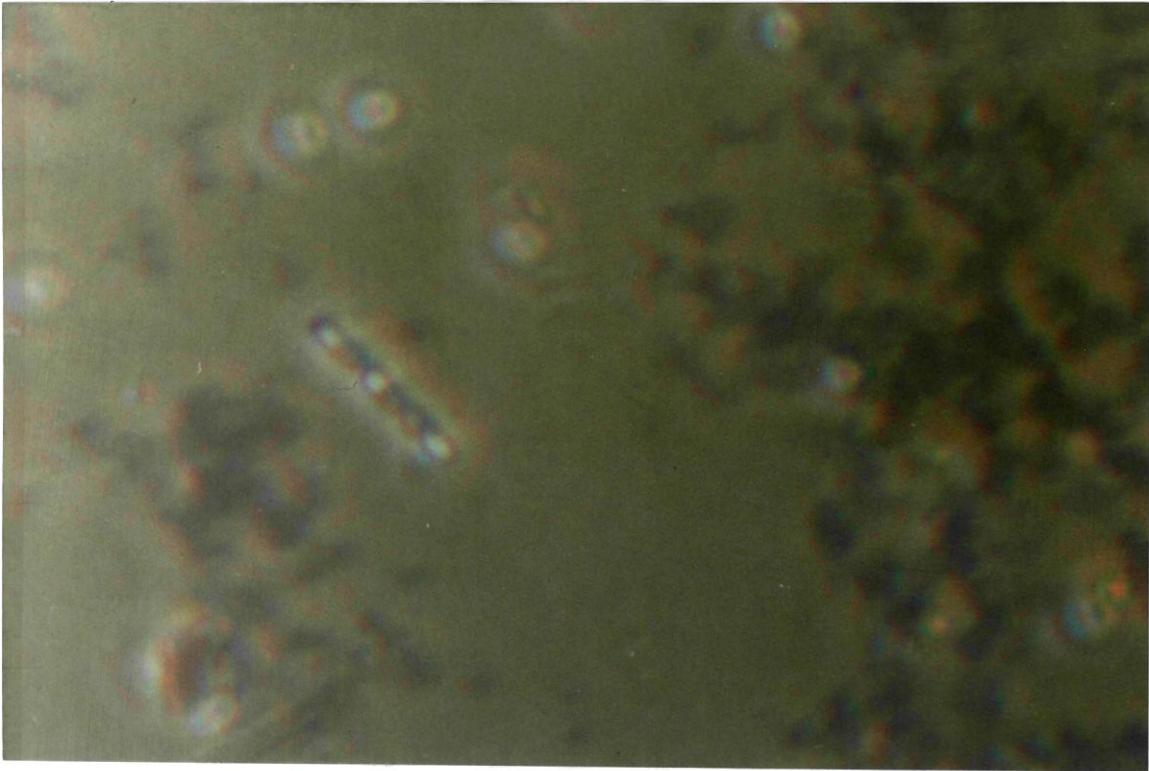


Figura 4: Micrografias com contraste de Fase (1000 x) de cultura do isolado SP-36 com 24 h, apresentando células com esporos e cristal

4.3.2. Características bioquímicas e fisiológicas

Os testes bioquímicos e fisiológicos, em geral, apontam grande similaridade entre o *Bacillus thuringiensis* e o *B. cereus*. Estas espécies apresentam reações similares como hidrólise do amido, utilização do citrato, reação de oxidase; fermentação de açúcares como celobiose e glicose, e não possuem urease, além de outras similaridades.

Há uma grande controvérsia no que diz respeito à classificação e diferenciação entre estes, sendo que inclusive técnicas mais sofisticadas de taxonomia, como homologia de DNA e zimogramas, ainda não esclareceram estas controvérsias (ZAHNER *et al.*, 1989). Alguns pesquisadores consideram o *Bacillus thuringiensis* como linhagens de *B. cereus*, que adquiriram a capacidade de formar cristais, através de plasmídeos transmissíveis, segundo trabalho reportado por GONZALES *et al.* em 1982.

Para a classificação do isolado foram utilizados os testes recomendados por BUCHANAN & GIBONS (1974), MARTIN *et al.*, 1985; BARJAC & FRANCHON (1990) e PRIEST & YOUSTEN (1991).

BARJAC & FRANCHON (1990) em sua revisão sobre a classificação das cepas de *B. thuringiensis* recomenda alguns testes bioquímicos como uma tentativa de diferenciação entre as diferentes subespécies *B.t.*, salientando as limitações destas técnicas nessa diferenciação. As características para diferenciar do *B.t.* é uso de tween, teste da manose negativo, e sacarose e salicina com probabilidade de 10 - 49 % positivo (+/-), urease negativo e lecitinase positivo.

Na Tabela 12 pode-se notar a grande similaridade entre o isolado SP-36 e *B.t.i.*, podendo-se observar algumas diferenças em relação ao uso do tween e citrato ambas utilizadas pelo *B.t.i.*, e não pelo isolado, assim como uso da manose por este e não pelo *B.t.i.* Desta forma nota-se a dificuldade na identificação da subespécie. Dentre os *B.t.* foi escolhido o *B. t. israelensis* para comparação por apresentar mais similaridades com o isolado SP-36.

De acordo com os resultados observados na Tabela 12, o isolado foi taxonomicamente classificado como sendo um *Bacillus thuringiensis*, pela presença de cristal incluso de cor amarelada nas células observadas ao microscópio com contraste de fase (figura 4). Deste modo o microrganismo isolado passa a ser referido como *Bacillus thuringiensis* SP-36.

Tabela 12 - Características fenotípicas do isolado SP-36

características	<i>B. thuringiensis israelensis</i> ¹	<i>B. thuringiensis</i> SP-36
tamanho da colônia	3-5 mm	3 -5 mm
aspecto da colônia	circular, elevada, borda ondulada superfície granulosa, úmida, opaca e branca	circular, elevada, borda ondulada, superfície granulosa, úmida, opaca e branca.
coloração Gram	+	+
forma do esporo	elipsóide	elipsóide
esporângio entumescido	-	-
presença de cristal	+	+
anaeróbio facultativo	+	+
catalase	+	+
Oxidativo/ fermentativo	+	+
Voges Proskauer	+	+
Produção de ácido:		
celobiose	+	+
manose	-	+
galactose	+	+
glicose	+	+
celobiose	+	+
salicina	+/-	+
sacarose	+/-	+
arabinose	-	-
xilose	-	-
manitol	-	-
hidrólise de :	+	+
amido		
Tween	+	-
utilização de:		
citrato	+	-
esculina	-	-
produção de :		
lecitinase	+	+
urease	-	-
H ₂ S	-	-

¹ Fonte: Martin *et al.*, 1985; Barjac & Franchon (1990); Priest & Yousten (1991)

4.3.3. Caracterização da subespécie do *B. thuringiensis* SP-36

O isolado SP-36 foi enviado ao *Instituto Pasteur* para identificação da sub-espécie mediante reação com antissoros dos flagelos produzidos pelas diferentes sub-espécies de *B.*

thuringiensis conhecidas. O resultado notificado pelo Instituto foi que a linhagem não mostrou reação de aglutinação para nenhum antisoro testado. Segundo LECADET (1995), este resultado é atribuído ao fato da bactéria não produzir flagelos necessários para a realização dos testes de sorotipagem. Desta forma, esta linhagem é denominada como uma cepa auto-aglutinante de *Bacillus thuringiensis*.

Pesquisadores da *FIOCRUZ* vêm estudando estes tipos de *Bacillus*, reportando a ocorrência de cepas auto-aglutinantes de *Bacillus thuringiensis* e recomendam posteriores estudos como a análise do perfil protéico dos cristais e das isoenzimas dos microrganismos (ZAHNER *et al.*, 1994). Também já foram reportadas pelo *INSTITUTO PASTEUR* cepas autoaglutinantes com propriedades mosquitocidas (DELÉCLUSE, 1995)

4.3.4. Perfil electroforético das proteínas dos cristais por SDS-PAGE

Os cristais produzidos pelo SP-36, foram purificados por sistema de duas fases aquosas, composto de 15% de polietileno-glicol (PEG-4000) + 15% de fosfato de sódio e potássio (pH 7,0). Com este método se obteve a separação de cristais e esporos; foi observado que após uma breve centrifugação de 15 segundos a 500 rpm, os esporos de *B. thuringiensis* se distribuíram preferencialmente na fase superior do sistema (rica em PEG) e que a parte inferior da interface era enriquecida com cristais agregados (figura 5). Esta técnica foi especialmente adaptada para a purificação dos cristais de *B. thuringiensis*. O grau de enriquecimento em cristais desta interface foi confirmado mediante observações microscópicas dos cristais corados. Desta forma, esta técnica nos permitiu a obtenção de material rico em cristais e com aceitável pureza para as análises eletroforéticas. Esta técnica foi especialmente adaptada para a purificação dos cristais de *B. thuringiensis* com propriedades mosquitocidas (FRANCO *et al.*, 1995).



Figura 5. Sistemas compostos por 15% de PEG 4000 e 15% de sais de fosfato das duas etapas de purificação dos cristais por SDFC

-Eletroforese SDS-PAGE

O sistema de eletroforese com dodecil sulfato de sódio (SDS) permite a separação e caracterização do número e tamanho das cadeias polipeptídicas das proteínas. As proteínas são desnaturadas por aquecimento em presença de 2-mercaptoetanol e SDS. O mercaptoetanol rompe as ligações de dissulfeto (S-S) e os polímeros adquirem a carga negativa do SDS. Assim, sua separação nos poros do gel ocorre exclusivamente em função de seus respectivos tamanhos moleculares. Marcadores de pesos moleculares (proteínas de peso molecular conhecido) podem ser usados na determinação do peso de moléculas protéicas desconhecidas (ANDREWS, 1988).

A Figura 6 mostra o perfil dos polipeptídeos dos cristais solubilizados do isolado SP-36, sendo possível observar claramente a presença de polipeptídeos correspondentes a pesos moleculares de 110, 68, 38 e 25 kDa. Bandas difusas na região de 38 a 25 kDa podem ser observadas.

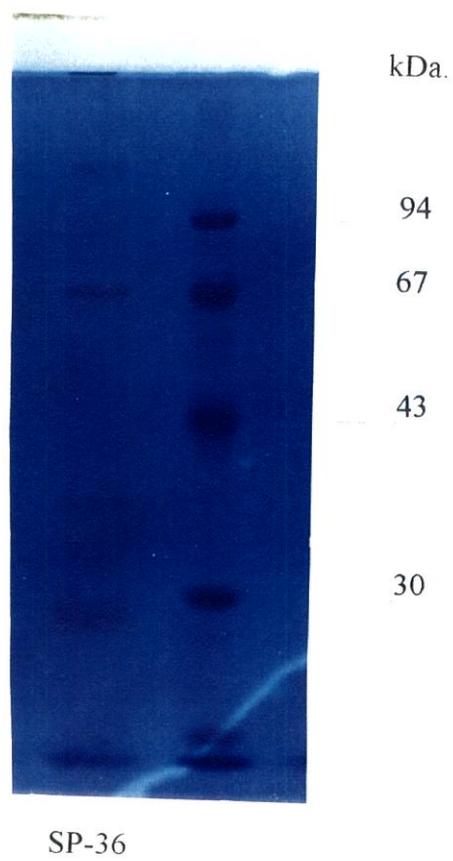


Figura 6. Perfil electroforético SDS-PAGE das proteínas do cristal do isolado B. t. SP-36

O perfil electroforético das proteínas que compõem os cristais do isolado SP-36, com atividade contra larvas de *Aedes aegypti*, apresentam significativas diferenças com os polipeptídeos do cristal de *Bacillus thuringiensis var israelensis*: 135, 125, 68 e 28 kDa (HURLEY *et al.*, 1987).

Assim as proteínas do corpo paraesporal do isolado SP-36 apresentaram duas características distintas em relação ao *B.t.i.*: a) somente uma banda (110 kDa) na região de alto peso molecular distintas daquelas do *B.t.i.*; b) uma banda de 38 kDa., também distinta daquela do *B.t.i.*. As bandas de peso molecular de 68 e 25 kDa apresentam-se similares às produzidas pelo *B.t.i.* ambas identificadas por suas propriedades mosquitocidas, sendo que esta última corresponderia ao peso molecular das citolisinas citadas por FEDERICCI *et al.*, 1990.

A literatura relata diferentes linhagens e sorotipos de *B.t.* com propriedades mosquitocidas, as quais foram classificadas de acordo com sua atividade larvicida e composição dos polipeptídeos do cristais. Assim, tem-se um grupo de *B.t.* que produz cristais compostos de proteínas de 135, 125, 68 e 28 kDa, similares aos do *B. t. israelensis*; o grupo que apresenta cristais com diferentes polipeptídeos como a subespécie *medellin*, com polipeptídeos de 100 a 30 kDa; *jegathesan* com proteínas de 77 a 23 kDa; e por último o grupo que possui baixa atividade, a subespécie *kyushuensis* com proteínas de 140 a 25 kDa e *kukuokaensis* que apresenta cristais com polipeptídeos de 90 a 27 kDa. Sendo que todos estes isolados apresentam a toxina citolítica com peso molecular de 25 a 30 kDa (DELÉCLUSE *et al.*, 1995).

O perfil eletroforético mostra que, tal como no *B.t.i.*, é notada a presença da proteína com conhecida propriedade mosquitocida de 68 kDa, e a citolítica de 25 kDa. No entanto o perfil diferenciado na composição do cristal, permite afirmar que o isolado produz cristal de composição diferente ao produzido pela linhagem padrão *B. t. israelensis* contribuindo desta forma na procura de novas toxinas com propriedades mosquitocidas, alternativas aos dos produtos a base do *B.t.i.*

Os dados da literatura com relação ao número e tamanho dos polipeptídeos que compõem os cristais de *B. thuringiensis israelensis*, tem mostrado significativas diferenças, assim, reportam-se pesos moleculares em kDa entre 98 a 145 para a primeira proteína, de 93 a 125 para

a segunda e de 65 a 72 para a terceira e de 23 a 30 para a citolisina (FEDERICCI *et al.*, 1990). Estas variações dentro de uma mesma sub-espécie, pode ser decorrente das condições de tratamento empregadas para a solubilização dos cristais a serem aplicados no gel de electroforese BULLA *et al.* (1980).

Observando-se que na maioria dos trabalhos publicados são usados condições alcalinas de solubilização do cristal, acima de 9,5 condições que segundo PFANNENSFIEL (1984) citado por FEDERICCI *et al.* (1990), atuariam as proteases alcalinas associados à produção do cristal. Desta maneira é importante ressaltar a dificuldade observada ao revisar os trabalhos publicados, em relação à comparação com nossos resultados.

4.4. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO

Neste capítulo, são apresentados os resultados e discussão sobre a otimização das condições de fermentação para produção da delta-endotoxina pelo isolado *Bacillus thuringiensis* SP-36.

Considerando que existe vasta literatura sobre as condições fermentativas mais favoráveis, estes experimentos tiveram por objetivo estudar com mais amplitude e verificar possíveis interações de alguns fatores sobre o isolado *B.t.* SP-36. Para isto utilizou-se da Metodologia de Superfícies de Resposta (MSR), para modelar os efeitos das condições de fermentação submersa em meio sintético em agitador rotativo (ver item 3.2.1.1) visando máxima produção de esporos e cristal protéico.

4.4.1. Análise geral dos resultados do planejamento experimental

Os resultados mais importantes das respostas obtidas nos 27 ensaios do planejamento experimental (Tabela 6 do item 3.4.2.), juntamente com as condições experimentais nas quais foram realizados, são apresentados na Tabela 13.

Estes resultados da média contagens de esporos (esp/ml) e do grau de formação de cristal, assim como o pH final do meio fermentado, foram obtidos a 24 horas de fermentação; esse tempo

foi estipulado através de ensaios prévios, como suficiente para a produção do complexo esporo-cristal pelo isolado nas condições do ponto central do delineamento de 30°C, 250 rpm, 3 % de inóculo e 7,2 de pH inicial, citadas como as adequadas para diversas subespécies de *B.t.* e *B.t.i.* em numerosos trabalhos (VANDEKAR & DULMAGE, 1982; DULMAGE *et al.*, 1990; PRIEST & YOSTEN, 1991; ABDEL-HAMEED, 1991).

Tabela 13. Condições experimentais e resultados¹ obtidos de acordo com o planejamento experimental 3⁴ da metodologia de superfície de resposta

Ensaio	condições experimentais				resultados ¹		
	temp. (°C) (X ₁)	agitação (rpm) (X ₂)	inóculo (%) (X ₃)	pH _{inicial} (X ₄)	nº esporos (esp/ml) (y ₁)	grau formação cristal (y ₂)	pH final
1	23	150	3	7,2	1,62 x 10 ⁵	1	7,91
2	37	150	3	7,2	1,02 x 10 ⁷	4	7,65
3	23	350	3	7,2	3,52 x 10 ⁶	1	8,08
4	37	350	3	7,2	1,55 x 10 ⁸	5	7,30
5	30	250	1	6,2	9,95 x 10 ⁶	2	7,11
6	30	250	5	6,2	1,82 x 10 ⁶	4	7,2
7	30	250	1	8,2	1,90 x 10 ⁶	2	8,14
8	30	250	5	8,2	1,05 x 10 ⁷	4	8,47
9	30	250	3	7,2	1,68 x 10 ⁷	5	7,77
10	23	250	3	6,2	9,48 x 10 ⁵	1	7,01
11	37	250	3	6,2	1,76 x 10 ⁶	4	7,31
12	23	250	3	8,2	1,07 x 10 ⁶	2	7,92
13	37	250	3	8,2	8,28 x 10 ⁶	5	8,38
14	30	150	1	7,2	6,73 x 10 ⁵	2	7,20
15	30	350	1	7,2	1,59 x 10 ⁷	4	7,81
16	30	150	5	7,2	5,79 x 10 ⁶	4	7,38
17	30	350	5	7,2	6,74 x 10 ⁸	5	7,92
18	30	250	3	7,2	1,64 x 10 ⁷	4	7,25
19	30	150	3	6,2	7,75 x 10 ⁵	3	7,43
20	30	350	3	6,2	8,32 x 10 ⁹	4	7,10
21	30	150	3	8,2	1,37 x 10 ⁶	3	7,17
22	30	350	3	8,2	1,68 x 10 ⁷	4	7,95
23	23	250	1	7,2	3,80 x 10 ⁵	2	7,56
24	37	250	1	7,2	7,02 x 10 ⁶	5	8,06
25	23	250	5	7,2	4,98 x 10 ⁶	3	-
26	37	250	5	7,2	3,14 x 10 ⁷	5	7,87
27	30	250	3	7,2	1,21 x 10 ⁸	5	7,30

¹ Resultados obtidos da média de duplicatas das leituras a 24 h de fermentação

Y₁ = número de esporos /ml

Y₂ = grau de formação de cristal

- Contagem de esporos

A determinação de parâmetros a 24 h de fermentação permite avaliar a ação de fatores sobre a aceleração do processo fermentativo; a 48h geralmente há uma equalização das respostas. Os melhores resultados foram obtidos no ensaio 17 (Tabela 13): 30°C, 350 rpm, 5 % de inóculo e pH inicial de 7,2, com contagem de $6,74 \times 10^8$ esporos/ml. Ou seja, o melhor resultado foi obtido com agitação e inóculos máximos.

Por outro lado, o resultado mais baixo de $1,65 \times 10^5$, foi obtido no ensaio 1, com as condições de 23°C, 150 rpm, 3 % de inóculo e pH inicial de 7,2. Observando-se que baixas temperaturas e aeração, consideradas adversas para o cultivo dos *Bacillus*, inibem estes processos (BEEGLE, 1991).

- Grau de formação do cristal

Sendo este parâmetro de grande interesse e significado, as condições que levem a um grau de lise acima de 90 % (grau 5) em menor tempo, seriam os mais indicados para otimizar o processo.

- pH final

Os resultados do pH a 24 horas, se encontram na faixa de 7,0 a 8,5 comuns para o cultivo por fermentação submersa de diversas subespecies de *Bacillus thuringiensis* e do *B. t. israelensis* tal como indicam (MORAES, 1981; SMITH, 1984; EJIOFOR & OKAFOR, 1989). Observa-se a tendência geral é o pH apresentar elevação quando o pH inicial é levemente ácido ou neutro; quando o pH inicial é alcalino a tendência é de manutenção com pouca variabilidade.

4.4.2. Análise pela metodologia de superfícies de resposta (MSR)

Na Tabela 14 são apresentados os modelos empíricos de 2ª ordem, obtidos pela metodologia MSR, assim como as significâncias dos parâmetros que tiveram efeitos estatisticamente significativos. Não se apresentam os modelos de 1ª ordem por não se ajustarem aos dados.

A variancia explicada ou coeficiente de determinação R^2 é definida como a porção da variação da resposta que é atribuída ao modelo ao invés do erro, assim para a resposta Y_1 (esp/ml) é 0,9032, e significa que o modelo desenvolvido para a contagem de esporos explica 90,32% da variância da resposta. Para o grau de formação do cristal (Y_2) foi de 0,8635, mostrando que houve um razoável ajustamento dos dados experimentais aos modelos matemáticos.

TABELA 14. Coeficientes de regressão e suas significâncias¹ dos modelos obtidos para as condições fermentativas da produção de complexo esporo- cristal por isolado *B.t. SP-36*

variáveis independentes	esp/ml (y ₁)		grau de formação cristal (y ₂)	
	coeficientes	significância ¹	coeficientes	significância ¹
Linear				
b ₀	7,8429		4,5000	
b ₁ (°C)	0,5688	0,0007	1,4583	0,0000
b ₂ (rpm)	0,6719	0,0001	0,6250	0,0159
b ₃ (%)	0,4314	0,0052	0,8330	0,0028
b ₄ (pH)	0,1935	0,1201	0,833	0,7149
Quadrática				
b ₁₁	-0,6943	0,0020	-1,0208	0,0100
b ₂₂	-0,3371	0,0783	-0,5208	n.s
b ₃₃	-0,4378	0,0290	-0,4583	n.s
b ₄₄	-0,9400	0,0001	-0,5833	n.s
Interação				
b ₁₂	-0,0391	n.s	0	
b ₁₃	-0,1564	n.s	0,2500	n.s
b ₁₄	0,1545	n.s	-0,1250	n.s
b ₂₃	0,1734	0,0783	-0,2500	n.s
b ₂₄	0,0142	n.s	-0,1250	n.s
b ₃₄	0,1200	n.s	0	
R ²	0,9032		0,8635	
CV	5,9249		23,020	
Falta de ajuste	0,8440		0,3042	

¹ Nível de significância ($P < 0,05$)

R² Coeficiente de determinação ou variancia explicada pelo modelo.

CV Coeficiente de Variação determina a precisão dos experimentos.

Falta de ajuste ou "lack of fit", determina o ajuste dos dados ao modelo.

Assim, a variância explicada pelos modelos obtidos são considerados razoáveis em processos de fermentação em função da variabilidade e complexidade destes processos, lembrando que para o grau de formação do cristal foram atribuídos valores empíricos (Tabela 5).

Verifica-se também, que o Coeficiente de Variação (CV) da resposta y_1 é 5,9249; por outro lado, para a resposta y_2 se apresenta alto, de 23,02. O coeficiente de variação (CV), dá uma idéia da precisão do experimento, e em ensaios biológicos, podem ser considerados baixos, quando inferiores a 10 %, médios quando de 10 a 20 % e altos de 20 a 30% (PIMENTEL, 1987).

O Coeficiente de Variação (CV), sofre a influência das dificuldades de padronização do inóculo, meios, e outros parâmetros que são de difícil controle, tais como as variabilidades fisiológicas do próprio microrganismo, variações nas matérias primas dos meios, assim como as imprecisões das técnicas analíticas.

A falta de ajuste ou "lack of fit" não é significativa, permitindo afirmar que os dados se ajustaram satisfatoriamente aos modelos matemáticos obtidos. Assim sendo, estes modelos podem ser usados para prever valores aproximados das respostas nos processos estudados, e obter gráficos através de simulações dos dados dentro das regiões experimentais, e estabelecer tendências aproximadas para processos da produção da delta-endotoxina com a linhagem de *Bacillus thuringiensis* SP-36, por fermentação submersa em meio sintético.

Na Tabela 14 observa-se as significâncias dos termos dos modelos, sendo estas expressas em termos de probabilidades ($p < 0.05$), significa que há uma probabilidade inferior a 5 % de que o valor F calculado ou observado tenha ocorrido ao acaso, é dizer que há 95 % de probabilidades de o evento ser significativo.

a) Efeito das condições da fermentação na contagem de esporos :

A contagem dos esporos em processos fermentativos para a produção de bioinseticidas a partir de *B.t.*, é uma medida indireta do crescimento dos microrganismos e da produção do cristal, sendo que estes bacilos ao esporular produzem concomitantemente a inclusão protéica com propriedades inseticidas (BULLA *et al.*, 1988; BENOIT *et al.*, 1989).

Portanto, altas contagens de células esporuladas levaria a uma maior produção da δ -endotoxina. Uma alta produção de esporos vai depender em grande parte das condições em que o processo fermentativo se desenvolve.

A Análise de Variância (ANOVA) do modelo de regressão preditivo, elaborado a partir dos resultados experimentais (Tabela 13) para a resposta de contagem de esporos/ml (Y1), é apresentada na Tabela 15, onde se verifica que o modelo se ajusta aos dados experimentais com uma significância de 0,0005; os termos lineares apresentaram uma significância de 0,0001, contribuindo efetivamente para o modelo, seguido dos quadráticos com 0,0010 de significância.

Tabela 15. Análise de variância para a resposta esporo/ml

Causa da variação	Grau de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	R ²	F Calculado	Prob < F
Linear	4	11,4560	2,8640	0,5754	17,835	0,0001
Quadrático	4	6,1854	1,5463	0,3107	9,6301	0,0010
interação	6	0,3415	0,0569	0,0172	0,3552	0,8938
MODELO	14	17,9830	1,2845	0,9032	7,9992	0,0005
Falta de ajuste	10	1,3290	0,1329		0,4445	0,8440
Erro puro	2	0,5980	0,2990			
Resíduo	12	1,9270	0,1605			

Nível de significancia nivel ($P < 0.05$)

Os coeficientes e significâncias das variáveis que afetam as respostas são encontradas na Tabela 14, onde observa-se claramente as variáveis que mostraram efeitos significativos no processo. Assim a temperatura (X_1) com uma significância de 0,0007, agitação (X_2) com uma significância de 0,0001, são as que mais afetaram esta resposta, seguidas pela % de inóculo (X_3) com 0,0052. Observando-se que a temperatura (X_1) e pH inicial (X_4) afetariam a resposta, por terem os termos de 2ª ordem altamente significativo de 0,0020 e 0,0001 respectivamente. Notando-se também que os coeficientes quadráticos apresentam sinais negativos. A interação b_{23} (agitação e % de inóculo) apresenta uma significância de 0,0783, é dizer esta interação que se torna significativa a um nível de significância de 7 %.

Como não existe falta de ajuste e a regressão é significativa, pode-se afirmar que dados se ajustaram ao modelo em questão, permitindo estabelecer um modelo matemático que representa as tendências aproximadas da produção de esporos/ml pelo isolado de *Bacillus thuringiensis* SP-36 num processo fermentativo dentro das condições experimentais estudadas:

$$\hat{y}_1 = 7,084 + 0,5688x_1 + 0,6719x_2 + 0,4314x_3 + 0,1935x_4 - 0,6943x_1^2 - 0,3371x_2^2 - 0,4378x_3^2 - 0,9400x_4^2 - 0,0391x_1x_2 - 0,1564x_1x_3 + 0,1545x_1x_4 + 0,1734x_2x_3 - 0,0142x_2x_4 + 0,1200x_3x_4$$

(Equação 1)

Onde:

\hat{y}_1 = log do número de esporos

x_1 = temperatura;

x_2 = agitação;

x_3 = % de inóculo;

x_4 = pH inicial

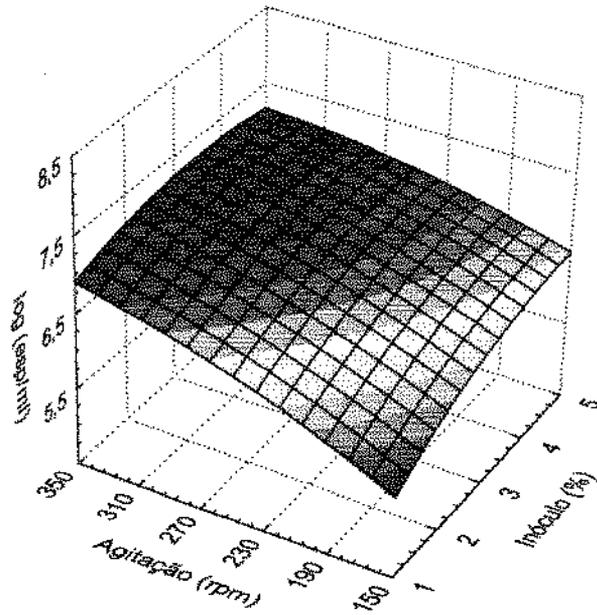
Através dos coeficientes da Equação 1, verifica-se que as variáveis que afetaram o processo foram a agitação (X_2), seguido da temperatura (X_1) e finalmente a % de inóculo inicial (X_3). Observando-se que os termos quadráticos apresentam sinais negativos, sendo que pH inicial e temperatura afetariam a resposta, por terem estes termos de 2ª ordem significativos a nível de 95 %.

Como o modelo para a função y_1 se presta para fins preditivos, foram feitas simulações dos dados dentro da região experimental, obtendo-se dessa maneira as superfícies de respostas que representam o comportamento das respostas estudadas.

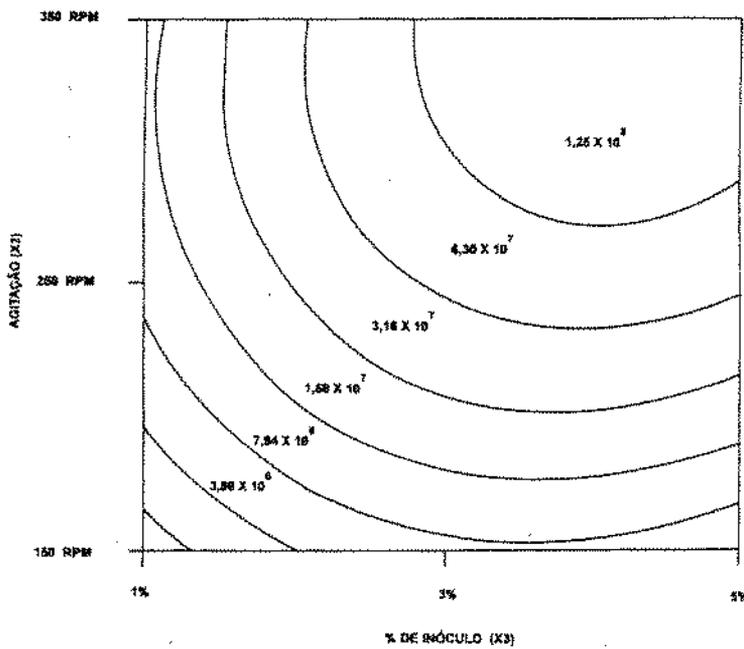
Na Figura 7, são apresentados os efeitos da agitação X_2 e % de inóculo X_3 na esporulação do isolado SP-36. A superfície de resposta foi obtida fixando-se a temperatura e pH em seus níveis intermediários (30°C e 7,2).

Nesta Figura, se observa a influência da variável (X_2) agitação e da % inóculo (X_3) na multiplicação das células do isolado SP-36, em cultivo submerso. Assim é possível afirmar que com altas taxas de aeração e/ou agitação (300 a 350 rpm) e altas concentrações de inóculo (3 a 5 %), obtem-se contagem de células ou esporos mais elevadas, apresentando o comportamento típico de uma bactéria aeróbica como o caso deste *Bacillus* (BULLA *et al.*, 1980; MORAES *et al.*, 1980).

Efeitos da Agitação e inóculo



(a)



(b)

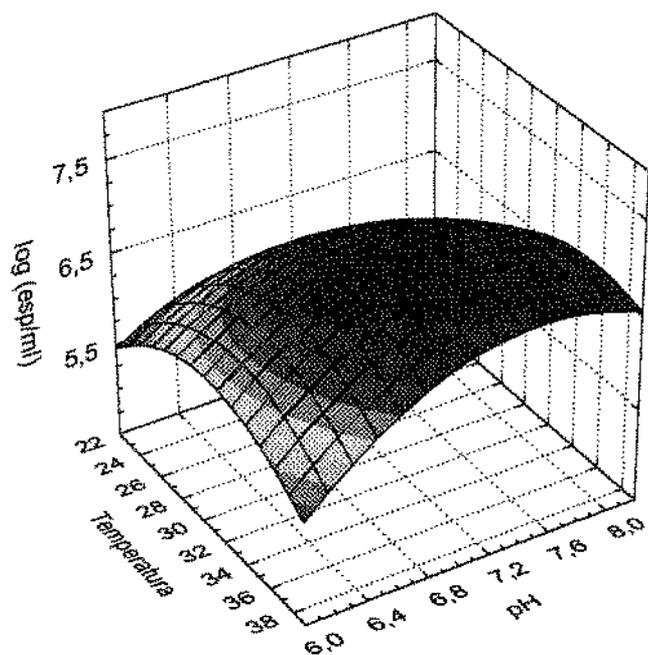
FIGURA 7. Superfície de resposta (a) e linhas de contorno (b) para a função \hat{y}_1 , contagem de esporos (esp/ml), variando os níveis de agitação (x_2) e % de inóculo (x_3), fixando a temperatura em 30°C e pH inicial a 7,2.

Em relação ao nível de inóculo há alguma controvérsia, já que alguns autores afirmam que baixos inóculos da ordem de 0.1 % levaram a maiores rendimentos (VANDEKAR & DULMAGE, 1982). No entanto estes resultados são de processos longos. Em nosso trabalho, visando a otimização em função da produtividade, altas concentrações de inóculo levaram a uma aceleração do processo de esporulação e formação do cristal; isto é claramente visualizado na Tabela 13, em resultados do grau de formação do cristal, onde observa-se que os ensaios com alta % de inóculo permitem chegar mais rapidamente ao estágio de lise das células, possivelmente, por rápido crescimento e esgotamento dos nutrientes do meio de cultura.

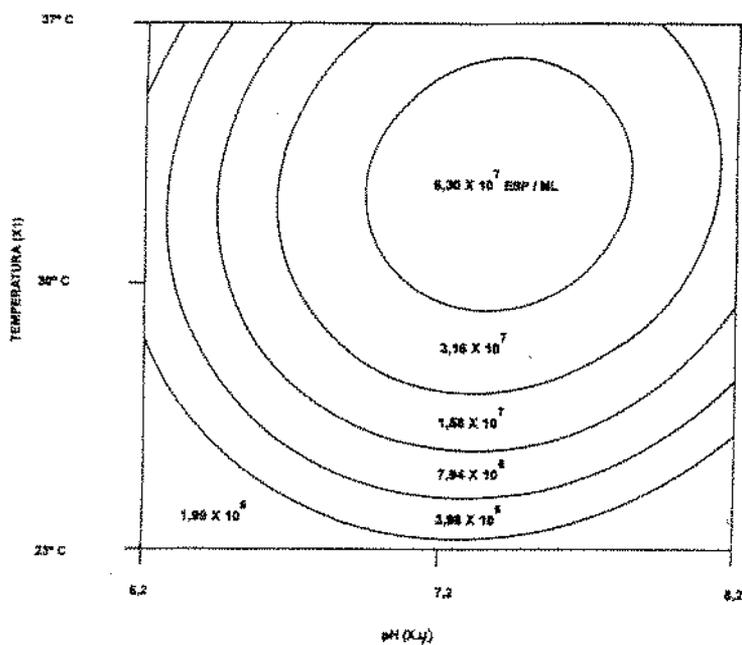
A Figura 8 representa a superfície de resposta da contagem de esporos em função da temperatura e pH, fixando-se a agitação e a % de inóculo nos seus níveis intermediários, ou seja, 250 rpm e 3 % de inóculo. Observa-se que o microrganismo comporta-se como uma bactéria mesófila, com máxima esporulação de 30 a 35°C. Estes dados estão de acordo, com os da literatura que apontam que a esporulação é acelerada à temperatura de 32 a 35°C para *Bacillus* esporuladores (BULLA *et al.*, 1980).

Em cultivos submersos de *B.t.k.*, ALVES (1994) também reporta encontrar três vezes mais esporos à temperatura de 33°C que 30°C. Assim também, em revisão sobre produção de *B.t.*, BEEGLE (1991) recomenda usar temperaturas de 32 a 35°C após a fase Log, para acelerar o processo de fermentação.

Quanto ao pH este não afeta significativamente esta resposta, mas pode-se notar, que os melhores resultados, são obtidos a pH ligeiramente alcalinos.



(a)



(b)

Figura 8: Superfície de resposta (a) e linhas de contorno (b) para a função \hat{y}_1 contagem de esporos (esp/ml), variando a temperatura (x_1) e pH inicial (x_4), e fixando a agitação em 250 rpm e inóculo em 3%.

b) Efeitos das condições de fermentação no grau de formação do cristal

Na Tabela 14, verifica-se que o modelo de 2ª ordem obtido para esta resposta, obtido a partir dos resultados da tabela 13, apresenta uma variância explicada ou coeficiente de determinação R^2 de 0,8635, a falta de ajuste não foi significativa, indicando ajuste dos dados ao modelo.

Entretanto o coeficiente de variação (CV) apresenta-se alto 23,81, indicando que a equação pode ser empregada para prever as tendências da resposta, nas condições experimentais em estudo.

Observando-se também, que as variáveis que afetaram significativamente ($p < 0.05$) esta resposta foram: a temperatura (X_1), com uma significância de 0,000, seguido pelo % de inóculo X_2 (0,0028) e a agitação X_3 (0,0159).

A Análise de Variância (ANOVA) da resposta (Y_2) grau de formação de cristal, é apresentada na Tabela 16, mostrando que o modelo obtido é estatisticamente significativo ao nível de 1% (0,0028), sendo que os termos lineares são os que mais aportam ao modelo com uma significância de 0,0001, seguido pelo termos quadráticos 0,0960. O desvio da regressão, resíduo, assim como a interação não são significativos ao nível de 5 % .

Tabela 16 : Análise de variância para a resposta grau de formação de cristal (Y_2)

Causa da variação	Grau de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	R^2	F Calculado	Prob <F
Linear	4	38,6250	9,6562	0,7370	16,210	0,0001
Quadrático	4	6,0110	1,5027	0,1147	2,521	0,0960
Interação	6	0,6250	0,1041	0,0119	1,049	0,9786
MODELO	14	45,2615	3,2330	0,8636	5,420	0,0028
Falta de ajuste	10	6,6458	0,6645		2,658	0,3042
Erro puro	2	0,5000	0,2500			
Resíduo	12	7,1458	0,5954			

Nível de significância ($p < 0.05$)

O modelo matemático encontrado foi:

$$\hat{y}_2 = 4,50 + 1,45x_1 + 0,62x_2 - 0,83x_3 + 0,08x_4 - 1,02x_1^2 - 0,52x_2^2 - 0,45x_3^2 - 0,58x_4^2 + 0,25x_1x_3 - 0,12x_1x_4 - 0,25x_2x_3 - 0,12x_2x_4$$

(Equação 2)

\hat{y}_2 = Grau de formação de cristal (GFC)

x_1 = temperatura

x_2 = inóculo

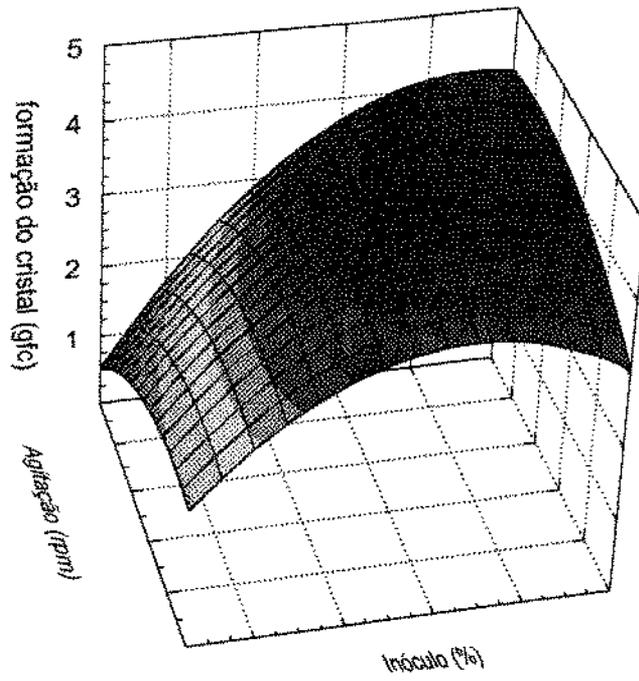
x_3 = agitação

x_4 = pH inicial

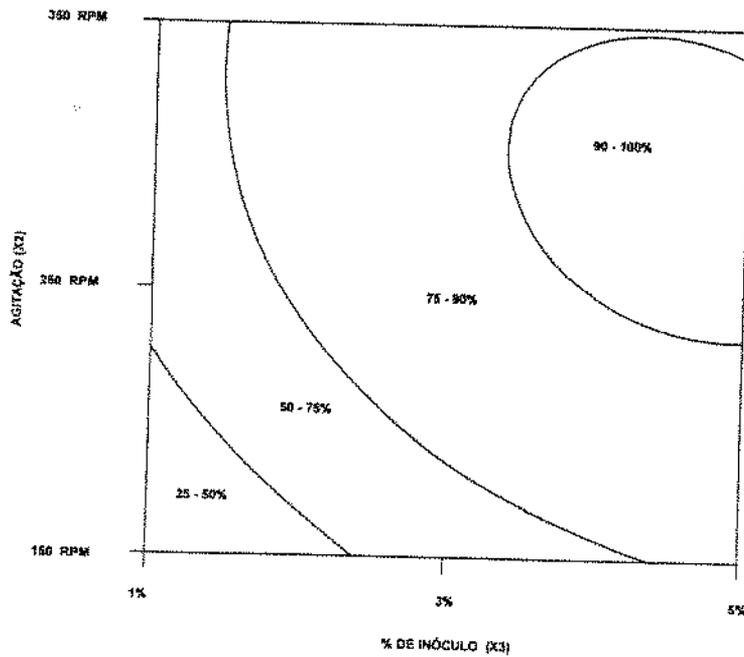
Observa-se, através dos coeficientes da equação, que a variável temperatura (X_1) foi a que mais afetou o desenvolvimento do processo, seguido da % de inóculo (X_3) e por último a agitação (X_2).

A Figura 9 representa os efeitos da % de inóculo e agitação, no grau de formação do cristal pelo isolado. Pode-se observar o efeito positivo de ambas variáveis em estudo. Assim, altas concentrações de inóculo, de 4 a 5 % e agitações de 250 a 350 rpm, levam a 90-100 % de lise celular, dados que confirmam a necessidade de altas taxas de aeração para produção do cristal, assim como na atividade biológica, concordando com ABDEL-HAMEED *et al.* (1991) e AVIGNONE-ROSSA *et al.* (1992).

Na Figura 10 são apresentados os efeitos da temperatura e pH no grau de formação do cristal. Pode-se observar que o pH, nas faixas estudadas, não afeta este parâmetro, que não foi significativo nas análises estatísticas. Entretanto, as baixas temperaturas (23-30°C) afetaram esta resposta; 31°C é suficiente para atingir de 90 a 100 % de formação de cristal.



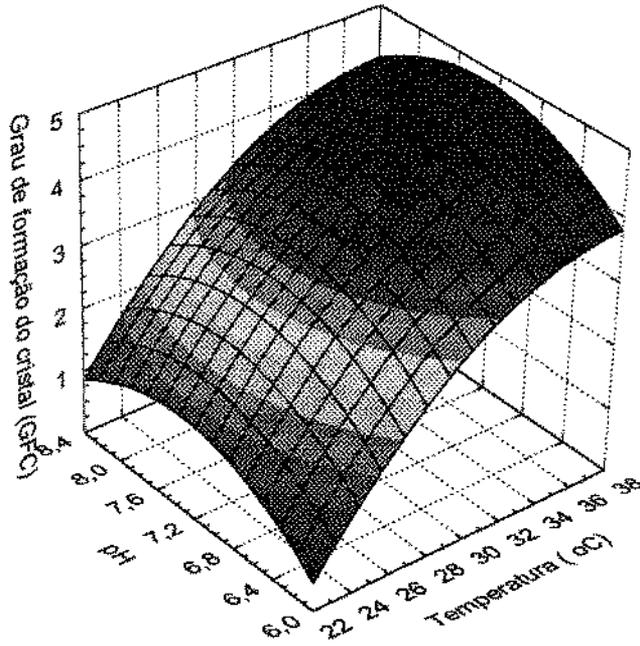
(a)



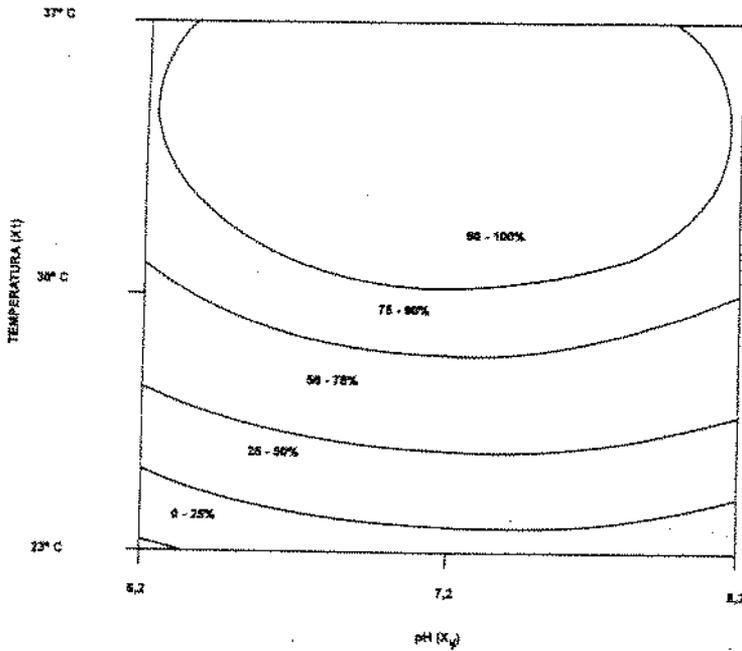
(b)

Figura 9: Superfície de resposta (a) e linhas de contorno (b) para a função (\hat{y}_2) grau de formação do cristal, fixando o pH e temperatura em 7,2 e 30°C, e variando a agitação (X_2) e % de inóculo X_3 .

Efeitos da Temperatura e pH no GFC



a



b

Figura 10: Superfície de resposta (a) e linhas de contorno (b) para a função (\hat{y}_2) grau de formação do cristal, fixando a % de inóculo X_3 e agitação X_2 em 3% e 250 rpm e variando a temperatura (X_1) e pH (X_4).

4.4.3. Determinação das condições ótimas.

Os estudos de otimização das condições da fermentação, para a produção da δ -endotoxina pelo isolado de *Bacillus thuringiensis* SP-36, devem ser realizados através de estratégias que permitam o crescimento bacteriano, a esporulação e a produção da toxina, ver item 3.4.3.

A Figura 11 apresenta a sobreposição das respostas (\hat{y}_1) contagem de esporos e (\hat{y}_2) grau de formação do cristal, em função da agitação e da % de inóculo. (fig 7 e 9). Pode-se observar os efeitos positivos de ambas variáveis. As máximas respostas são obtidas com agitação acima de 300 rpm e com 3 a 5 % de inóculo.

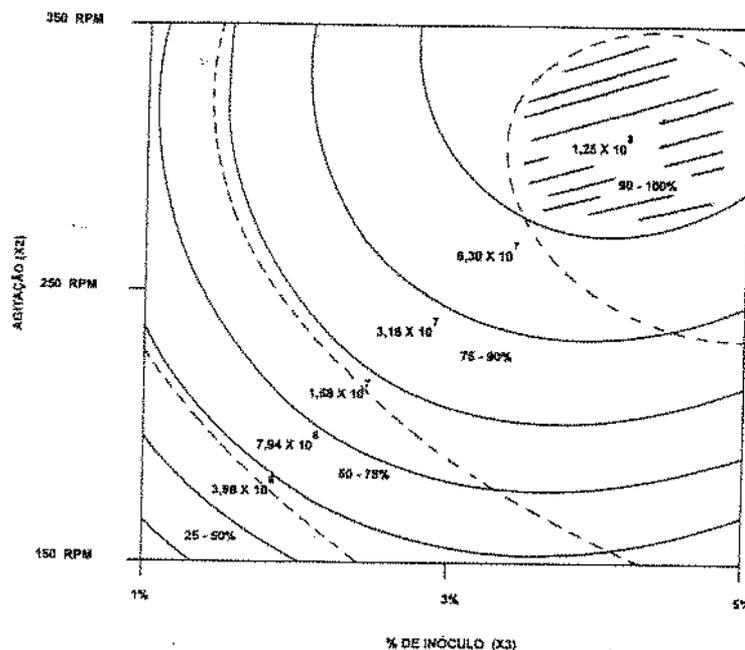


Figura 11. Sobreposição das superfícies de resposta para a contagem de esporos \hat{y}_1 (---) e grau de formação de cristal \hat{y}_2 (—), em função da agitação e % de inóculo, com pH e temperatura em níveis intermediários (7,2 e 30°C) e indicando na região achuriada aquela da máxima contagem e lise combinadas.

A Figura 12, mostra a sobreposição das superfícies (fig. 8 e 10) dos efeitos da temperatura e pH inicial nas contagens de esporos e grau de formação de cristal, a 24 h de fermentação. Pode-se observar que a partir de 30 até 36°C é obtida a máxima contagem de esporos, sendo que o pH não afeta as respostas.

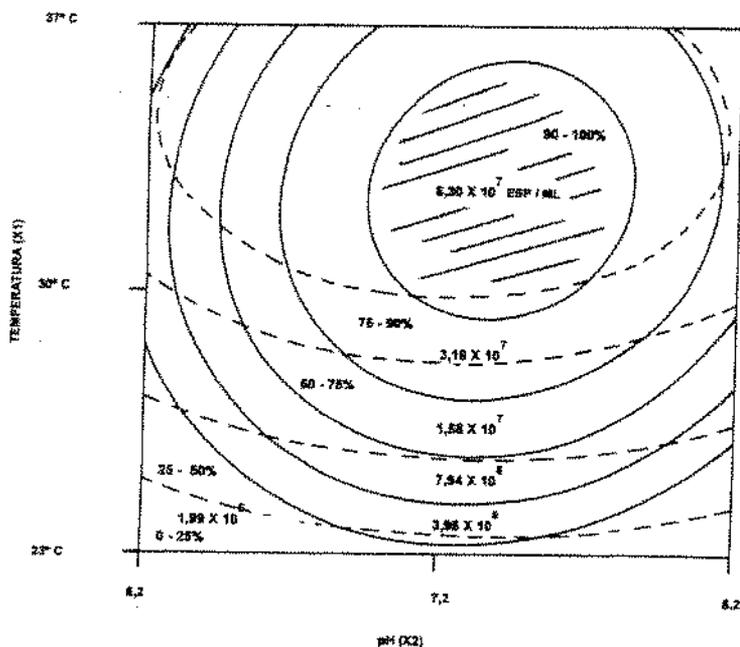


Figura 12. Sobreposição das superfícies de resposta \hat{y}_1 para a contagem de esporos (---) e \hat{y}_2 grau de formação do cristal (—), em função da temperatura e pH inicial, fixando a agitação e % de inóculo em níveis intermediários (250 rpm e 3%) e indicando na região achuriada aquela da máxima contagem e lise combinadas.

4.4.4. Aplicabilidade do modelo

A aplicabilidade do modelo foi demonstrada através da comparação dos valores observados experimentalmente (y) com aqueles estimados (\hat{y}_1). A partir do modelo obtido, uma resposta máxima de $1,25 \times 10^8$ esp/ml foi prevista para y_1 com as variáveis nos seguintes valores $X_1 = 30^\circ\text{C}$; $X_2 = 350$ rpm; $X_3 = 5\%$ e $X_4 = 7,2$. Tais condições foram usadas em testes confirmatórios obtendo-se uma média de $1,37 \times 10^8$, resultando portanto num erro relativo médio de +15% em relação ao predeziado de $1,25 \times 10^8$ (fig 12). Quanto a resposta (y_2) grau de formação do cristal, foram obtidos (grau 5) de 90 a 100 % de lise das células, nas mesmas condições.

Tabela 17 : Testes de verificação das previsões do modelo em condições otimizadas para a produção do complexo esporo-cristal pelo isolado SP-36

Condições fermentativas	esp/ml		grau do cristal	
	modelo (\hat{y}_1)	experimental (y_1)	modelo (\hat{y}_2)	experimental (y_2)
30°C x 250 rpm e 3 %	$4,70 \times 10^7$	$7,07 \times 10^7$	4	4
30°C x 350 rpm e 5 %	$1,25 \times 10^8$	$1,37 \times 10^8$	5	5

Em relação à atividade da delta-endotoxina do produto obtido em condições ótimas de fermentação, na Tabela 18, observa-se um ligeiro incremento na atividade inseticida (35.000 ITU/mg) em relação aos bioensaios da Tabela 11 (30.767 ITU/mg).

Tabela 18: Atividade em CL_{50} e ITU do complexo esporo-cristal obtido com o isolado SP-36 em condições otimizadas de fermentação.

Microrganismo	CL_{50} (mg/l)	ITU/mg
Bti IPS-82	7,015	15.000
SP-36	2,95	35.000

4.5. Seleção dos componentes do meio de cultura

Esta etapa foi realizada com o objetivo de selecionar as fontes de carbono e nitrogênio, assim como nutrientes e minerais para a formulação do meio de cultura. As condições de fermentação utilizadas foram as determinadas no item 4.4.3 da otimização das condições fermentativas.

4.5.1. Seleção das fontes de carbono e nitrogênio

Os substratos testados e as concentrações (%) encontram-se na Tabela 19. Nesta primeira etapa foi utilizado um delineamento fatorial fracionário 2^{7-4} permitindo o estudo da influência de 7 substratos, em dois níveis, em apenas 8 ensaios (BOX *et al.*, 1987). Os níveis testados foram adotados por informações da literatura e ensaios prévios de adequação das concentrações dos substratos para aplicação do delineamento estatístico.

Tabela 19. Níveis de concentração dos substratos testados na 1ª etapa

SUBSTRATOS	concentração (%)	
	níveis	
	-	+
A) Farelo de soja	0,1	0,6
B) Água de levedura	0,1	0,5
C) milhocina	0,1	0,5
D) HDL	0,2	0,8
E) Amido	0,2	0,8
F) Melaço	0,1	0,5
G) Glicerol	0,2	0,8

Na Tabela 20 são mostrados o delineamento experimental junto aos resultados da contagem de esporos (esp/ml) e grau de formação de cristal a 24 horas de fermentação. Foram calculados (segundo item 3.5.) os coeficientes de contraste para cada substrato (I_1), referentes à contagem de esporos (I_1) e grau de formação de cristal (I_2), sendo estes mostrados na mesma Tabela 20. A seleção foi realizada com base nos contrastes apresentados pelos diversos componentes testados, nas sucessivas etapas de seleção.

Tabela 20. Matriz do delineamento experimental 2⁷⁻⁴, resultados e contrastes na 1ª etapa.

Ensaio	A	B	C	D	E	F	G	esp/ml	Grau do cristal
1	-	-	-	+	+	+	-	3,70x10 ⁷	5
2	+	-	-	-	-	+	+	3,50x10 ⁶	4
3	-	+	-	-	+	-	+	3,54x10 ⁶	5
4	+	+	-	+	-	-	-	1,42x10 ⁷	4
5	-	-	+	+	-	-	+	2,71x10 ⁶	5
6	+	-	+	-	+	-	-	2,34x10 ⁷	4
7	-	+	+	-	-	+	-	3,50x10 ⁷	4
8	+	+	+	+	+	+	+	3,22x10 ⁷	4
<i>I</i> ₁	-0,355	0,740	0,780	-0,310	-0,160	0,935	-1,135		
<i>I</i> ₂	-0,310	-0,180	-0,430	-0,060	0,180	0,060	0,060		

Observa-se que os substratos que tiveram efeitos positivos na produção de células esporuladas, foram o melão, milhocina e água de levedura. O melão e milhocina apresentaram os maiores contrastes (*I*₁) : 0,935 e 0,780 respectivamente, que podem ser estimativas dos efeitos principais, seguidos pela água de levedura com 0,740.

Em relação ao grau de formação de cristal (*I*₂) observa-se que o amido, melão e glicerol, apresentaram efeitos positivos nesta resposta; entretanto os outros substratos, ricos em nitrogênio, apresentaram contrastes negativos nesta resposta. Deste modo, a seleção das fontes de nitrogênio foi realizada segundo os contrastes observados para a resposta contagem de esporos.

Os substratos selecionados foram os que apresentaram maiores contrastes na contagem de esporos, observando-se que o melão e a milhocina são basicamente fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente. Selecionou-se também a água de levedura como complemento de substâncias nitrogenadas, principalmente de peptídeos recomendados para o crescimento de *Bacillus* (VILARINHOS, *et al.*, 1989; DIAS *et al.*, 1991).

Foram descartadas as fontes de nitrogênio como o farelo de soja e HDL, e as fontes de carbono como o amido e glicerol, por apresentarem contrastes negativos ou praticamente nulos na produção de esporos.

4.5.2. Seleção da suplementação mineral

Nesta segunda etapa foram estudados os efeitos de nutrientes minerais, que podem influenciar a produção do complexo esporo-cristal; estes nutrientes são recomendados por pesquisadores como WAKISAKA, *et al.*, 1982; NICKERSON & BULLA, 1974 e SIKDAR & MANJUNDAR, 1991.

Foram testados os efeitos de nitrogênio inorgânico na forma de $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$; do potássio e fósforo na forma de K_2HPO_4 , do cálcio na forma de CaCl_2 , e de uma mistura de sais minerais (Fe, Mn, Zn e Mg), segundo item 3.5.3.

Para o estudo dos efeitos dos nutrientes minerais foi utilizado o delineamento experimental da Tabela 7 (item 3.5.). Assim, com a seleção dos três substratos da etapa anterior, o mesmo delineamento nos permite estudar os efeitos de outras quatro variáveis. Os compostos e concentrações utilizados, encontram-se na Tabela 21.

Nesta etapa as concentrações do melão, milhocina e água de levedura foram elevadas, devido aos contrastes positivos que apresentaram na anterior etapa .

Tabela 21. Níveis de concentração dos componentes testados na segunda etapa de seleção

COMPONENTES	Concentração	
	-	+
A) Melão (%)	0,2	0,8
B) Água de levedura (%)	0,2	0,8
C) Milhocina (%)	0,2	0,6
D) K_2HPO_4 (g/l)	0,1	0,3
E) $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ (g/l)	0,2	0,5
F) CaCl_2 (g/l)	0,2	0,8
G) Mistura de sais	ausência	presença

Na Tabela 22 são apresentadas junto ao delineamento experimental, os resultados e os contrastes calculados. Observando os contrastes, nota-se que o aumento na concentração do melão resultou num contraste negativo (-0.5845) na contagem de esporos.

Tabela 22. Delineamento experimental, resultados e efeitos da 2ª etapa de seleção

Ensaio	A	B	C	D	E	F	G	esp/ml (10 ⁶)	Grau do cristal
1	-	-	-	+	+	+	-	6,30	5
2	+	-	-	-	-	+	+	0,90	4
3	-	+	-	-	+	-	+	14,2	5
4	+	+	-	+	-	-	-	14,7	4
5	-	-	+	+	-	-	+	31,6	5
6	+	-	+	-	+	-	-	2,00	4
7	-	+	+	-	-	+	-	10,2	4
8	+	+	+	+	+	+	+	5,00	4
<i>l</i> ₁	-0,585	0,360	0,100	0,437	-0,169	-0,415	0,007	6,63 x 10 ⁶	
<i>l</i> ₂	0,120	-0,125	-0,87	-0,125	0,12	-0,125	0,125		

Em relação aos efeitos dos novos elementos em estudo, pode-se observar que o CaCl₂ e (NH₄)₂SO₄ não tiveram efeito positivo na contagem de esporos; assim, estes não foram selecionados; o CaCl₂ apresentou um forte contraste negativo (-0,4515).

O fosfato de potássio apresentou um efeito positivo (0,437) e foi selecionado nesta etapa. A mistura de sais, mesmo apresentando um mínimo efeito, também foi selecionada.

Para o grau de formação de cristal, os contrastes obtidos mostram que dentre os substratos somente a milhocina apresentou um significativo contraste negativo (-0,870). Assim a escolha dos componentes foi de acordo com os contrastes da contagem de esporos.

A Tabela 22 mostra-se os resultados obtidos da contagem de esporos para cada ensaio, observando-se que a média geral dos ensaios é de 6,63 x 10⁶ esp/ml, contagem esta considerada baixa nestes processos (DULMAGE *et al.*, 1989). Assim foi testado um delineamento final para verificação dos efeitos da concentração dos componentes selecionados nas contagens finais de esporos.

4.5.3. Seleção final e ajuste preliminar da concentração dos componentes do meio de cultura

Na terceira etapa foi usado um delineamento experimental 2^{5-2} , permitindo o estudo dos contrastes das 5 variáveis selecionadas em apenas oito ensaios, conforme matriz na Tabela 8, segundo item 3.5.4.

Esta etapa foi desenvolvida com o intuito de verificar os efeitos da concentração dos componentes do meio, com o objetivo de elevar os rendimentos do complexo esporo-cristal. Os componentes e níveis testados nesta etapa encontram-se na Tabela 23.

A concentração do melão neste ensaio foi diminuída, por ter apresentado contrastes negativos na etapa anterior (ver Tabela 23). A milhocina e água de levedura, por apresentarem contrastes positivos no item anterior, tiveram a concentração elevada. A mistura de sais, que apresentou um mínimo efeito no delineamento anterior, foi testada elevando-se em três vezes a concentração dos sais do nível superior (+), ver item 3.5.4.

Tabela 23. Níveis dos componentes testados na 3ª etapa

Constituintes	Concentração	
	-	+
A) Melão (%)	0,2	0,4
B) Milhocina (%)	0,2	0,8
C) Água de levedura (%)	0,5	1,0
D) K_2HPO_4 (g/l)	0,2	0,6
E) Sais minerais (g/l)	-	+

Na Tabela 24 é mostrado o delineamento experimental, juntamente com os resultados e contrastes calculados para contagem de esporos (I_1) e grau de formação de cristal (I_2).

Tabela 24. Delineamento experimental, resultados e efeitos da 3ª etapa

Ensaio	A	B	C	D	E	esp/ml 10^7	cristal
1	-	-	-	+	-	1,93	5
2	+	-	-	+	+	1,21	5
3	-	+	-	-	+	1,73	5
4	+	+	-	-	-	1,95	5
5	-	-	+	-	+	1,66	4
6	+	-	+	-	-	1,63	5
7	-	+	+	+	-	2,79	4
8	+	+	+	+	+	6,50	4
I_1	0,051	0,24	0,20	0,167	0,031	$2,1 \times 10^7$	
I_2	0,50	0,00	0,00	-0,50	-0,50		

Os resultados da contagem de esporos, a 24 horas, se encontram na Tabela 24, podendo-se observar que a média geral dos ensaios se elevou a $2,1 \times 10^7$, elevando-se em mais de 10 vezes o rendimento de esporos em relação à média da etapa anterior. Pode-se deduzir que a concentração dos componentes afeta os processos de produção do complexo esporo-cristal; a ausência do CaCl_2 e sulfato de amônio poderiam também ter contribuído para estes resultados.

Foi realizado um último ensaio, para testar a eficiência desta metodologia na formulação de meios. Assim, em relação ao melão, a diminuição da concentração resultou num contraste quase zero (0,0580) concluindo-se a faixa de concentração é adequada; portanto se utilizou a média dos níveis na formulação (3,0 g/l). Em relação à milhocina, água de levedura e fosfato de potássio, por ter seus contrastes positivos, foram utilizados nos seus níveis superiores (Tabela 23).

Também é observado que o aumento das concentrações da mistura de sais, não afetou a contagem de esporos, deduzindo-se que estes compostos não contribuem nos processos de produção do esporo e cristal, e assim não foi incluída na formulação final do meio de cultura. Os substratos já são suficientemente ricos nesses nutrientes minerais.

O ensaio com meio formulado por fatoriais fracionários (em g/l: melão 3,0; milhocina; 6,0; água de levedura 10,0 K_2HPO_4 6,0) em condições otimizadas, segundo item 4.4.3., deu uma contagem de esporos de $3,15 \times 10^7$ esp/ml a 24 h de processo, observando-se que é uma baixa contagem de esporos em relação à contagem obtida com meio basal, de $1,37 \times 10^8$ esp/ml.

Os resultados obtidos através desta metodologia permitiram a seleção e ajuste preliminar dos componentes do meio de cultura para a produção do complexo esporo-cristal de *Bacillus thuringiensis* SP-36, e a observação da uma necessidade de otimizar as concentrações dos componentes seleccionados.

4.6. OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE CULTURA

Nesta etapa são apresentados os resultados dos efeitos da concentração dos substratos, seleccionados na etapa anterior, visando sua otimização para a produção da delta-endotoxina, pelo isolado *Bacillus thuringiensis* SP-36.

4.6.1. Análise geral dos resultados

Os resultados obtidos nos 29 ensaios do planejamento experimental (constituído por planejamento fatorial 2^4 - ensaios 1 a 16, e um planejamento estrela de 8 ensaios, mais 5 ensaios no ponto central), são apresentados na Tabela 25.

Os resultados da contagem de esporos (esp/ml), e do grau de formação de cristal, assim como o pH final, foram obtidos a 24 horas de fermentação. O tempo foi estipulado através de ensaios prévios como suficiente para a produção do complexo esporo-cristal nas condições de 30°C, 350 rpm, 5 % de inóculo e 7,2 de pH inicial, segundo resultados da otimização de condições fermentativas (ítem 4.4.3.).

Os pontos centrais do delineamento foram definidos pelos resultados da fase anterior de ajustamento. Na Tabela 25 a partir dos resultados obtidos do planejamento experimental é possível fazer alguns comentários gerais:

- **Contagem de esporos:** Os melhores resultados foram obtidos no ensaio 25 com uma contagem de $4,7 \times 10^7$ ensaio que utilizou o mais alto nível (+1.6) de concentração de água de levedura e os outros componentes, melão, milhocina e K_2HPO_4 , em nível intermediário. Os piores resultados foram obtidos no ensaio 8, com meio de cultura dos três substratos em estudo, em concentrações nos níveis (+1) a exceção das sais de fosfato (-1). Esta somatória da concentração de nutrientes seria alta, sendo considerada adversa para o cultivo do *Bacillus*, inibindo fortemente estes processos fermentativos, devido principalmente à limitação de aeração do meio de cultura em frascos erlenmeyer agitados em agitador rotativo; estes resultados confirmam o relatado por VANDEKAR & DULMAGE (1982) e DULMAGE *et al.*, (1990) autores que alertam das limitações do uso de erlenmeyers na formulação de meios.

Tabela 25. Condições experimentais e resultados obtidos de acordo com o planejamento experimental 5⁴ por análise de superfície de resposta

Ensaio nº	Condições experimentais (%)				resultados		
	melaço (X ₁)	milhocina (X ₂)	água de levedura (X ₃)	K ₂ HPO ₄ (X ₄)	Nº esporos (10 ⁷ esp/ml) (Y ₁)	Grau do cristal (Y ₂)	pH final
1	0,2	0,4	0,5	0,3	0,230	4	6,91
2	0,8	0,4	0,5	0,3	0,253	4,5	6,74
3	0,2	1,2	0,5	0,3	0,135	5	6,38
4	0,8	1,2	0,5	0,3	0,155	4	6,15
5	0,2	0,4	1,5	0,3	1,70	4,5	6,95
6	0,8	0,4	1,5	0,3	0,83	4,5	6,23
7	0,2	1,2	1,5	0,3	0,17	4	6,71
8	0,8	1,2	1,5	0,3	0,06	2	6,10
9	0,2	0,4	0,5	0,7	1,60	4	7,51
10	0,8	0,4	0,5	0,7	0,16	4	7,23
11	0,2	1,2	0,5	0,7	1,18	2,5	6,38
12	0,8	1,2	0,5	0,7	0,22	4,5	6,79
13	0,2	0,4	1,5	0,7	3,80	3,5	7,46
14	0,8	0,4	1,5	0,7	2,80	4,5	7,36
15	0,2	1,2	1,5	0,7	1,12	3,5	6,92
16	0,8	1,2	1,5	0,7	0,87	3	7,34
17	0,5	0,8	1,0	0,5	2,90	4	6,94
18	0,5	0,8	1,0	0,5	2,04	4	7,11
19	0,5	0,8	1,0	0,5	0,74	4	7,33
20	0,02	0,8	1,0	0,5	0,33	4	7,42
21	1,0	0,8	1,0	0,5	0,22	4	7,54
22	0,5	0,16	1,0	0,5	0,48	4	7,32
23	0,5	1,44	1,0	0,5	0,17	3	6,23
24	0,5	0,8	0,2	0,5	0,30	4	7,36
25	0,5	0,8	1,8	0,5	4,70	4	7,12
26	0,5	0,8	1,0	0,18	0,21	4,5	6,72
27	0,5	0,8	1,0	0,82	0,40	4,5	7,83
28	0,5	0,8	1,0	0,5	0,36	4,5	6,92
29	0,5	0,8	1,0	0,5	1,20	5	7,10

Y₁ = número de esporos

Y₂ = grau de formação de cristal

- **Grau de formação do cristal:** estas leituras também foram feitas a 24 horas, sendo este parâmetro um dos mais significativos nestes processos, considerou-se que condições que nos levassem a um grau de lise acima de 90 % em menos tempo (grau 5), seriam os mais indicados para nosso processo.

- **pH final:** os resultados do pH final, se encontram dentro da faixa de 6,0 a 8,5, usuais para o cultivo por fermentação submersa do *Bacillus thuringiensis* como indicam numerosos trabalhos (SMITH, 1981; EJFOR & OKAFOR, 1989).

TABELA 26. Coeficientes de regressão e significância¹ da modelagem empírica dos efeitos dos componentes do meio de cultura para a produção de complexo esporo-cristal com *B.t.* SP-36

Variáveis independentes	N ^o esp/ml (Y ₁)		Grau de formação cristal (Y ₂)	
	Coeficientes	Significancia P	Coeficientes	Significancia P
Linear				
b ₀	6,9587		4,3657	
b ₁	-0,1381	0,0744	-0,3077	0,0094
b ₂	-0,2047	0,0127	-0,2888	0,0135
b ₃	0,2430	0,0044	-0,071	n.s
b ₄	0,2360	0,0053	-0,1183	n.s
Quadrático				
b ₁₁	-0,1493	n.s	-0,1196	n.s
b ₂₂	-0,1376	n.s	-0,3149	0,0267
b ₃₃	0,1026	n.s	-0,1196	n.s
b ₄₄	-0,1337	n.s	0,0756	n.s
Interação				
b ₁₂	0,0112	n.s	-0,3437	0,011
b ₁₃	0,0378	n.s	-0,1562	n.s
b ₁₄	-0,0808	n.s	-0,0937	n.s
b ₂₃	-0,1722	0,0520	-0,1562	n.s
b ₂₄	0,0965	n.s	0,0312	n.s
b ₃₄	0,0703	n.s	0,2187	n.s
R ²	0,7843		0,7574	
CV	4,800		11,690	
Falta de ajuste	0,6530		0,4095	

P Probabilidade do evento ao nível de significância (P < 0.05)

n.s. (não significativo)

R² variância explicada pelo modelo ou coeficiente de determinação

CV Coeficiente de Variação determina a precisão dos experimentos

Falta de ajuste ou "lack of fit", determina o ajuste dos dados ao modelo

b₁ = melaço, b₂ = milhocina, b₃ = água de levedura, b₄ = K₂HPO₄

4.6.2. Análise pela metodologia de superfícies de resposta

A variância explicada ou coeficientes de determinação R^2 e os coeficientes de variação (CV) obtidos nestes modelos (Tabela 26), são considerados aceitáveis em processos biológicos, em função da variabilidade que normalmente apresentam, considerando que a utilização de substratos complexos na formulação de meios, contribuem para uma maior variabilidade. Assim, os principais problemas observados foram a presença de substâncias insolúveis que dificultaram a homogeneização do meio, as pequenas variações na concentração inicial de células inoculadas nos diversos ensaios, as dificuldades de padronização dos tampões de algodão utilizados nos diversos frascos resultando em diferentes permeabilidades para a transferência de oxigênio e outros parâmetros como a possível variabilidade fisiológica do próprio microrganismo, e possíveis erros analíticos.

a) Efeito da concentração dos componentes do meio na contagem de esporos (y_1)

Considerando que a produção de esporos é uma medida indireta da multiplicação do microrganismo e portanto da produção do cristal protéico, e esta depende diretamente do máximo crescimento celular obtido, estas respostas vão depender em grande parte das condições e do meio de cultura em que o microrganismo se desenvolve. Pode-se comentar que as contagens obtidas (cerca de 0,20 a $4,70 \times 10^7$) nos ensaios da Tabela 25, estão dentro das faixas aceitáveis, segundo os ensaios prévios com meio sintético.

A Análise de Variância (ANOVA), do modelo de regressão preditivo (Tabela 27), elaborado a partir dos resultados experimentais (Tabela 25) para a resposta contagem de esporos/ml (Y_1), mostra que o modelo se ajusta aos dados experimentais com uma significância de 0,011; os termos lineares apresentaram uma significância de 0,001 contribuindo significativamente ao modelo e seguido dos termos quadráticos com uma significância de 0,160 e das interações com 0,320.

Esta resposta mostra um coeficiente de correlação de $R^2 = 0,7843$. O coeficiente de variação 4,8 mostra-se baixo, e a falta de ajuste de 0,6530 não foi significativa, podendo ser afirmado que o modelo obtido apresenta um razoável ajuste dos dados.

Na Tabela 26 são mostrados os coeficientes de regressão e significância dos termos da equação obtida para esta resposta. As variáveis que tiveram efeitos significativos na contagem de esporos, foram: milhocina (X_2), água de levedura (X_3) e K_2HPO_4 (X_4). O melão (X_1) com

uma significância de 0,0744, não afeta significativamente esta resposta, entretanto, esta variável pode ser importante, pois sua influência se torna significativa a um nível de probabilidade de 7%. Considerando que a falta de ajuste não foi significativo, podemos afirmar que o modelo se ajustou razoavelmente aos dados, ou seja o modelo matemático representa as tendências aproximadas das contagens de esporos/ml num processo fermentativo dentro das faixas experimentais estudadas.

$$\hat{y}_1 = 6,9587 - 0,1381x_1 - 0,2047x_2 + 0,2430x_3 + 0,2360x_4 - 0,1493x_1^2 - 0,1376x_2^2 + 0,1026x_3^2 - 0,1337x_4^2 + 0,012x_1x_2 + 0,0378x_1x_3 - 0,0808x_1x_4 - 0,1722x_2x_3 + 0,0965x_2x_4 + 0,0703x_3x_4$$

(Equação 3)

onde:

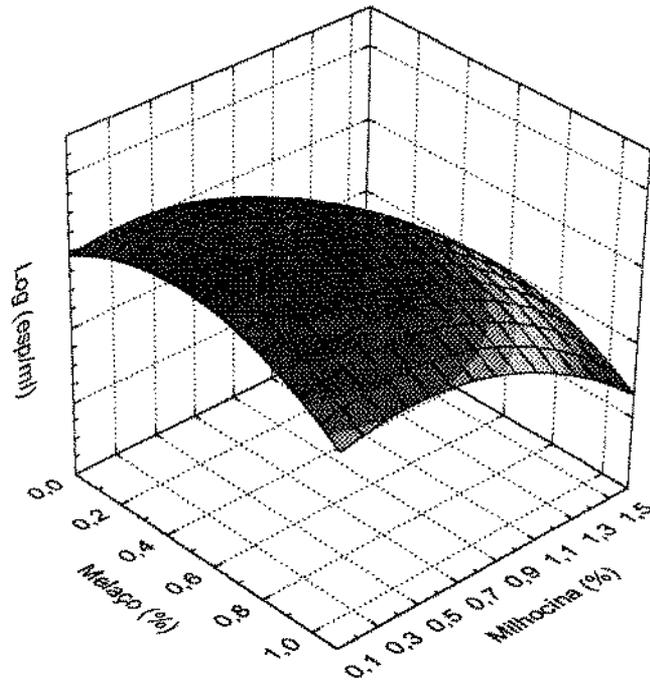
\hat{y}_1 = resposta em log da contagem de esporos
 x_1 = % Melaço; x_2 = milhocina; x_3 = Levedura; x_4 = K_2HPO_4

Tabela 27. Análise de variância dos resultados para a resposta contagem de esporos (esp/ml) dos efeitos da concentração dos componentes do meio

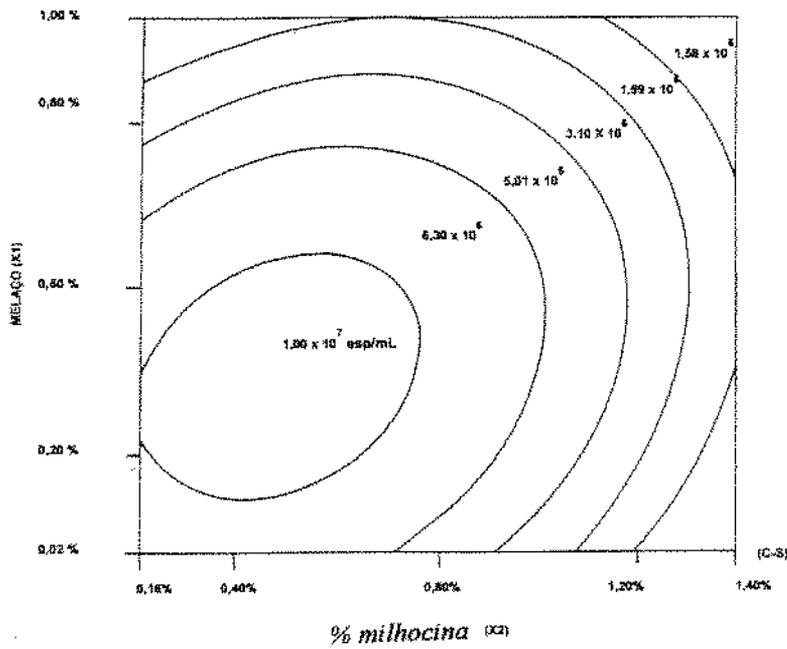
Causa da variação	Grau de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	R ²	F Calculado	Prob <F
Linear	4	3,7135	0,9283	0,5274	8,5570	0,001
Quadrático	4	0,9756	0,2439	0,1386	2,2480	0,160
interação	6	0,8325	0,1387	0,1183	1,2790	0,320
MODELO	14	5,5217	0,3944	0,7843	3,6383	0,011
Falta de ajuste	10	1,0000	0,1009		0,7920	0,653
Erro puro	4	0,5095	0,1273			
Resíduo	14	1,5189	0,1084			

Nível de significância ($P < 0,05$)

Foi realizada uma simulação dos dados dentro da região experimental, usando-se o modelo da equação 3, fixando-se as variáveis, água de levedura (X 3) e fosfato de potássio (X 4), em seus níveis intermediários (1,0 e 0,5), variando os níveis de melaço (X 1) e milhocina (X 2). A superfície de resposta obtida é mostrada na Figura 13.



(a)



(b)

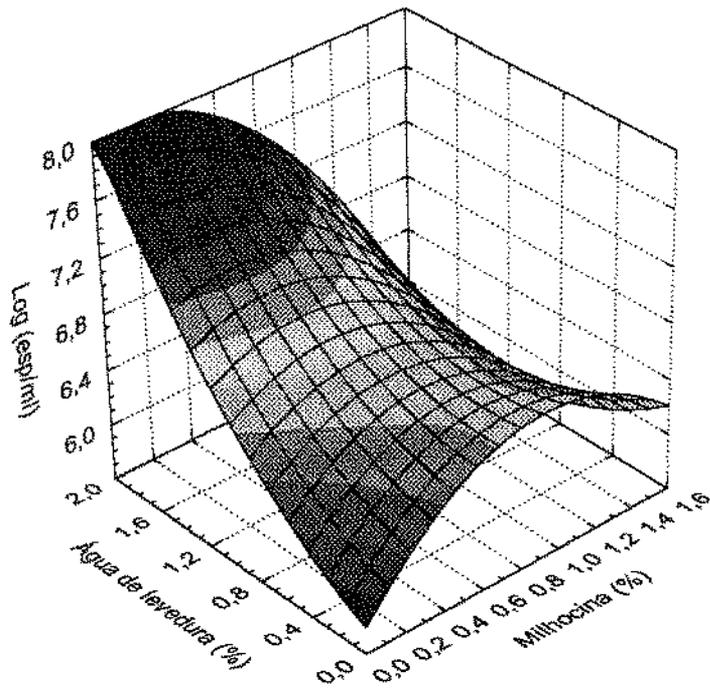
Figura 13. Superfície de resposta (a) e linhas de contorno (b) para a função \hat{y}_1 (esp/ml), fixando água de levedura (X_3) e K_2HPO_4 (X_4) em (1.0 e 0.5 %), variando % de melaço (X_1) e milhocina (X_2).

Na figura 13 pode-se observar que concentrações a partir de 0,5 % de melaço e 0,7 % de Corn-steep, inibem a produção de esporos e conseqüentemente do cristal protéico. As maiores contagens de $1,0 \times 10^7$, foram obtidas nas faixas de 0,20 a 0,5 % de melaço e aproximadamente 0,16 a 0,75 % de milhocina, sendo que as mínimas leituras, de $1,58 \times 10^6$, foram nas faixas acima de 0,7 % de melaço e 1,2 % de milhocina. Estes resultados das contagens se encontram dentro das faixas aceitáveis para estes processos; diversos trabalhos reportam estes níveis de esporulação. Estes resultados estão de acordo com KUPPUSSAMY & BALARAM (1991) que relataram os efeitos positivos do milhocina nos rendimentos celulares e toxicidade da toxina produzido pelo *B.t.i*.

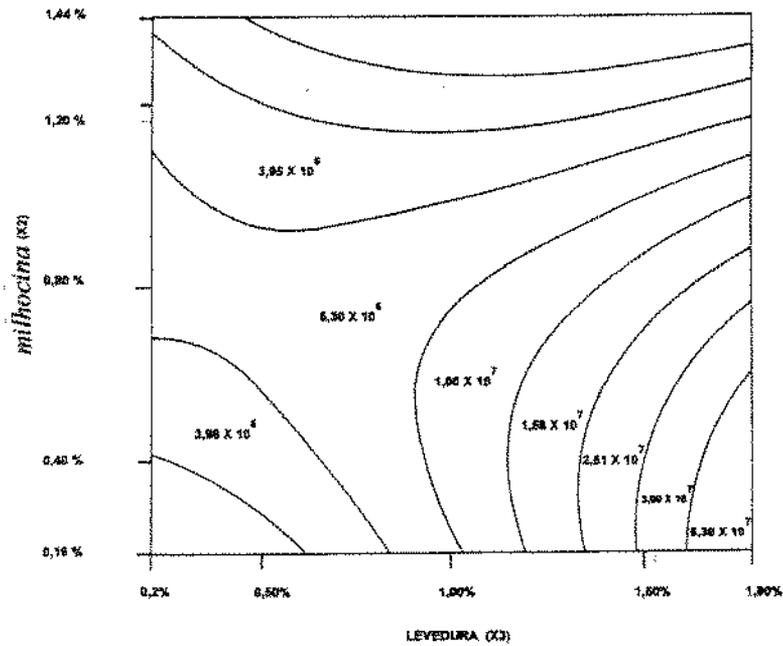
A Figura 14 apresenta os efeitos do milhocina (X_2) e da água de levedura (X_3). Na Equação 3 e Tabela 26, observa-se que estas duas variáveis tiveram um efeito de interação significativo ($X_2.X_3$), sendo que este coeficiente de interação β_{23} é negativo (-0,1722). Observa-se também, a influência do milhocina e água de levedura, na multiplicação das células do isolado SP-36, através da produção de esporos. Altas concentrações de água de levedura no meio (1,0 a 1,8 %) afetam positivamente o rendimento celular, observando-se uma tendência positiva na contagem de esporos com água de levedura acima de 1,0 até 1,8 % e do milhocina até 0,8 %. A máxima contagem de células, de $6,30 \times 10^7$, é obtida a partir de aproximadamente 1,6 % de água de levedura e 0,10 a 0,60 % de milhocina.

Na Figura 15 são apresentados os efeitos do milhocina e fosfato de potássio na produção de esporos e produção de cristal, pela linhagem *B. t.* SP-36. Na Equação 3 e Tabela 26, pode ser observado o efeito positivo do fosfato (+ 0,2360) no crescimento e produção de esporos; concentrações a partir de 0,50 até 0,82 % levaram às melhores respostas. Este comportamento está de acordo com os reportados por OSADCHAYA *et al.* (1989) que estudando os efeitos de fontes de fósforo encontrou que o KH_2PO_4 incrementava o crescimento celular em 40 a 60 %. FODA *et al.* (1985) observaram que o KH_2PO_4 incrementava a produção e atividade da delta-endotoxina em *B.t.* Assim também WASISAKA *et al.* (1982) reportou que a presença do íon potássio é essencial para a formação da delta-endotoxina.

Por outro lado o milhocina apresentou o mesmo comportamento observado anteriormente, ou seja, concentrações acima de 0,80 % inibem o crescimento celular.

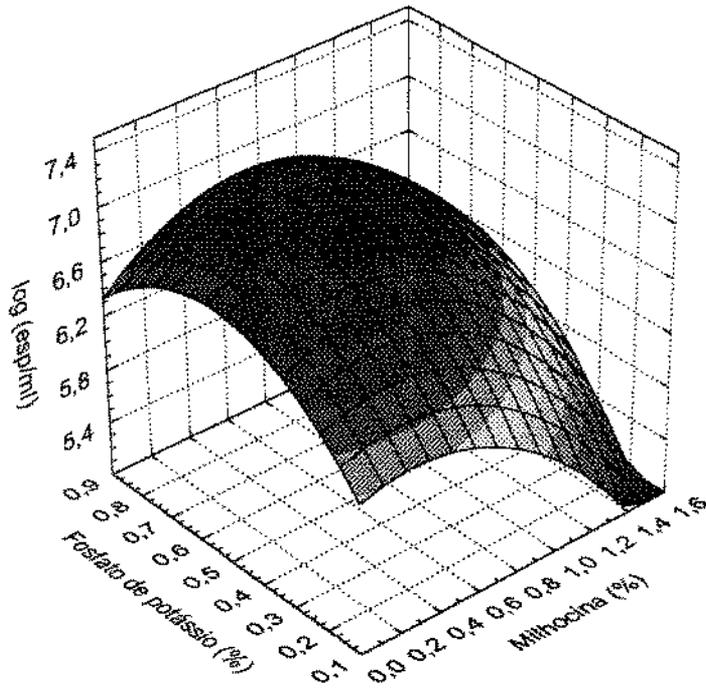


a

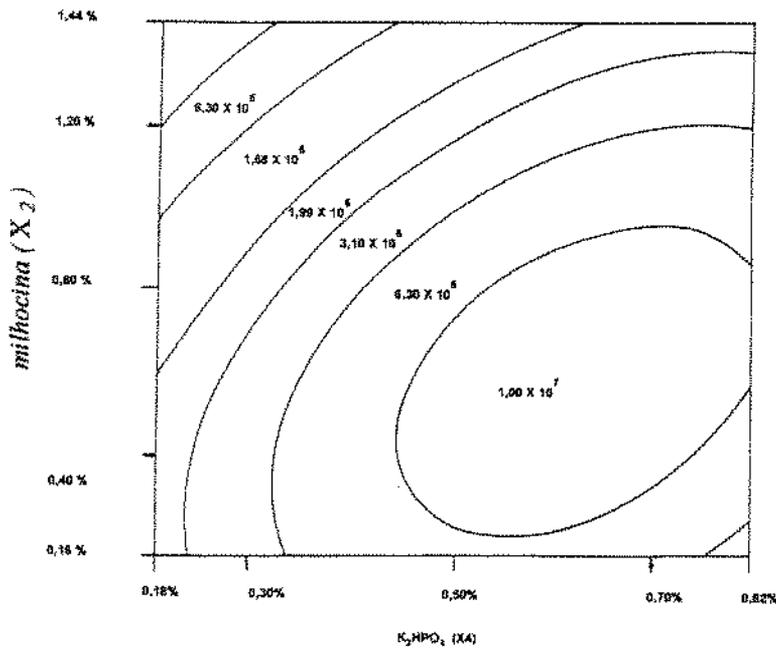


b

FIGURA 14. Superfície de resposta (a) e linhas de contorno (b) para a função \hat{y}_1 (esp/ml) variando os níveis de milhocina (X_2) e água de levedura (X_3), fixando o melão e fosfato em níveis intermediários (0.5%) respectivamente.



(a)



(b)

FIGURA 15. Superfície de resposta (a) e linhas de contorno (b) para a função \hat{y}_1 (esp/ml), variando os níveis de milhocina (X_2) e K_2HPO_4 (X_4), fixando o melaço e água de levedura a níveis intermediários (1,0 e 0,5 %).

b) Efeito da concentração dos componentes do meio no grau de formação de cristal (y_2)

A variância explicada de 0,7574 para o grau de formação de cristal, assim como o coeficiente de variação (CV) de 11,69, mostram um mediano ajuste do modelo aos dados experimentais (Tabela 26). Neste caso a Equação 4 deve ser empregada com cautela e, provavelmente, seria necessário controlar alguma outra variável do processo para que o modelo fosse melhorado. A Análise de Variância da resposta grau de formação de cristal na Tabela 28, mostra que o modelo obtido é estatisticamente significativo ao nível de 95 %, sendo que os termos lineares são os que mais contribuíram ao modelo, seguido pelo termos de interação; os termos quadráticos não foram significativos. O desvio da regressão não foi significativo ao nível de 95 %.

$$\hat{y}_2 = 4,300 - 0,3077x_1 - 0,2828x_2 - 0,071x_3 - 0,1183x_4 - 0,1196x_1^2 - 0,3149x_2^2 - 0,1196x_3^2 + 0,0756x_4^2 - 0,3437x_1 \cdot x_2 - 0,1562x_1x_3 - 0,0937x_1x_4 - 0,1562x_2x_3 + 0,0312x_2x_4 + 0,2187x_3x_4$$

(Equação 4)

onde:

\hat{y}_2 = grau de formação do cristal (GFC)

X_1 = melaço, X_2 = milhocina, X_3 = água de levedura, X_4 = K_2HPO_4

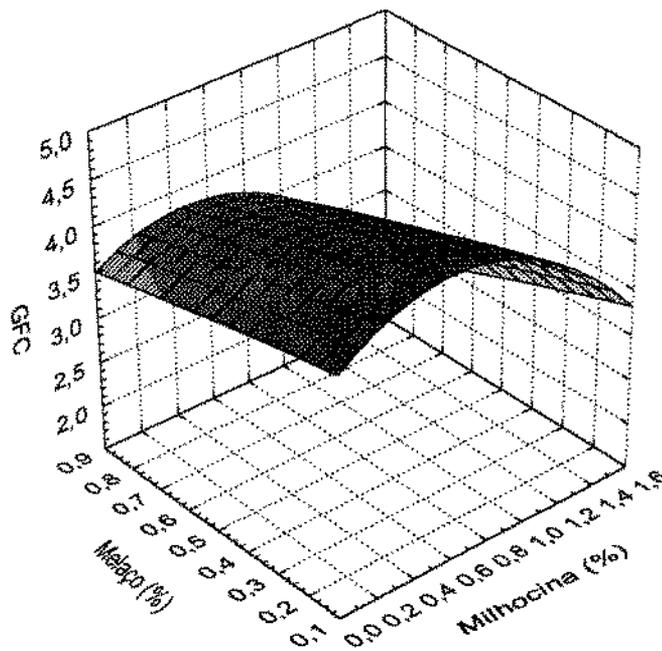
Na Tabela 26 e Equação 4 observa-se que as únicas variáveis que afetaram significativamente ($P < 0,05$) esta resposta foram o melaço (X_1) e o corn- steep (X_2). A água de levedura e o fosfato de potásio não tiveram significância nesta resposta. Observa-se também que os efeitos de segunda ordem do milhocina, assim como os efeitos de interação do melaço com milhocina ($X_1 \cdot X_2$) foram significativos para esta resposta.

Tabela 28. Análise de variância dos resultados da amostragem para a resposta grau de formação de cristal dos efeitos da concentração dos componentes do meio

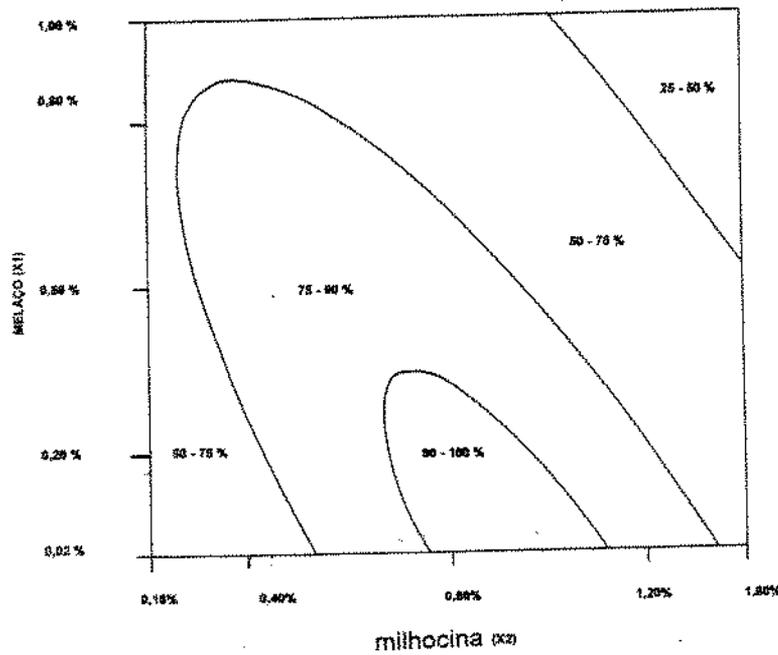
Causa da variação	Grau de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado medio	R ²	F Calculado	Prob <F
Linear	4	4,1647	1,0411	0,3269	4,71	0,0122
Quadrático	4	1,8920	0,4730	0,1485	2,14	0,1292
interação	6	3,5937	0,5989	0,2821	2,71	0,0581
MODELO	14	9,6505	0,6893	0,7574	3,12	0,0206
Falta de ajuste	10	2,3908	0,2390		1,36	0,4095
Erro puro	4	0,7000	0,1750			
Resíduo	14	3,0908	0,2207			

Nível de significância nível ($P < 0,05$)

A simulação dos dados dentro da região experimental, variando os níveis de melão (X_1) e milhocina (X_2), e fixando as variáveis água de levedura (X_3) e fosfato de potássio (X_4) em seus níveis intermediários (1,0 e 0,5 %), é mostrada na superfície de resposta na Figura 16. Pode ser observado que o máximo grau de formação de cristal (90 - 100 % de lise) é obtido na faixa de 0,7 a 1,1 % de milhocina e com menos de 0,35% de melão.



(a)



(b)

Figura 16. Superfície de resposta (a) e linhas de contorno (b) para a função \hat{y}_2 (gfc), variando melaço (x_1) e corn-steep (x_2) e fixando água de levedura (x_3) e K_2HPO_4 (x_4).

4. 6.3. Localização das condições ótimas

A concentração dos componentes do meio de fermentação para a produção da δ -endotoxina, pela isolado *SP-36* de *Bacillus thuringiensis*, foram determinadas pelas condições que permitem o máximo crescimento bacteriano, esporulação e produção da toxina. A Figura 17 apresenta a sobreposição dos gráficos para as duas respostas que tiveram efeitos significativos, assim na figura pode-se observar que as concentrações de milhocina e melaço que levaram às melhores respostas foram obtidas com 0,7 % de milhocina e 0,35 % de melaço, fixando-se água de levedura em 1,0% e K_2HPO_4 em 0,5%.

De acordo com a Figura 16, as concentrações de milhocina e melaço ficam definidas em 0,7% e em 0,35 % respectivamente. A concentração da água de levedura foi definida em 1,6 % segundo a Figura 14, e a do K_2HPO_4 em 0,6 % segundo a Figura 15.

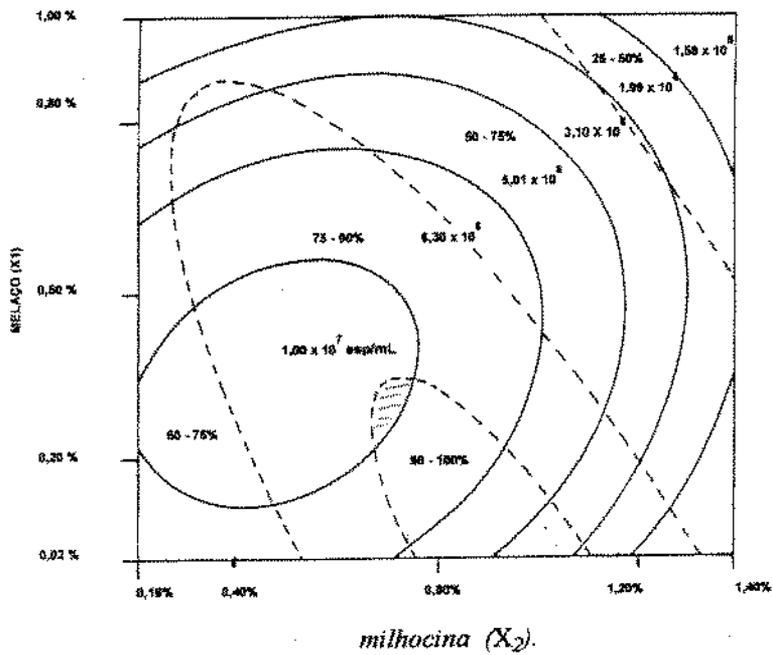


Figura 17: Sobre-posição das Superfícies de resposta para as contagem de esporos (\hat{y}_1) e grau de formação de cristal (\hat{y}_2) em função da % milhocina e melaço, fixando a água de levedura e K_2HPO_4 nos níveis intermediários (1,0 e 0,5 %) e indicando na região achurçada aquela da máxima contagem e lise combinadas.

4.6.4. Aplicabilidade do modelo

As previsões do modelo foram calculadas a partir da Figura 9, onde as máximas leituras da contagem ($6,30 \times 10^7$) de esporos é obtida com 1,6 % de água de levedura, milhocina 0,6 % e fosfato e melação com 0,5 %.

A comparação entre o valor previsto de $6,30 \times 10^7$ para a contagem de esporos, com aquele obtido experimentalmente com o meio otimizado em : 3,5g/l de melação, milhocina 7,0g/l, 16g/l de água de levedura e 6g/l de fosfato de potássio, permite constatar que a otimização permitiu obter contagens superiores, quase o dobro em relação aos estimados.

Estes ótimos resultados podem ser decorrentes do fato de que estes valores foram obtidos em ensaios cujas condições de fermentação diferiam consideravelmente daquelas determinadas como ótimas em nossa otimização. Assim também, podem ser advindos de muitos fatores tais como os já relatados no item 4.6.2..

Em relação à atividade larvicida do produto obtido em condições e meio otimizado em agitador rotativo, determinou-se a atividade larvicida CL_{50} do caldo de cultivo final. Deste modo, a atividade foi expressa em diluições do caldo de cultura final, com larvas de *Aedes aegypti* encontrando-se um CL_{50} de $1,26 \times 10^6$ a 24 horas.

4.7. Testes de scale-up

Os testes de scale-up foram conduzidos nas condições otimizadas da etapa anterior, em agitador rotativo ou seja; 30°C, 5% de inóculo, pH inicial de 7,2, com 15 litros de meio de cultura formulado com melação 3,5 g/l; milhocina 7,0 g/l; água de levedura 16 g/l; e K_2HPO_4 6,0 g/l. Estes testes em fermentador piloto consistiram de dois ensaios para observação do comportamento da fermentação, sendo testadas duas condições de aeração na produção do complexo esporo-cristal, pelo isolado *B. thuringiensis* SP-36. Os testes foram: fermentações com controle em 50 e 30 % de

oxigênio dissolvido, durante a fase de crescimento do microrganismo, estes níveis de oxigênio dissolvido são os relatados na literatura, adequados para a produção da δ -endotoxina por *B. thuringiensis israelensis* segundo AVIGNONE-ROSSA *et al.* (1992).

4.7.1. Comportamento do pH durante o crescimento do microrganismo.

As Figuras 18 e 19 apresentam os comportamentos do pH e o crescimento do isolado. Em relação ao pH ambos ensaios apresentaram o mesmo comportamento, isto é, inicialmente ocorre um decréscimo do valor inicial de 7,31 e 7,13 até valores 6,95 e 6,93, dentro das primeiras duas e quatro horas respectivamente, seguido de uma fase estacionária até 5 e 6 horas, e por último um retorno à neutralidade.

O crescimento do microrganismo foi acompanhado através de leituras das mudanças da absorvância a 650 nm do meio de cultura. Assim, pode-se observar claramente as fases de crescimento do microrganismo em ambas condições. Pode-se observar que o período de queda de pH corresponde à fase *lag* de crescimento e começo das fase de crescimento *logaritmico* em ambos testes. Observações microscópicas atestaram a presença do início da esporulação das células a partir das 5 e 5,5 horas respectivamente nos dois testes.

Este comportamento é típicos de processos com a espécie *Bacillus*, microrganismo que conta com a glicose como principal fonte de carbono; assim estes açúcares são convertidos em ácidos orgânicos, com uma queda do pH do meio de cultura. Desta forma a queda da concentração de carboidratos além de um determinado nível, interrompe o crescimento exponencial, e então o consumo dos ácidos produzidos, faz com que o pH retorne à neutralidade e a célula esporule (BULLA *et al.*, 1988; BENOIT *et al.*, 1990).

Também se observa uma ligeira queda do pH do meio em ambos ensaios; essa ligeira diminuição pode ser consequência da baixa concentração do substrato utilizado na formulação do meio, tendo em conta que foi otimizado para agitador rotativo, bem como ao efeito tamponante dos sais de fosfato de potássio do meio de cultura.

No ensaio com 50 % OD apresentados na Figuras 18 e 20, a fase *lag* foi de três horas, a fase *logaritmica* de 2,0 horas de duração até umas 5 horas aproximadamente de processo, tempo em que a velocidade de crescimento decresce. O processo foi acompanhado até lise total das células em 18 horas. A fase *lag* foi demorada provavelmente devido ao inóculo do ensaio estar ao final da fase logaritmica.

Nas Figura 19 e 21, do ensaio com 30 % OD, a fase *logaritmica* é atingida rapidamente em duas horas, o crescimento *logaritmico* foi de aproximadamente de 3 horas, seguido de uma queda da velocidade de crescimento, observações microscópicas constataram começo da esporulação com 5,5 horas. O processo foi conduzido até atingir a completa lise das células a 24 horas.

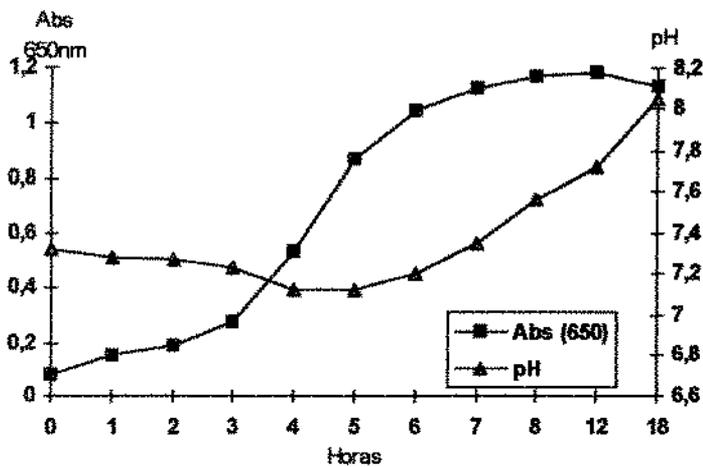


Figura 18. Comportamento do pH durante o crescimento do isolado SP-36 em fermentador piloto com 50 % de OD

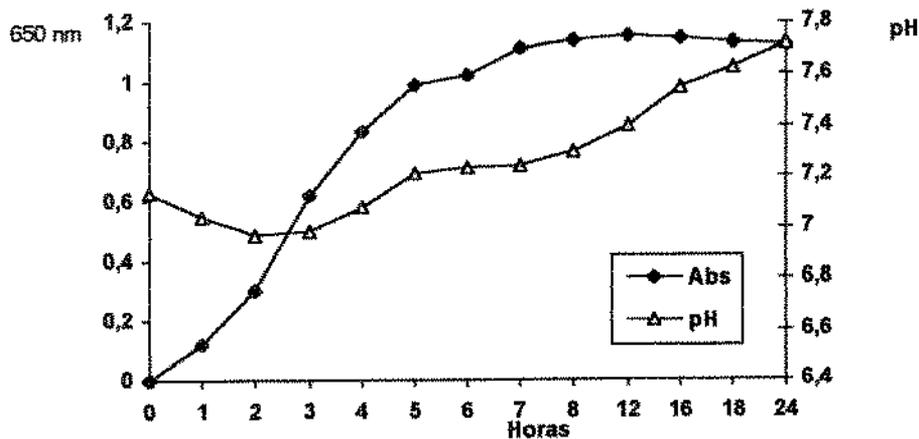


Figura 19. Crescimento do isolado B.t. SP-36 e comportamento do pH em fermentador com 30% de OD.

4.7.2. Influência do oxigênio dissolvido no crescimento do microrganismo

Foram testadas duas condições de aeração, a primeira, com 50 % de oxigênio dissolvido, durante a fase de crescimento, com resultados mostrados na figura 20, onde se nota que nas primeiras 3 horas da fase *lag* o oxigênio dissolvido é acima de 80 %, e somente na fase de crescimento *logaritmico* a taxa de oxigênio se mantém em aproximadamente em 50 %, após esta fase o oxigênio dissolvido eleva-se chegando a mais de 90 % na fase de lise.

Quanto ao ensaio com controle de oxigênio dissolvido em 30 % de OD, (figura 21), observa-se o mesmo comportamento e a taxa de OD se mantém em 30 % somente na fase *logaritmica* de crescimento.

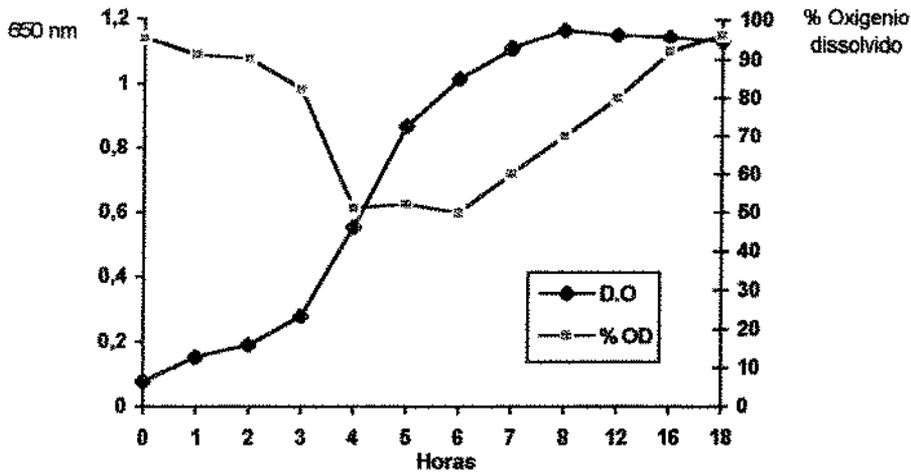


Figura 20. Crescimento do B.t. SP-36 e comportamento do oxigênio dissolvido em fermentador com 50 % de O.D.

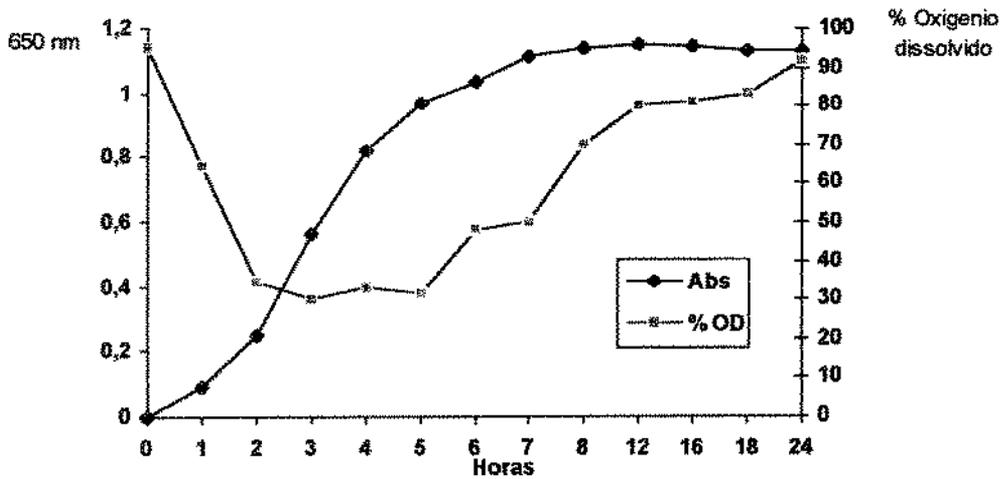


Figura 21. Crescimento do isolado B.t. SP-36 e comportamento do oxigênio dissolvido em fermentador com 30 % de O.D.

As velocidades de crescimento são diretamente influenciadas pela aeração; assim a maior velocidade de $0,51 \text{ h}^{-1}$ e obtida com a máxima aeração (50 %) no primeiro ensaio, sendo que no segundo teste com 30% OD obteve-se $0,25 \text{ h}^{-1}$. Do mesmo modo, o tempo de geração é calculado como sendo 1,35 e 2,77 h respectivamente. O consumo de carboidratos também foi mais eficiente no primeiro processo sendo consumidos 0,77 e 0,51 g/l de açúcares redutores totais.

Tabela 29: resultados dos testes de scale-up

Parâmetros	50 % OD	30 % OD
Açúcares totais iniciais (g/l)	1,32	0,98
inóculo (ufc/ml)	$2,00 \times 10^5$	$1,55 \times 10^5$
pH inicial	7,31	7,13
Fase Log (h)	2,0	3,0
Açúcares totais finais (g/l)	0,550	0,471
esporos (esp/ml)	$1,96 \times 10^9$	$1,76 \times 10^9$
pH final	7,88	7,63
velocidade específica (h^{-1})	0,51	0,25
Tempo de geração (h)	1,35	2,77
Tempo de processo (h)	18	24
consumo de açúcares (g/l)	0,77	0,51

Na Tabela 29 mostram-se os resultados obtidos em ambos testes, assim pôde-se observar, que houve alguma diferença em relação ao teor de açúcares totais e pH inicial, estas diferenças podem ser decorrentes dos diferentes lotes de matéria prima usados nestes ensaios. Assim também podemos observar um alto teor de açúcares totais finais ao final da fermentação, isto possivelmente devido aos carboidratos insolúveis do meio, que impossibilitaram a assimilação destes pelo microrganismos.

Observa-se também, que houve um maior consumo de açúcares com altas taxas de oxigênio dissolvido, 50 % OD fase de crescimento, assim como a aceleração do processo fermentativo. Em relação às contagens de esporos finais, observa-se que em ambas condições se obteve similares contagens $1,7$ e $1,9 \times 10^9$ esp/ml.

Observando-se deste modo resultados satisfatórios no desenvolvimento do processo de produção do complexo esporo-cristal pelo isolado de *Bacillus thuringiensis* SP-36, os resultados do desenvolvimento são mostrados na Tabela 30.

Tabela 30: Evolução da produção do complexo esporo-cristal pelo isolado *B.t.* SP-36 nas diversas etapas do processo de desenvolvimento e otimização

Condições fermentativas	Contagem de esporos 24h (esp/ml)
Meio basal / shaker (24 h) 30°C x 250 rpm e 3 % (ponto central) 30°C x 350 rpm e 5 % (otimizado)	3,5 x 10 ⁷ 1,37 x 10 ⁸
Meio formulado/ Shaker (30°C x 350 rpm e 5% inóculo) x 24 h Mel,3,5g/l; milhocina 7g/l; Lev,16g/l e K ₂ HPO ₄ 6,0 (g/l)	1,28 x 10 ⁸
Meio formulado / fermentador (30°C e 5% inóculo) 50% OD (18 h) 30% OD (24 h)	1,96 x 10 ⁹ 1,76 x 10 ⁹

5. CONCLUSÕES

1. O isolado SP-36 selecionado, classificado taxonomicamente como *Bacillus thuringiensis*, apresentou perfil eletroforético das proteínas do cristal diferenciado do padrão (*Bacillus thuringiensis* da subespécie israelensis IPS-82).

2. O perfil eletroforético das proteínas que compõem o cristal do isolado SP-36, apresentou bandas de 110, 68, 38 e 25 kDa.

3. O isolado SP-36 em ensaio com larvas de *Aedes aegypti*, apresentou atividade de 30.767 ITU/mg, valor praticamente duas vezes mais elevado que a linhagem padrão de *B.t.i.* IPS-82 nos testes de seleção. Esse valor atingiu 35.000 ITU/mg em meio basal com condições otimizadas.

4. A otimização das condições fermentativas com meio basal de fermentação mediante delineamento experimental 3^4 da metodologia de superfície de resposta, mostraram que a temperatura, agitação e % de inóculo afetaram significativamente as respostas contagem de esporos e grau de formação de cristal. Os resultados experimentais demonstraram uma máxima resposta de $1,37 \times 10^8$ de contagem de esporos com 30°C; 350 rpm; 5% de inóculo e 7,2 de pH inicial. Para meio basal agitado em agitador rotativo.

5. A seleção dos componentes do meio de cultura mediante a técnica de delineamentos fatoriais fracionários, assim como a otimização das concentrações mediante delineamento composto rotacional da metodologia de superfície de resposta 5^4 , permitiram obter contagem de $1,28 \times 10^8$ esporos/ml, e total lise das células em 24 horas. Em relação à atividade larvicida das diluições do caldo de cultura final CL_{50} com larvas de *Aedes aegypti* foi $1,26 \times 10^6$ com 24 horas.

6. As etapas de otimização realizadas em erlenmeyers, permitiram a condução de ensaios em fermentador piloto, com meio de cultura formulado com melaço 3,5 g/l, milho 7 g/l, água de levedura 16 g/l e fosfato de potássio 6,0 g/l, sob aeração, atingindo praticamente 2×10^9 esporos/ml em 24 horas.

7. O isolado SP-36 e os resultados da produção do complexo esporo/cristal bem como sua atividade, permitem recomendar sua avaliação para outros inseto-alvo, otimização de parâmetros específicos da fase piloto (produção em fed-batch) e avaliação em campo.

BIBLIOGRAFIA

01. ABDEL-HAMED, A.; CARLBERG, G.; EL-TAYEB, O.M. Studies on *Bacillus thuringiensis* H-14 strains isolated in Egypt-I. Screening for active strains. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, Oxford n.6, p.299-304, 1990a.
02. ABDEL-HAMED, A. CARLBERG, G.; EL-TAYEB, O.M. Studies on *Bacillus thuringiensis* H-14 strains isolated in Egypt-III. Selection of media for δ -endotoxin production. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, Oxford, n.6, p.313-17, 1990b.
03. ABDEL-HAMEED, A.; CARLBERG, G.; EL-TAYEB, O.M. Studies on *Bacillus thuringiensis* H-14 strains isolated in Egypt-IV- Characterization of fermentation conditions for δ -endotoxin production. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, Oxford, n. 7, v. 2, p. 231-6, 1991.
04. AGAISSE, H.; LERECLUS, D. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein?. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 177, n. 21, p. 6027-6032, 1995.
05. ALVES, L. F. A.; ALVES, S. B. Eficiência da farinha de crisálida e efeito da temperatura na produção de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO,4. 1994, Pelotas. ANAIS, Pelotas: Embrapa/CPACT,1994. p.161, 1994.
06. ALVES, S. B. ed. **Controle Microbiano de Insetos**, São Paulo: Manole, 1986. 310p.
07. ALY, C.; MULLA, M.; FEDERICI, B. A. Sporulation and toxin production by *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in cadavers of mosquito larvae (*diptera, culicidae*). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, n.46, p.251-258, 1985.

08. ANDRADE, C. F. S. **Ecologia de supressão de populações de culicídeos e simuliídeos**. Campinas, 1989. 253 p. Tese (Ciências biológicas)- Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
09. ANDREWS A. T. **Electrophoresis Theory Techniques and Biochemical and Clinical Applications**. Oxford: Clarenton press, 1988, 452p.
10. ARCAS, J.; YANTORNO, O; ERTOLA, R. Effect of high concentration of nutrients on *Bacillus thuringiensis* culture. **Biotechnology Letter**, London, v. 9, n.2, p.105-110, 1987.
11. AMERICAN MOSQUITO CONTROL ASSOCIATION - AMCA. Manual to mosquito rearing and experimental techniques, n. 5, Jan. 1970.
12. ARONSON, A.I.; BECKMAN, W.; DUNN, P. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. **Microbiological Reviews**, Washington, n.50, v.1, p.1-24, 1986.
13. ARONSON, I.; BECKMAN, W.; MINICH, S. Regulation of *Bacillus thuringiensis* prototoxin production. In: Ganesn, A.T., ed. **Genetic and Biotechnology of Bacilli**. Stanford: Academic Press, 1984, p.359-374.
14. ARONSON, A.I.; HAN, E.-S.; Mc GAUGHEY, W.; JHONSON, D. The solubility of inclusion proteins form *Bacillus thuringiensis* is depend upon protoxin composition and is a factor in toxicity to insects. **Applied and environmental Microbiology**, Washington, n.57, v.4, p.981-986, 1991.
15. AVIGNONE-ROSSA C.; ARCAS, J.; MIGNONE, C. *Bacillus thuringiensis* growth, sporulation and δ -endotoxin production in oxygen limited and non-limited cultures. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, Oxford, n.8, p.301-304, 1992.

16. AVIGNONE-ROSSA C.; YANTORNO, O.M.; ARCAS, J. A.; ERTOLA, R. J. Organic and inorganic nitrogen source ratio effects on *Bacillus thuringiensis var. israelensis* δ -endotoxin production. **World Journal Microbiology and Biotechnololy**, Oxford, v.6, p.27-3, 1990.
17. BARJAC, H. ; BONNEFOI, A. A classification of strains of *Bacillus thuringiensis* with a key to their diferentiation. **Journal of Invertebrate and Pathology**, San Diego, v.11, p.335-347, 1972.
18. BARJAC, H. de New facts and trends in bacteriological control of mosquitos. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 84, n. 3, p. 101-103, 1989.
19. BARJAC, H. de. Identification of H-serotypes of *Bacillus thuringiensis*. In: Burges, H.D, ed. **Microbial Control of Pest and Plants Diseases 1970-1980**. London: Academic Press, 1981, p. 35-43.
20. BARJAC, H.; FRACHON, E. Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. **Entomophaga**, Paris, n.35, v.2, p.223-240, 1990.
21. BARROS NETO, B.; SCARMINO, I.; BRUNS, R.E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas: ed. Unicamp,1995. 299p. (serie manuais).
22. BASF. Spore-free mutant of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis*. EP-278035; 17 aug 1988. XR:87-164180/24. Apud: Biotechnology Abstracts.
23. BECKER, N.; MARGALIT, J. Use of *Bacillus thuringiensis israelensis* against mosquitoes and blackflies. In: Entwistle, P. F.; Cory, J. S. ; Bailey, M.; Higgs, S. ,eds. ***Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice**. Chischester: John Willey & Sons, 1993, p. 255-267.

24. BEEGLE, C. C.; ROSE, R.I.; ZINIU, Y. Mass production of *Bacillus thuringiensis* and *B. sphaericus* for microbial control of insect pest. In: Maranosh, K., ed. **Biotechnology for biological control of pest and vectors**. Boca Raton: CRC press, 1991, p.195-216.
25. BENOIT, T. G.; WILSON, G.R.; BAUGH, C. L. Fermentation during growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* HD-1. **Letters in applied Microbiology**, Oxford, v. 10, p.15-18, 1990.
26. BERNHARD, K.; UTZ, T. Production of *Bacillus thuringiensis* insecticides for experimental and commercial uses. In: Entwistle, P. F.; Cory, J. S. ; Bailey, M.; Higgs, S., eds. ***Bacillus thuringiensis*, an enviromental biopesticide: theory and practice**. Chischester: John Willey & Sons, 1993, p. 255-267.
27. BIO-RAD. **Reagent and Gel Preparation for Laemmli SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis**. Bio-Rad Laboratories, Richmond: Bio-rad, 1990.
28. BOSH, D.; SCHIPPER, B.; VAN DER , K.; De MAAGD, R.; STIEKEMA, W. Recombinant *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with new properties: possibilities for resistance managment. **Bio/Technology**, New york, v.12, p. 915-18, 1994.
29. BOWMAN, L. & GEIGER, E. Optimization of fermentation conditions for alcohol production. **Biotechnology & Bioengineering**, New York, v. 26, p. 1492-97, 1983.
30. BOX, G. E. P. & BEHNKEN, D. W. Some new three level designs for the study of quantitative variables. **Technometrics**, Alexandria, v.2, p. 455-475, 1961.
31. BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G & HUNTER, J. S. **Statistics for experimenters, an introduction to design, data analysis, and model building**. New York: John Wiley & Son, 1978.
32. BOX, G.E.P. & DRAPER, N. R. **Empirical model-building and response surfaces**. New York: John Wiley & Sons , 1987. 669p.

33. BUCHANAN, R. E.; GIBBONS, N. E. **Bergey's manual of determinative bacteriology**, 8.ed. Baltimore: Willing & Wilking, 1974, 536p.
34. BULLA, L. A.; HOCH, J. A. Biology of *Bacilli*. In: Demain A. & Salomon, N. eds. **Biology of industrial microorganism**. Menlo Park: Cumming Publisher Co. , p.57-78, 1983.
35. BULLA, L. A.; BECHTEL, D.B.; KRAMER, K. J. SHETHNA, Y.I.; ARONSON, A.I.; FITZ-JAMES, P.C. Ultrastructure, Physiology, and Biochemistry of *Bacillus thuringiensis*. **CRC Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v.8, n.2, p.147-204, 1980.
36. BURGESS, H. D. Production, formulation, standarization and safety of microbial larvicides. In: MICHAEL F. Ed. **Basic Biology of Microbial Larvicides of Vectors of human diseases**. UNPD/ WORLD BANK/WHO, Geneva, 1983. p.83-91.
37. CAPALBO, D. & MORAES, I. O. Aspectos da produção de *Bacillus thuringiensis*. In: **Controle biológico de insetos**. Anais-2, Campinas: Fundação Cargill, 1987, p. 75-84.
38. CAPALBO, D.M.; MORAES, I. O.; SOBRINHO, M.; CONTI, H. Obtenção de bioinseticida a base de *Bacillus thuringiensis* em novos meios de cultura. **Pesticide R. Tec. Cient.**, curitiba, v.1, n.1, 1991.
39. CHARUNDANTAN, R. Experience in the use of EPA protocol for the registration of biopesticides. In: ANÁLISE DE RISCO E AVALIAÇÃO DO IMPACTO AMBIENTAL DECORRENTE DO USO DE AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO. 1994, Jaguariuna, Memorias do workshop, Jaguariuna: CNPMA/EMBRAPA, 1995, p.28-32.
40. CHILCOTT, C. N. & WIGLEY, P. J. Isolation and toxicity of *B. thuringiensis* from soil and insect, habitats in New Zealand. **Journal of invertebrate pathology**, v.61, p.244-47, 1993.

41. CHILCOTT, C. N. & WIGLEY, P. J. Technical note: an improvement method for differential strains of *Bacillus thuringiensis* crystals. **Letter in Applied Microbiology**, Oxford, v.7, p. 67-70, 1988.
42. CHILCOTT, C. N.; KNOWLES, B. H.; ELLAR, D. Mechanism of actions of *Bacillus thuringiensis israelensis* parasporal body. In: Barjac, H.; Sutherland, D. J.; eds. **Bacterial Control of Mosquitoes and blackflies-Biochemistry, Genetics & Applications of *Bacillus thuringiensis* and *B. sphaericus***. New Brunswick: Rutgers University Press, 1990, p. 45-65.
43. CHRISTEN, P.; RAIMBAULT, M. Optimization of culture medium for aroma production by *Ceratocystis fimbriata*. **Biotechnology Letter**, London, n.13, n.7, p.521-526, 1991.
44. COCHRAN, W.G. & COX, C. M. **Experimental design**. 2 ed. New York: John Wiley, 1957. 335p.
45. CONSOLI, R.; OLIVEIRA DE, R. L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**, Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1994, 225p.
46. COUCH, T. L.; ROSS, D.A. Production and utilization of *Bacillus thuringiensis*. **Biotechnology and Bioengineering**, New york, v. 22, p. 1297-1304, 1980.
47. COUCH, T. L.; IGNOFFO, C. M. Formulation of insect pathogens. In: BURGESS, H. D.; HUSSEY, N., eds. **Microbial control of pests and plants diseases**. London: Academic Press, cap. 34, p. 621-634, 1981.
48. COUTINHO, C. J. P.C. A. Uso de *Bacillus thuringiensis* no controle biológico de simuliídeos. In: 2 SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 2, 1990, Brasília, Resumos. Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, 1990, 168p.
49. DAVIS, K. Design of experiments for predictive microbial modeling. **Journal of Industrial Microbiology**, Boston, v. 12, p.295-300, 1993.

50. DE LUCCA A.; SIMONSON, J. *Bacillus thuringiensis* distribution in soils of the United States. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 27, p. 865-870, 1981.
51. DEBABOV, V.G.; AZIZBEKYAN, R.R.; STEPANOV, V.M.; CHESTUKHINA, G.G. Study of *B. thuringiensis*. Genetic and biochemical. In: **Genetics and Biotechnology of Bacilli**, Stanford: Ac. Press, 1984. p. 345-399.
52. DELÉCLUSE, A.; ROSSO, M-L.; RAGNI, A. Cloning and expression of a novel toxin gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan* encoding a highly mosquitocidal protein. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 12, p. 4230-4235, Dec, 1995.
53. DHARMSTHITI, S.; PANTUWATANA, S.; BHUMIRATANA, A. Production of *Bacillus thuringiensis* subs. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* 1593, on media using by-product from a monosodium glutamate factory. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 46, p. 231-238, 1985.
54. DIAS, J. M. C. S.; ROLLO, V.C.P.; HONDA, C. S. Avaliação da influência do preparo de água de levedura no crescimento e toxicidade de *Bacillus sphaericus*. FENABIO BIOLATINA, 1991, São Paulo, 1991.
55. DIAS, J. M. C. S. Produção e Utilização de Bioinseticidas Bacterianos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 57-76, 1992.
56. DIAS, J.M.C.S.; MONERAT, R. G.; SILVA-WERNECK, J.O. Utilização e formulação de bioinseticidas bacterianos. In: 2º Curso de Controle Microbiano de Insetos, Brasília: CENARGEN/EMBRAPA, 1994.
57. DOBROKHOTOV, B. Biological Control of Vectors. In: Tropical Disease Research: Progresses 1991- 1992 Eleventh Programme Report of the UNDP/WHO Special Program for Research and Training in Tropical Diseases (TDR), Geneva: UNDP/WHO/TDR, 1993, Cap. 10, p. 93-97.

58. DULMAGE, H. ; RHODES, R.A. Production of pathogens in artificial media. in: *Microbial Control of insects and Mites*. BURGESS, H.D.; HUSSEY, N., eds. London: Academic Press, 1971, p.507-540.
59. DULMAGE, H.; CORREA, J.; MARTINEZ. A. Coprecipitation with lactose as a mean of recovering the spore-crystal complex of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.15, p.15-20, 1970.
60. DULMAGE, H. T. Insecticidal activity of isolated of *Bacillus thuringiensis* and their potential for pest control. In: BURGESS, H. ed. **Microbial control of pest and plant disease**. London: Academic Press, London, 1981, p. 193-222.
61. DULMAGE, H. T. Production and use of *Bacillus thuringiensis* perspective from 1989. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 84, s.3, p.113-122, 1989.
62. DULMAGE, T.; YOUSTEN, A.; SINGER, S.; LACEY, L. A. Guidelines for production of *Bacillus thuringiensis* H-14 and *Bacillus sphaericus*. Geneva: UNPD/WORLD HEALTH ORGANIZATION/ WHO. Especial Programme for Research and Training in Tropical diseases (TDR), 1990, 75 p.
63. EJIFOR A. O.; OKAFOR, N. Formulation of flowable liquid concentrated of *Bti* spores and crystals mosquito larvicide. **Journal of Applied of Bacteriology**, Oxford, v.71, p. 202-7, 1991.
64. EJIFOR A. O.; OKAFOR, N. Production of mosquitocidal larvicidal *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 on raw material media from Nigeria. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford,
65. EMBRAPA. Atlas do meio ambiente do Brasil. Brasilia: Terra viva, 1994. 138p.

66. EMBRAPA. O que leva uma industria a produzir produtos biológicos. In: ANÁLISE DE RISCO E AVALIAÇÃO DO IMPACTO AMBIENTAL DECORRENTE DO USO DE AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO. 1994, Jaguariuna, Memorias do workshop, Jaguariuna: CNPMA/EMBRAPA, 1995.p.28-23.
67. EMBRAPA/CENARGEN. 2º Curso de Controle Microbiano de Insetos. Brasília, 1994.
68. EMBRAPA/CNPMA/IBAMA. Minuta da portaria de registro de agentes microbianos de controle de organismos nocivos, Jaguariuna: CNPMA/EMBRAPA,1995.
69. FALOCI, M. M.; YANTORNO, O. M.; MARINO, H.; ARCAS, J. ERTOLA, R. J. Effect of the media composition on the growth parameters and biological proprieties of *Bacillus thuringiensis var. israelensis* delta-endotoxin. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 6, p. 32-8, 1990.
70. FEDERICCI, B.; LUTHY, P.; IBARRA, J.E. Parasporal body of *Bacillus thuringiensis israelensis* Structure, protein composition and toxicity. In: Barjac, H.; Sutherland, D.J. ed. **Bacterial control of mosquitoes and blackflies-biochemistry, Genetics & Aplications of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus***. New brunswick: Rutgers University Press, 1990, p.16-44.
71. FEITELSON, J.; PAYNE, J.; KIM, L. *Bacillus thuringiensis*: Insect and Beyond.
Bio/Biotechnology
72. FODA, M. S.; SALAMA, H. S; SELIM, M. Factors affecting growth physiology of *Bacillus thuringiensis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. New York, v.22, n.1, p.50-52, 1985.
73. FRANCO, T. T.; CÉSARE-VIDAURRE, T.; PORTUGAL, P.P; SERRA, G.E. Purificação de proteínas com atividade larvicida de *Bacillus thuringiensis* por partição em sistemas de duas fases aquosas. In: XVIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, Santos, resumos, 1994

74. FRANKENHUYZEN, K. Van. The challenge of *Bacillus thuringiensis*. In: Entwistle, P. F.; Cory, J. S.; Bailey, M.; Higgs, S., eds. *Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: Theory and Practice*. Chichester: John Wiley & Sons, 1993, p.1-35.
75. FRIDLENDER, B.; KEREN-ZUR, M.; HOFSTEIN, R. The development of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* as biocontrol agents: From research to industrial production. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro v. 84, n.3, p.123-7, 1989.
76. GATTI, M. S.; YANO, D.; EGUCHI, S. Y.; UMINO, C.Y. *Bactérias: Técnicas microbiológicas no seu manuseio e caracterização*. Campinas: Fundação tropical de Pesquisas e tecnologia "Andre Tosello", 1992, 40p.
77. GIL, S. S.; COWLES, E.A.; PIETRANTONIO, P. V. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annal Review Entomology*, Palo alto, v. 37, p. 615-636, 1992.
78. GOLDBERG, L. J.; MARGALIT, J. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. *Mosquito News*, Lake Charles, v.37, p. 355-58, 1977.
79. GONZALES J. R., J. M.; BROWN, B. J.; CARLTON, B.C. Transfer of *Bacillus thuringiensis* plasmids coding for delta-endotoxin among of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. *Proceeding Natural Academic Science U.S.A.* Washington, v.79, p. 6951-55, 1982.
80. GUAYCURUS, T. V.; VAECK, M.; MENEZES, E. B.; FERREIRA, I.T.; RABINOVITCH, L. Isolamento de *Bacillus thuringiensis* (*B.t*) de solos brasileiros. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 84, n.3, 1989.
81. HABIB, M. E. Padronização de inseticidas microbianos. In: Alves, S., coord. *Controle microbiano de insetos*. São Paulo: Ed. Manole, cap 15, p. 289-296, 1986.

82. HABIB, M. E. Utilização de bactérias no controle de dípteros de importância médica. **Memorias Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.84, n.3, p.51-54, 1989.
83. HABIB, M.E.; ANDRADE, C. F. Bactérias entomopatogênicas. In: Alves, S., coord. **Controle microbiano de insetos**. São Paulo: Ed. Manole, cap 7, p. 127-170, 1986.
84. HADDAD, M. L. Análise de Próbits. In: Alves, S. Coord. **Controle Microbiano de Insetos**, São Paulo: Ed. Manole, p.374-383, 1986.
85. HARRINSON, D.E.F. Growth, Oxygen, and Respiration. **CRC-Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, p.185-228, jan.1973.
86. HERRNSTADT, C.; SOARES, G.; WILCOX, E. A new strain of *B. thuringiensis* with activity against coleopteros insect. **Bio-Technology**, New york, v. 4, p. 305-308, 1986
87. HOFTÉ, H.; WHITELEY, H. R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* **Microbiological Reviews**, Washington, v. 53, n.2, p. 242-255, 1989.
88. HURLEY, J. M.; BULLA, L.; ANDREW, R. Purification of the mosquitocidal and cytolytic proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington. v.53, n.6, p.1316-1321, 1987.
89. IGNATENKO, Y.N. Effects of temperature and aeration on growth and spore formation in *Bacillus thuringiensis*. **Microbiology**, New York, v. 52, n. 5, p.553-56, 1983.
90. INSTITUTE PASTEUR. Guidelines for the isolation of spore-forming bacteria possessing vector control potential. Annexes 3-5, 5th report of the scientific working group on biological control of vectors. Geneva, 1981. (document TDR/VEC-SWG(5)/81-3).
91. KAJI, A. D. **Taxonomia molecular de *Bacillus* entomopatogênicos**. Campinas, 1993, Tese (doutor em Ciências de alimentos). Faculdade de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

92. KARIN, M. I.; LUCAS, R.; OSBORNE, K. The effect of oxygen on the sporulation and toxicity of *Bacillus sphaericus*. 2362. **Biotechnology Letter**, London, v.15, n.1, p. 47-50, 1993.
93. KAWALEK, M. ; BEJAMIN, S.; LEE, H.; GILL, S. Isolation and identification of novel toxins from a new mosquitocidal isolate from malaysia, *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan*. **Applied and Enviromental Microbiology**, Washington, v. 61, n.8, p. 2965-69, 1995.
94. KENNEDY, M.; READER, S.L.; DAVIES, J. The kinetics of developing fermentation media. **Process Biochemistry**, Rickmansworth, v. 29, p. 529-534, 1994
95. KHAWALED, K.; COHEN, T.; ZARITSKY A. Digestion of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. spores by larvae of *Aedes aegypti*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.59, p.186-189, 1992.
96. KRONSTAD, J. SCHNEPF, H. E.; WHITELY, H. R. Diversity of locations for *Bacillus thuringiensis* crystal protein genes. **Journal of bacteriology**, Washington, v. 154, n.1, p.419-428, 1983.
97. KUPPUSSAMY, M.; BALARAM, K. Effect of corn-steep liquor culture medium N-source in *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* cell growth and cristal protein production. **Indian Journal Experimental Biology**, Jodhpur, v. 29, n.2, p.187-89, 1991.
98. LAEMMLI, U.K. Cleavage of estructural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 277, p. 680-685, 1970
99. LAHKIM-TSROR, L; PASCAR-GUZMAN, C.; MARGALIT, L.; BARAK, Z. Larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, serovar H-14 in *Aedes aegypti*: histopathological studies. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.41, p.104-116, 1983.
100. LAMBERT, B.; PEFEROEN, M. Insecticide promise of *Bacillus thuringiensis*. **Bioscience**, Washington, v. 42, n. 2, p.112-121, 1992

101. LECADET, M.-M. Comunicação pessoal, *Institute Pasteur*, Paris, França (dez, 1995).
102. LECADET, M.-M. *Bacillus thuringiensis* toxins the proteinoceous crystal. In: Montie, T. C.; Kadis, S. ed. **Microbial Toxins**. New york: Academic Press, 3: 437-471, 1970.
103. LERECLUS, D.; AGAISSE, H.; GOMINET, M.; CHAUFAX, J. Overproduction of encapsulated insecticidal crystal protein in a *Bacillus thuringiensis SpoOA* Mutant. **Bio/Technology**, New york, v.13, p. 67-71, 1995.
104. LERECLUS, D.; DELÉCLEUSE, A.; LECATED, M. M. Diversity of *Bacillus thuringiensis* Toxins and Genes. In: Entwistle, P. F.; Cory, J. S.; Bailey, M. J.; Higgs, S.; Ed. **Bacillus thuringiensis, an Environmental Biopesticide: Theory and Practice**. Chischester: John Willey & Sons, 1993, p. 37-69.
105. LIU, C.; LIAO, C. Medium optimization for L- phenilalanine production by a tryptophan auxotroph of *corynebactrim glutamicum*. **Biotechnology Letters**, London, v. 16, n.8, p.801-806, 1994.
106. LOPEZ, J. B.; SILVA, S.F.; BONFIN, K.; GIUSTI, J.; DIAS, J.M.C.S. Comparação entre três metodologias para isolamentos de bacilos entomopatôgenicos. Congresso Brasileiro de Microbiologia, XVII, Santos, 1993
107. MANOMANI, A. M.; BALARAM, K. Dynamic of biomass production, sporulation & toxin synthesis in *Bacillus thuringiensis* H-14, strains. **Indian Journal of Medical Research**. New Delhi, v. 86, p.597-600, 1987.
108. MARGALIT, J.; DEAN, O. The story of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (B.t.i). **Journal American Mosquito Control Association**, Lake charles, v. 1, n.1, p.1-6, 1985.
109. MARRONE, P.; MACINTOSH, S. C. Resistance to *Bacillus thuringiensis* and resistance management. In: Entwistle, P. F.; Cory, J. S. ; Bailey, M.; Higgs, S. Ed. **Bacillus**

thuringiensis, an environmental biopesticide: theory and practice. Chischester: John Willey & Sons, 1993, p.221-235.

110. MARTIN, P. A.; TRAVERS, R. S. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. **Applied Enviromental Microbiology**, Washington, p. 2437-2442, oct, 1989.
111. MARTIN, P. A. W.; HARANSKY, E. B. ; TRAVERS, R. S.; REICHELDERFER, C.F. Rapid bioquematical testing of large numbers of *Bacillus thuringiensis* isolates using Agars dots. **BIO/TECHNIQUES**, v.3, n.5. 1985.
112. MARTINEZ, P., CHRISTEN, P., FARRES, A. Medium optimization by fractional factorial design for lipase production by *Rhizopus delemar*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v.76, n.2, p.94-97, 1993.
113. McGAUGHEY, W. H. Insect Resistence to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. **Science**, Washington, v. 229, p.193-194, 1985.
114. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Dengue: distribuição de casos notificados por ano e por unidade federada, Brasil 1982-1984. São Paulo: MS/FNS/DEOPE/CCDTV, nov, 1995.
115. MORAES, I. O. **Ensaio de fermentação submersa para produção de um inseticida bacteriano em minifermentador**. Campinas, 1976, 94p. Tese (Doutor em Eng. de Alimentos). Faculdade de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
116. MORAES, I. O. **Produção, separação e bioensaio da exotoxina termoestável de *Bacillus thuringiensis* obtida por fermentação submersa**. Campinas, 1980, Tese (livre docência) Faculdade de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
117. MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. Produção de bactérias entomopatogênicas. In: Alves, S. B. coord. **Controle microbiano de insetos**. São Paulo: Ed. Manole, Cap. 16, p. 297-310, 1986.

118. MORAES, I. O.; CAPALBO, D.M.F.; MORAES, R. D. Bacterial insecticide production by *Bacillus thuringiensis*, **Food Biotechnology**, New York v. 4, n.1, p.282, 1990.
119. MORAES, I. O.; SANTANA, M.H. A.; HOKKA, C.O. The influence of oxygen concentration on microbial insecticide production. In: **Advances in Biotechnology**, London: Pergamon press. v.1; p.75-79, 1980.
120. MORESI, M.; SEBASTIANI, E. Optimization of whey fermentation in a shaken-flask fermenter. **European Journal of Applied Biotechnology**, Berlin, v. 63, p. 63-71, 1979.
121. MULLA, M. S. Activity, field efficiency and use of *Bacillus thuringiensis israelensis* against mosquitoes. In: Barjac, H.; Sutherland, D. J., eds. **Bacterial control of mosquitoes and black flies- biochemistry, genetics & applications of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus***. New Brunswick: Rutgers University Press, 1990.
122. MYCOGEN. Use of a gene product of a *Bacillus thuringiensis* strain. EP-352052; 24 jan. 1990. Apud : **Biotechnology Abstracts**, Derwet, 1995.
123. NICKERSON, K. W. & BULLA, JR. L. Physiology of sporeforming bacteria associated with insects: minimal nutritional requirements for growth, sporulation and parasporal crystal formation of *Bt*. **Applied Microbiology**, Washington, v. 28, n. 1, p.124-128. 1974.
124. NICKERSON, K.W. Structure and function of the *Bacillus thuringiensis* protien crystal. **Biotechnology and Bioengineering**, Washington, v. 22, p.1305-1333, 1980.
125. NICOLAS, L. Bacteriological control of mosquitoes and blackflies. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasilia, v. 27, p. 47-46, 1992.
126. NORRIS, J. R. The protein cristal toxin of *Bacillus thuringiensis*: biosynthesis and physical structure. In: Burges, H. D. ed. **Microbial control of insects and mites**. London: Ac. Press, p.229-273,1973.

127. OBETA, J.; OKAFOR, N. Medium for the production of primary powder of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 47, n.4, p. 863-867, 1984
128. OHANA, B.; MARGALIT, J.; BARAK, Z. A method for identifying colonies of bacterias possessing mosquito larvicidal effects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 21, p. 250-251, 1985.
129. OHBA, M.; AIZAWA, K. Insect toxicity of *Bacillus thuringiensis* isolated from soil of Japan. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 47, p.12-20, 1986.
130. ORDUZ, S.; ROJAS, W. CORREA, M. BARJAC, H. A new serotype of *Bacillus thuringiensis* from Colombia toxic to mosquito larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 59, p. 99-103, 1992.
131. OSADCHAYA, A. I.; PROKOPCHENKO, S.F.; MIKHNOVSKAYA, N.D. Effect of certain mineral salts on the growth and development of *B. thuringiensis* H-14. **Mikrobiol. Zhurnal**, Kiev, v. 51, n.5, p. 26-28, 1989. Apud: **Biotechnology Abstracts**, 1995.
132. PANTUWATANA, S.; SITABONGKOT, J. Comparison of development of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* in mosquito larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 55, p.189-201,1990.
133. PEARSON, D.; WARD, O. P. Effects of culture conditions on growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis israelensis* and development of media for production of the protein crystal toxin. **Biotechnology Letter**, London, v.10, n. 7, p.451-456, 1988.
134. PEARSON, D.; WARD, O. P. Purification of the parasporal crystal of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* and development of a novel bioassay technique. **Biotechnology Letter**, London, v. 9, n.11, p.771-776. 1987.

135. PEARSON, D.; WARD, O. P. Bioinsecticide activity, bacterial cell lysis and proteolytic activity in cultures of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 65, p.195-202, 1985.
136. PORTUGAL, E. P.; PONEZI, A.; ANARUMA, M.C.; ARAUJO, S.C.; SERRA, G.E. Produção comercial de Bti para uso como inseticida. FENABIO BIOLATINA, II, 1991, São Paulo.
137. PORTUGAL, E. P. Comunicação pessoal, CPQBA/UNICAMP, 1993.
138. PHILIPPE, R. Lutte microbiologique contre les insects ravageurs. **Plantations, Recherche, développement**, Montpellier, mai-juin: 45-50, 1995.
139. PORTER A.; DAVIDSON, E.; LI, W, J. Mosquitocidal toxins of *Bacilli* and their genetic manipulation for effective biological control of mosquitoes. **Microbiological Review**, Washington, v. 67, n. 4, p. 838-61, 1993.
140. PRIEST, F.G.; YOUSTEN, A. **Entomopathogenic Bacteria for Biological Control**. Workshop Manual, Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello", 1991.
141. PRIEST, F. G. Biological control of mosquitoes and other biting flies by *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis*. **Journal Applied Bacteriology**, Oxford , v. 72, p.357-369, 1992.
142. RABINOVITCH, L. FUCHS DE JESUS, F.; CAVADOS, C.F.; ZAHNER, V.; SILVA, M.H.; COSMAO, D.; FRANCHON, E.; LECADET, M. M. *Bacillus thuringiensis* subsp. *oswaldocruzi* and subsp. *brasiliensis*. Two novel brazilian strains which determinate new serotype H-38 and H-39, respectively. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 90, n.1, p. 41-42, 1995.
143. RAWLINS, S. C. Biological control of insects pest affecting man and animals in the tropics. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 16, n.4, p. 235-251, 1989.
144. RIGBY, S. **B. t. in crop protection**. Surrey: PJB Publications. , 1991, 145p.

145. RODGERS, P. B. Potential of biopesticides in agriculture. **Pesticide Science**, Essex, v. 39, n. 2, p.117-130, 1993.
146. RUAS NETO, A.; SILVEIRA, S. Uso de inseticidas bacteriano para o controle de culicídeos e simúlídeos no Rio Grande de Sul. **Memorias do Instituto Oswaldo cruz**, Rio de Janeiro, v. 84, n. 3, p. 39-45, 1989.
147. RUAS NETO, A. L.; CALDAS, E. P.; SOUZA, M. Programa estadual de controle de borrachudos: controle de simúlídeos no Rio Grande Sul. Aspectos gerais. **Boletim de Saúde**, Porto Alegre, v.11, n. 2, P.4-7, 1984.
148. SAAR, J.H.; SILVA, N. J.; PEREIRA, J. B. ; RABINOVITCH, L. Protein profile and larvicidal activity of entomopathogenic *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* isolated in Brazil. In: 4° SINCOBIOL-SIMPOSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO. ANAIS. Gramado: EMBRAPA/CPACT, 1994, 358p.
149. SAKHAROVA, Z. V.; IGNATENKO, Y.N.; KHOVRYCHEV, M.P. Sporulation and cristal formation in *Bacillus thuringiensis* during limitation of its growth with nutrient sources. **Microbiology**, New York, v. 53, n. 2, p. 279-84, 1984.
150. SALAMA, H. S.; MORRIS, O. N. The use of *Bacillus thuringiensis* in development countries. In: Entwistle, P. F.; Cory, J. S. ; Bailey, M.; Higgs, S., Eds. ***Bacillus thuringiensis, an enviromental biopesticide: theory and practice***. Chischester : John Willey & Sons, 1993, p.237-253.
151. SALAMA, H. S.; FODA, M.S.; DULMAGE, H.T. ; EL-SHARABY, A. A novel fermentation media of production of δ -endotoxins from *Bacillus thuringiensis*. **Journal Invertebrate Pathology**, San Diego, v.41, p.8-19, 1983.

152. SANCHES, E.G.; SANTOS, E. S. PINHEIROS, E.S. Desenvolvimento de formulações para meios alternativos de fermentação para biomassas entomogênicos. In: SIMPOSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 4, 1994, ANAIS. Gramado: EMBRAPA/CPACT, 1994, 358p.
153. SANTANA, M. H. A. **Estudo de aeração e agitação na fermentação com o *Bacillus thuringiensis***. Campinas, 1980, 73p. Tese (mestre em Eng. alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
154. SARRA, M.; REDIN, I.; OCHIN, F. Application of factorial design to the optimization of medium composition in bath cultures of *Streptomyces lividans* TK21 producing a hybrid antibiotic. **Biotechnology Letter**, London, v. 15, n. 6, p. 559-564, 1993.
155. SCHERRER, P.; LUTHY, P. Production of delta-endotoxin by *B. thuringiensis* as a function of glucose concentrations. **Applied Microbiology**, Washington, v. 25, n. 4, p.644-666, 1973.
156. SCHROEDER, J. M.; CHAMBERLAIN, C.; DAVIDSON, E. W. Resistance to the *Bacillus sphaericus* toxin in cultured mosquito cells. **In vitro cellular and developmental biology**, Columbia, v. 25, p. 887-891, 1989.
157. SIKDAR, D.P.; MAJUNDAR, M. K. Effects of minerals on production of the delta endotoxin by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Biotechnology Letter**, London, v. 13, n.7, p.511-514, 1991.
158. SILVA, M. H.L.; MAGALHÃES, M. S. ; SANCHES, E.G; SANTOS, B. S.; LAMOUNIER, M.A. CONSOLI, R. A.G.B.; RABINOVITCH, L. Desenvolvimento de processo para produção Industrial de bioinseticida a base de B.t.i. FEIRA E CONGRESSO LATINOAMERICANO DE BIOTECNOLOGIA (FENABIO), 2, 1991, resumos, 1991, Sao Paulo.
159. SMITH, R. A. Effect of strain and medium variation on mosquito toxin production by *Bacillus thuringiensis israelensis*. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v. 28, p. 1089-1092, 1982.

160. STATISTICAL ANALYSES SYSTEM. SAS user's Guide; Statistics. 5 ed., Cary, ed., 1985. 956p.
161. SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS - SUCEN. Avaliação do programa de controle de malária no estado de São Paulo, 1992-1994, São Paulo, 1995, 54p.
162. SUTHERLAND, D.; KHOO, B. The biopesticides *Bacillus thuringiensis israelensis* and *Bacillus sphaericus* in the control of mosquitoes. **Development Industrial Microbiology**, Amsterdam, v. 28, p. 55-60, 1987.
163. TABASHNIK, B.E.; CUSHING, N. L.; FINSON, N. ; JHONSON, M. Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: *Plutellidae*). **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 83, n.5, p.1671-76, 1990.
164. THOMAS, W.; ELLAR, J. *Bacillus thuringiensis israelensis* crystal-endotoxin: effects on insect and mammalian cell *in vitro* and *in vivo*. **Journal Cell Science**, Essex, v. 60, p. 181-197, 1983.
165. TRAVERS, R. ; MARTIN, P.; REICHEDELDER, C. Selective processes for efficient isolation of soil *Bacillus spp.* **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 53, n.6, p.1263-1266, 1987.
166. TYRELL, D. E.; BULLA JR., L. A. Comparative biochemistry of entomocidal parasporal crystals of selected *Bacillus thuringiensis* strains. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 145 n. 2, p.1052-1062, 1981.
167. VAN BRUNT, J. Fermentation Economics. **Bio/Technology**, v.4, n.5, p. 395-401, may, 1986.
168. VANDEKAR, M. ; DULMAGE, H.T. Guidelines for production of *Bacillus thuringiensis* H-14. Geneva: UNDP/WORL BANK/WHO, 1982, 123p.

169. VILARINHOS, P.; DIAS, J.M.C.S. SCHENKEL, M. R.G. HONDA, C.S. Utilização de água de levedura como substrato para o cultivo de *Bacillus sphaericus*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v.8, s.3, p.159, 1989.
170. WAKISAKA, Y.; MASAKI, E.; NISHIMOTO, Y. Formation of crystalline δ -endotoxins or poly- β -hidroxybutiric acid granules by asporogenous mutants of *B. thuringiensis*. **Applied and environmental microbiology**, v.43, n.6, p. 1473- 1480, Jun. 1982.
171. WINKLER, M. Optimization and Time-profiling in fermentation process. In: **Progress in Industrial Microbiology**, v. 25, Bushell, M.E. ed. Amsterdam: Elseiver, p.91-150, 1988.
172. WINKLER, M. Limitations of fermentations process for utilization of food wastes. In: **Topics in Enzymes & Fermentation Biotechnology**. Wiseman A. Ed., Chischester: Ellis Horwood Ltd, v. 7, p.271-306, 1983.
173. WISTLER, W. Phenol-sulfuric method for sugar determination. **Carbohydrate Chemistry**, (s.l.), v.1, p.388, 1962.
174. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Report on an informal consultation on development of entomopathogens for vector control: Current Status and future prospects. WHO Report TDR/BCV/93.1., Geneva : UNDP/WORLD BANK/WHO, 1992, 18p.
175. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Tropical Disease report: Progress 1991-1992., Geneva : UNDP/WORLD BANK/WHO, 1993, 134 p.
176. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Bioassay protocol for Bt H-14., In Annex 5 WHO Technical Report Series TDR/VEC-SW G(5)/87.3.UNPD/ World Bank, Geneva,1987.
177. WOSIACKI, G. ; SICHIERI, V.L.; CEREDA, M.P. ; SILVA, R.S.; BRUNS, R. Improvment submerged fermentation condition for *Tricosporum sp.* **Arquivos de Biologia e Tecnologia** , Curitiba, v.38, n. 2, jun., 1995.

178. YAMAMOTO, T.; IUZUKA, T.; ARONSON, J.N. Mosquitocidal protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*: identification and partial isolation of the protein. **Current Microbiology**, New York, v. 9, p. 279-284, 1983.
179. YOSTEN, A. A.; ROGOFF, M. H. Metabolism of *Bacillus thuringiensis* in relation of spore formation. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 100, p.1229-66, 1969.
180. ZAHNER, V.; CAVADOS, C. F.; RABINOVITCH, L.; SANTOS, B.S.; LAMOUNIER, M.A.; CONSOLI, R.A.G. Novas amostras de bacilos cristalogênicos isolados de solos brasileiros. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 2, ANAIS, Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, 1990.
181. ZAHNER, V.; CAVADOS, C. F.; CHAVES, J.; RABINOVITCH, L. Ocorrência de Cepas auto-aglutinantes de *Bacillus thuringiensis* (B.t.) isoladas de diferentes fontes. In: 4º SINCOBIOL-SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 4, 1994, ANAIS. Gramado: EMBRAPA/CPACT, 1994, 358p.

APÊNDICE

ABREVIATURAS E NOMENCLATURA

μ	velocidade específica
μm	micrón (10^{-6} metro)
Abs	absorbância a 650 nm
<i>B.t.</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>B.t.i.</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i>
<i>B.t.k.</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>
<i>B.t.m.</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>morrisoni</i>
<i>B.t.t.</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>tenebrionis</i>
bar	0.98692 atmosfera
bp	pares de bases
bx	graus brix
CL ₅₀	concentração média letal que produz 50% de mortalidade na população alvo
cm	centímetro
CV	coeficiente de variação
DDT	dicloro difenil tricloroetano
esp/ml	esporos por ml
g	grama
g/l	gramas/litro
GFC	grau de formação do cristal
h	hora
ITU	Unidade Tóxica internacional
kb	10^3 pares de bases
kDa	10^3 Dalton
l	litro
Log	log (base 10)
M	concentração Molar
m/m	massa/massa
mesh	número de fios por polegada linear
mg	miligrama (10^{-3} g)
min	minuto
ml	mililitro (10^{-3} litro)
mM	milimol (10^{-3} mol)
nm	nanómetros
OD	oxigênio dissolvido
P	Probabilidade de acontecer um evento
p/v	peso/volume
PAGE	Gel de Poliacrilamida (<i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
pH	- log da concentração de H^+
R ²	coeficiente de determinação ou Variância explicada
rpm	revoluções por minuto
SDFA	Separação por Duas Fases Aquosas
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio (<i>sodium dodecil sulphate</i>)

Tris	Tris (hidroximetil) aminoetano
ufc/ml	unidades formadoras de colônias por ml
vvm	volume de ar / volume de meio/ minuto

COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS

A composição dos meios de cultura utilizados nos testes de identificação (Tabela 3) e caracterização de *Bacillus* estão descritos a seguir:

1. Ágar nutriente:	g/l
Peptona	5
extrato de carne	3
ágar	15

2. Meio de fermentação:	g/l
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1,0
KCl	0,2
MgSO ₄	0,2
extrato de levedura	0,2
ágar	15

O pH foi ajustado a 7,0. Após a esterilização, foi adicionado 15 ml de púrpura de bromocresol 0,04 % os açúcares teste na concentração final de 0,5 %.

3. Meio modificado:	g/l
Triptona	10,0
extrato de levedura	1,0
glicose	10,0
púrpura bromocresol	0,04
ágar	20,0

4. Caldo de glicose:	g/l
Peptona	5
K ₂ HPO ₄	5
glicose	5
Ajuste de pH	7,0

5. Meio de Citrato de <i>simmons</i> :	g/l
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,2
(NH ₄) ₂ H ₂ PO ₄	1,0
NaCl	5,0
K ₂ HPO ₄	1,0
Citrato de sódio	2,0
ágar	15,0
azul de bromotimol	0,08

6. <i>Christensen</i> :		g/l
	Peptona	1,0
	NaCl	5,0
	K ₂ HPO ₄	2,0
	glicose	1,0
	uréia	20,0
	vermelho de fenol	0,012
	ágar	15,0

erratas

Na página 69, na tabela 14, 3^ª linha, onde se lê: 7,8429; leia-se: 7,084.

Na página 77, no último parágrafo, 1ª linha, onde se lê: grau de formação do, leia-se: grau de formação do cristal.

Na página 103; no 1er parágrafo, onde se lê: figura 9; leia-se: figura 14.