

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO SUBMERSA PARA
PRODUÇÃO DE UM INSETICIDA BACTERIANO
EM MINI FERMENTADOR

IRACEMA DE OLIVEIRA MORAES
Engenheira de Alimentos

Orientador

Dr. Chin Shu Chen

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

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Aos meus pais;

Ao meu esposo e filhos, de cujo
estímulo, apoio e compreensão ,
este trabalho é fruto.

ÍNDICE

Página

RESUMO

SUMMARY

CAP. I - INTRODUÇÃO

1

CAP. II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4

2.1. Controle microbiano

4

2.2. Bacillus thuringiensis

5

2.2.1. Produção comercial

6

2.2.1.1. Meio de cultura

7

2.2.1.2. Condições de fermentação

9

2.2.1.3. Toxinas

9

2.2.1.4. Recuperação do produto

10

2.2.1.5. Normalização do produto

11

2.2.1.6. Emprego do inseticida bacteriano

16

2.2.1.7. Aspectos econômicos

22

CAP. III - MATERIAL E MÉTODOS

25

3.1. Microrganismo

25

3.2. Meios de cultura

25

3.2.1. Manutenção da cultura

25

3.2.2. Fermentação submersa

26

3.2.3. Fermentação

26

3.3. Equipamentos

30

3.3.1. Frascos agitados

30

3.3.2. Mini fermentador

30

3.4. Equipamentos complementares

30

3.5. Processo fermentativo

31

3.6. Técnicas de Análise

32

3.7. Ensaio biológico

33

	Página
CAP.IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1. Consumo de glicose	35
4.2. Comportamento do pH	36
4.3. Concentração celular	37
4.4. Determinação do ácido dipicolínico(DPA)	38
4.5. Influência da aeração	39
4.6. Determinação de proteína	40
4.7. Microscopia	40
4.8. Bioteste	40
4.9. Destaques	41
4.10. Índice de Quadros, Figuras, Fotos e Anexos	45
CAP.V - CONCLUSÕES	72
CAP.VI - LITERATURA CONSULTADA	73
AGRADECIMENTOS	95

RESUMO

Foi estudada a produção de Inseticida Bacteriano (complexo esporo-cristal protéico), por fermentação submersa, usando Bacillus thuringiensis em substratos economicamente viáveis e em disponibilidade em nosso País.

Os estudos iniciais foram realizados em agitador rotatório com temperatura controlada ($30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), usando-se frascos de 500 ml com 100 ml de meio de cultura, agitados a 200 rpm.

Melaço em pó e água de maceração de milho foram os substratos testados, sendo que em agitador o rendimento em biomassa foi crescente com o teor de água de maceração de milho no intervalo de 20 g/l a 100 g/l (para 100g/l de água de maceração de milho, obteve-se 5,35 g/l de biomassa seca); no Mini Fermentador a 420 rpm, $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e 0,8 VVM o maior rendimento (5,35 g/l) se obteve para o meio de cultura com 10 g/l de melaço e 25 g/l de água de maceração de milho.

Durante a fermentação foi registrada a variação de pH, e estudada a cinética de consumo de açúcar (como glicose).

Para padronização do produto, este foi separado do mosto fermentado, suspenso em inertes e seco. Foi analisado quanto ao teor de ácido dipicolínico para estimar o número de esporos viáveis. Para verificar a eficiência em controle de Lepidoptera - Pieridae foi aplicado bioensaio em Ascia monuste orseis (Latreille 1819), com excelente resultado.

SUMMARY

The production of bacterial insecticide (spore - crystal complex) was studied by submerged fermentation, employing Bacillus thuringiensis in substrates viable economically and available in our country.

Initial experiments were carried out in a rotary shaker at controlled temperature ($30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) using 500ml flasks containing 100 ml of culture medium and shaken at 200 rpm.

Powdered molasses and corn steep liquor were the substrates employed, the yield of biomass showing an increase when increasing the amounts of corn steep liquor from 20 g/l to 100 g/l. With 100 g/l of the liquor 5,35 g/l of dry biomass was obtained. In a Mini Fermentor at 420 rpm, $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ and 0,8 VVM maximum yield (5,33 g/l) was obtained when using culture medium with 10 g/l of molasses and 25 g/l of corn steep liquor.

Variations of pH were noted during the fermentation and kinetics of sugar consumption (as glucose) were studied.

To standardize the product, it was separated from the fermented medium, suspended in a solid carrier and dried. The product was analysed for its content of dipicolinic acid to estimate the viable spore number. In order to verify the efficiency in Lepidoptera - Pieridae control, the bioassay using Ascia monuste orseis (Latreille 1819) was employed with excellent results.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

Pesquisas recentes no campo da entomologia têm evidenciado que os insetos, por um processo de seleção genética estão desenvolvendo espécies resistentes aos inseticidas químicos. A perspectiva de uma redução geral e permanente da resistência ambiental se torna sombria e cada vez mais tangível a cada ano que passa, visto que a quantidade, a variedade e a capacidade de destruição dos inseticidas químicos vão se tornando cada vez maiores. Com o transcurso do tempo podemos esperar surtos mais frequentes de insetos, tanto das espécies transmissoras de doenças como das destruidoras de plantações, colheitas e produtos armazenados.

Existe atualmente uma série de alternativas em relação ao controle químico dos insetos. Algumas destas já estão em uso com excelentes resultados, enquanto que outras estão em estágio de teste de laboratório e campo. O denominador comum dessas alternativas é o fato de constituírem soluções biológicas ao problema, buscadas por vários pesquisadores: entomologistas, patologistas, geneticistas, fisiologistas, zoologistas, ecologistas, bioquímicos e bioengenheiros, cujas contribuições estão proporcionando a evolução da ciência de controles bióticos.

No transcurso dos últimos decênios do século passado e na primeira metade deste, surgiu e foi tomando forma a ideia do controle microbiano dos insetos.

Neste campo merece destaque o inseticida obtido por fermentação com Bacillus thuringiensis, cujo desenvolvimento tem se intensificado notadamente pelo fato de ser i -

sento de resíduos tóxicos, permitindo a aplicação para controle de insetos, tanto em produtos de origem vegetal até a colheita, como em produtos alimentícios armazenados (grãos, farinhas, farelos, doces e frutos secos, etc).

Atualmente está sendo produzido comercialmente em alguns países incluindo Estados Unidos, Alemanha, França, Checoslováquia e Rússia. Centenas de testes de campo tem sido realizados em várias espécies de Lepidoptera, Diptera e Hymenoptera com resultados promissores.

Conforme Cirne Lima, L.F., ex-ministro da Agricultura (1972), do Brasil, os resíduos decorrentes do excesso, inadequação ou impropriedade no uso de pesticidas, devem ser uma constante preocupação das autoridades, pelos riscos que oferecem ao homem na sua alimentação ou pela poluição do eco-sistema.

Um programa de controle integrado, minimizando o emprego de agentes poluidores deve ser desenvolvido com perfeito entrosamento dos meios químico-biológicos.

1.1. OBJETIVO

Neste trabalho foram estudadas as condições para a produção piloto de um inseticida microbiano, por fermentação submersa, em meio de cultura utilizando subprodutos industriais, como matéria prima.

Melaço, Água de maceração de milho e Uréia foram testados como fonte de Nitrogênio e Carbono.

O microrganismo utilizado foi o Bacillus thuringiensis NCIB 9207 que satisfaz os critérios estabelecidos para

um inseticida biológico:

- a) Especificidade, potência e eficácia para os insetos visados.
- b) Inocuidade ao homem, vertebrados e insetos benéficos.
- c) Possibilidade de produção econômica em larga escala.

Pela especificidade advém a manutenção do equilíbrio ecológico, a inocuidade elimina o problema de resíduos, não tendo havido constatação de qualquer forma de resistência em insetos tratados com este tipo de inseticida. Além disto podem ser estabelecidos sistemas de controle integrado deste com inseticidas químicos, dada sua compatibilidade.

A primeira fase deste trabalho visou a produção do inseticida bacteriano em escala de laboratório, os resultados encontrados foram transferidos para escala piloto, tendo se estudado um balanço de substratos economicamente viáveis e em disponibilidade durante todo o ano em nosso país, contribuindo desta forma para o desenvolvimento da Bioengenharia em âmbito nacional.

CAPÍTULO II

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Controle microbiano de insetos

O interesse pela produção em larga escala de microrganismos entomopatógenos, desenvolvendo produtos para controle microbiano de insetos, teve seu início nos Estados Unidos da América, nos meados da década de 50.

O grande impulso a esse desenvolvimento foi o estabelecimento em 1945, de um laboratório de Controle Biológico, na Universidade da Califórnia, pelo Dr. Edward A. Steinhäus (Entomopatologista, recentemente falecido), com o específico fim de estudar moléstias de insetos (4).

A pesquisa foi iniciada pela observação de que se podia desencadear epizootias a espécies de insetos suscetíveis, a velocidades comparáveis àquelas dos inseticidas químicos, sem causar danos a espécies benéficas, nem deixar resíduos prejudiciais, surgindo assim a era do controle microbiano (66,149).

Há um grande número de bactérias entomopatógenas obrigatórias e/ou facultativas que se reproduzem "in vivo", acarretando moléstias aos insetos suscetíveis.

Há ainda aquelas entomopatógenas potenciais cultiváveis em meio de cultura artificial, "in vitro", e que se multiplicam no trato intestinal do inseto, ao terem acesso a ele. Algumas dessas bactérias apresentam condições para produção e uso, como inseticidas microbianos (4,9,10, 68, 69, 85, 105, 119, 144, 149).

Entre cerca de 90 espécies de bactérias entomógenas (85) aquelas esporuladas são as que atuam mais eficientemente

como entomopatógenas.

Para produção de inseticida "in vivo", bactérias, do grupo do Bacillus popilliae foram introduzidas nos Estados Unidos a fim de controlar o besouro japonês Popillia japonica, praga alienígena introduzida em 1916, que se desenvolveu em proporção catastrófica, antes da segunda guerra mundial devastando gramíneas, especialmente. Um programa de controle norte americano envolveu a distribuição de 109 toneladas de esporo (em pó) de Bacillus popilliae e Bacillus lentimorbus entre 1939-1953 reduzindo permanentemente a população do besouro japonês ao nível mínimo de infestação; após este programa o Bacillus continuou sendo disseminado através da germinação dos esporos "in vivo", não se tornando necessária nova introdução do mesmo (28, 33, 76).

O problema inicialmente representado por essa espécie de bactéria, foi o de que sua esporulação não se conseguia em meio artificial, mas apenas "in vivo" produzindo esporos e ocasionando a moléstia leitosa (76, 27, 28) no inseto-hospedeiro, obtendo-se nos primeiros anos um lento controle. Posteriormente, a larva infectada ao morrer, realizava a inoculação do microrganismo ao solo, enquanto que outros agentes carregavam os esporos (vento, água, predadores insetívoros) auxiliando na disseminação do mesmo e acelerando o controle microbiano (28, 33, 118).

2.2. Bacillus thuringiensis

Bacillus thuringiensis é uma bactéria mesófila (28° a 35°C), aeróbia (ou anaeróbia facultativa), e foi isolada em 1902 por Ishiwata no Japão e posteriormente na Alemanha por Berliner em 1915 (18, 28, 42, 118, 121, 145) em Anagasta künniella (lagarta de grãos de trigo).

A existência de um corpo para-esporal nas células esporuladas de B. thuringiensis foi notada já em 1915 por Berliner e em 1927 por Mattes, porém mereceu pouca atenção dado o estágio de conhecimento deste entomopatógeno(123). Foi somente em 1953 que Hannay o redescobriu (124, 35) e em 1954 Angus demonstrou que esse corpo para-esporal era um cristal protéico, atuando como potente toxina a determinados insetos (42, 63, 121, 123, 137).

Esta entomopatogenicidade distingue o Bacillus thuringiensis dos outros bacilos do grupo do Bacillus cereus, os quais se assemelha pelas características de cultivo e pela morfologia geral (61).

Em 1967 Heimpel denominou o cristal protéico tóxico de δ endotoxina (35, 73, 74). Já foi constatado que a δ endotoxina é tóxica a cerca de 150 espécies de Lepidoptera (10); estas na fase jovem se apresentam como lagartas fitófagas em sua absoluta maioria, prejudicando tremendamente a horticultura, silvicultura e produtos armazenados (1, 8, 18, 61, 89, 114, 115, 125, 129, 133, 134)

A ampla gama de lepidópteros suscetíveis, a inocuidade à fauna e flora bem como aos vertebrados, e a possibilidade de produção "in vitro" foram aspectos positivos para a Indústria se interessar pela produção deste inseticida em grande escala (28). Em 1938 a França produzia o primeiro produto comercial "Sporéine", os EUA iniciaram a produção em 1950, e em 1959 uma única firma americana produzia várias toneladas de inseticida bacteriano, em pó (28).

2.2.1. Produção comercial

A produção comercial de microrganismos, ou produtos mi -

crobianos requer seleção de uma linhagem bem adaptada ao processo fermentativo e variações são necessárias afim de maximizar a produção e realizar o crescimento sob condições de fermentação econômica. No caso do Bacillus thuringiensis é a aplicação de bioensaios com o produto obtido que determina a melhor linhagem, isto envolve grande consumo de tempo, o que não é prático nem econômico (49), porém indispensável.

A manutenção de culturas em meio sólido e as repetidas transferências a meio de cultura artificial causam alterações indesejáveis no microrganismo, sendo uma delas o decréscimo na capacidade de esporular, diminuindo sua entomopatogenicidade. Esta pode ser restaurada através de passagem do microrganismo pelo inseto hospedeiro e posterior re-isolamento (49).

2.2.1.1. Meio de Cultura

A composição do meio de cultura para fermentação deve constar de água, carbono e nitrogênio para biossíntese e energia, e minerais (traços). Os níveis e formas desses elementos dependem do processo de fermentação usado.

Assim, uma fonte de carbono apropriada para fermentação semi-sólida pode não sê-la para fermentação em submerso (farelo de arroz, tortas de oleaginosas usam-se no processo semi-sólido, enquanto que melaço de beterraba, melaço de cana, amido de cereais, para submerso)(40,113). Estudos de viabilidade econômica excluem o emprego de açúcar puro (48, 49).

O nitrogênio pode ser suprido como sais de amônio, porém como fontes mais econômicas temos a água de maceração de

milho, farinha de soja e caseína hidrolizada (49, 129) . São necessários sais inorgânicos para o crescimento dos microrganismos. Uma patente francesa enumera a necessidade de traços de cálcio, zinco, manganês e magnésio (14). O cálcio é necessário para a termoestabilidade dos esporos, enquanto que o manganês é requerido para a esporulação (49).

Um meio típico contendo 1,86% de melaço de beterraba, 1,4% de torta de algodão, 1,7% de sólidos do soro de maceração de milho e 0,1% de CaCO_3 é descrito por Dulmage. (49), enquanto que em outro meio sugere 6,8% de amido de milho, 0,64% de sacarose, 1,94% de caseína, 4,7% de mace^urado de milho, 0,6% de extrato de levedura e 0,6% de tam^upão fosfato.

Nickerson (116,117) estudou a esporulação do Bacillus thuringiensis sem de-repressão, concorrente do ciclo do ácido tricarboxílico, verificando que em meio de cultura com baixo teor de glutamato, o pH baixou de 7,3 a 4,5 e permaneceu neste valor durante a esporulação, não tendo sido ativado o TCA; no meio de cultura com alto teor, o pH variou de 7,3 a 4,5 e subiu no final para 8,0 demonstrando a existência do TCA. A contagem de esporos apresentou $2,8 \times 10^7$ e $1,8 \times 10^8$ esporos por mililitro de meio de cultura, respectivamente.

Nagamma em 1972 (113) afirma a necessidade de D xilose ao meio de cultura ($\geq 0,025\%$) para se obter boa esporulação.

Dulmage et al (47,50) estudaram diferentes meios de cultura e diferentes linhagens em cultura submersa. A atividade tóxica foi dependente do meio e da linhagem empregada. Os carboidratos usados foram de triptona, farinha de

soja e torta de algodão parcialmente desengordurada.

2.2.1.2. Condições de fermentação

As condições de cultura devem ser estabelecidas não apenas em função de máxima concentração celular, uma vez que, o que importa no inseticida bacteriano é sua potência e eficácia contra os insetos visados.

As fermentações modernas são realizadas em submerso, com estudos de laboratório em frascos agitadores, onde se pode estabelecer o meio de cultura (composição), enquanto que em escala piloto usam-se fermentadores, com introdução de ar estéril, promovendo-se agitação, permitindo a mistura das três fases ar-microrganismo-meio de cultura e maximizando rendimentos.

A temperatura deve ser controlada dentro do intervalo $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$. A espuma pode ser um problema e deve ser controlada com a adição de agentes antiespumantes, tais como sílicones, óleos minerais ou vegetais. Muito cuidado se deve tomar com essa adição, porque antiespumantes reduzem a taxa de absorção de oxigênio (49).

O rendimento do cristal protéico tóxico (δ toxina) é muito maior em fermentação submersa. Como a linhagem e as variações nas condições de fermentação refletem-se na produção da toxina, maiores rendimentos são esperados no futuro, levando a formulações mais ativas, a um custo menor, ampliando o uso deste valioso inseticida bacteriano (48).

2.2.1.3. Toxinas

De acordo com Heimpel (74, 76) o Bacillus thuringiensis

possui um verdadeiro arsenal de toxinas: α , β , γ , δ toxinas.

Durante a esporulação, forma-se ao lado de cada esporo tóxico um cristal proteico (36, 40, 41, 44, 47, 50, 54, 55, 129) tóxico a maior parte de Lepidoptera causando paralisia intestinal e morte ao inseto; em alguns casos em que o inseto parece não ser suscetível ao cristal tóxico, a ingestão deste com o esporo acarreta germinação dos esporos, e produção de uma fosfolipase C que mata o inseto hospedeiro (36, 65, 129, 153). Além destas endotoxinas, há a exotoxina termo estável descoberta por Mc Connell e Richards em 1959 (106) e que é produzida pelo Bacillus thuringiensis na fase de crescimento vegetativo; é extracelular e tóxica a alguns Lepidópteros, Dípteros, Himenópteros, Coleópteros e Ortópteros (13, 20, 21, 28, 32, 61, 74, 96, 118, 129, 130)

A principal toxina conforme De Barjac (36) é o cristal proteico sendo sua potência para Pieris brassicae LD_{50} da ordem de $0,25 \mu g/g$ de inseto.

2.2.1.4. Recuperação do produto

Os produtos atualmente comercializados contém o complexo esporo-cristal e às vezes a toxina termoestável, dependendo da linhagem utilizada, da forma de recuperação do produto e da formulação do mesmo.

Megna 1963 em uma patente (112), indica a recuperação do produto por filtração do mosto fermentado, com filtro ajuda (Celite 512). Ele estabelece que qualquer desequilíbrio no suprimento de nitrogênio e carboidrato ao meio de cultura resultará na esporulação incompleta, fratura de células intatas, germinação de esporos e/ou autólise,

tornando a recuperação por filtração mais difícil.

Para recuperação do complexo esporo-cristal Dulmage et al (43, 49) centrifugaram o mosto para separar esporos e cristais do líquido, o creme obtido foi suspenso em solução de lactose (4-6%) e precipitado com acetona. Este foi separado por filtração em Büchner. O filtrado foi lavado com acetona, água e levado a secar. A lactose previne a formação de grumos, e facilita a re-suspensão do complexo esporo-cristal proteico. A potência do inseticida produzido foi testada em ensaios biológicos, uma vez que a contagem de esporos sozinha não reflete potência inseticida.

O produto recuperado foi comparado com o padrão francês e duas formulações comerciais, obtendo-se contagem de esporos de 18, 18, 17, 18 (bilhões de esporos), enquanto que em bioensaio os resultados em Unidade Internacional (padrão) foram de 16000 IU/mg (Dulmage); 1000 IU/mg (padrão), 75 IU/mg (Comercial A) e 900 IU/mg (Comercial B). O produto de Dulmage está sendo comercializado pela Abbott Laboratories, Illinois.

2.2.1.5. Normalização do produto

Com inseticidas químicos, a produção pode ser bem controlada, pois a normalização destes produtos pode ser expressa em porcentagem de ingredientes ativos ou princípio ativo (% p.a.), já que os mesmos são quimicamente definidos, e seus efeitos bem determinados (24, 29, 30, 151).

Já os produtos de Bacillus thuringiensis contém dois princípios ativos (esporo e cristal) ou mesmo três (e-

xotoxina), levando a aplicação de métodos biológicos: contagem de esporos e bioensaios com insetos (58,59) o primeiro método é presuntivo e o segundo é conclusivo para determinar a potência ou atividade do produto. Conforme Heimpel (74), infelizmente os produtos comerciais foram desenvolvidos antes que estudos da δ -toxina estivessem completos, assim o esporo era a única unidade disponível para normalização. Apesar de ser impróprio, este método continua sendo usado, embora nem a contagem de esporos nem a de cristais tenha relação com a atividade da toxina, uma vez que o método de produção pode modificar a atividade dos componentes tóxicos (74, 94).

Assim para De Barjac (36) o mais prático sistema de normalização é o bioensaio, sendo as potências medidas e expressas em unidades arbitrárias que devem estar relacionadas a um padrão internacional. Este padrão existe desde 1961, é chamado E₆₁ sendo suas características as seguintes:

Data de fabricação: janeiro 1961 pela firma Roger Bellon

Peso em pó: 42,7 Kg

Volume de cultura: 4135 litros (mistura de 6 fermentadores)

Unidades arbitrárias: 1000/mg

Composição do pó: Complexo cristal-esporo 21,5%
Inertes 78,2%

Distribuidor: Laboratoire de Lutte Biologique - Institut Pasteur, Paris. Dr. H. de Barjac

Uso na França: Bactospéine - SA Rhone Poulenc.

Inseto teste: Anagasta kühniella

Todas as preparações de La Minière

Inseto teste: Pieris brassicae

Uso nos EUA: Thuricide - I.M.C.

Dipel - Abbott Lab

Biotrol - Nutrilite

Inseto teste - Heliothis virescens ou
Trichoplusia ni

Krieg (94), Van der Geest (151) e Burges (26, 30, 31) apontam um problema que surge com o padrão internacional: a necessidade de se usar um inseto-teste padrão, o que é impossível em alguns países pelas dificuldades impostas pela legislação, em virtude da quarentena. Por outro lado é questionável se é melhor usar um inseto teste ou vários insetos afim de obter uma útil complementação de informações.

A unidade de atividade pode ser estabelecida dando um valor arbitrário a unidade de peso do padrão. Conforme Burges (31): 1g do material padrão = 100 unidades de atividade.

$$\text{Atividade da amostra} = 100. \frac{\text{LD}_{50} \text{ padrão}}{\text{LD}_{50} \text{ amostra}} \cdot \text{unidades}$$

onde LD_{50} é a dose letal para 50% de mortalidade, ou conforme Dulmage (42)

$$\text{UI/mg amostra} = \frac{\text{LD}_{50} \text{ padrão}}{\text{LD}_{50} \text{ amostra}} \cdot \text{UI/mg padrão}$$

onde UI = unidades internacionais (referida ao padrão E_{61} cujo valor arbitrário é de 1000 UI/mg)

Outros critérios sugerem 70% de redução de consumo de a-

imento (94) em lugar de dose letal para 50%. É necessário, às vezes, indicar um parâmetro de tempo em vez da dose ou concentração letal apenas.

Para obter resultados reprodutíveis é preciso ter uniformidade dos insetos quanto a peso e idade, constância de fatores climáticos e a quantidade de alimento administrado deve ser bem controlada.

Como insetos-teste de mesma espécie, usados em diferentes laboratórios tem apresentado resultados diferentes; a adoção de uma unidade internacional é de valor duvidoso, para Krieg (94).

Para eliminar este problema, os testes devem ser realizados sob condições comparáveis, ao mesmo tempo, e será preciso comparar a atividade da amostra com a atividade da amostra padrão.

Segundo De Barjes (36), na rotina industrial a constância de características de um produto deve ser verificada através de uma amostra referência, sendo que cada produtor deve ter o seu próprio padrão para controle.

Burges (30) apresenta testes realizados com três produtos por 13 pesquisadores, onde verifica a grande variação na contagem de esporos/ grama do produto, indo de 120 (80-150) $\cdot 10^8$ a 3950 (2500-4700) $\cdot 10^8$ para o produto E, de 82 (62-94) $\cdot 10^3$ a 5925 (5400-6400) $\cdot 10^8$ para o produto T, e de 3 (1-4) a 3950 (3000-5500) $\cdot 10^8$ para o produto N (os valores dão a contagem média e os limites mínimo e máximo para 95% de confiança).

A inconsistência na contagem é uma importante razão para rejeitar a contagem de esporos como única medida da ação inseticida do Bacillus thuringiensis.

Fisher (59) apresenta outra forma de estimar a contagem de esporos, prescindindo do método microbiológico, pela determinação química do ácido dipicolínico (DPA). Para um mesmo inseticida há uma correlação entre a concentração de ácido dipicolínico na amostra e a contagem de esporos.

Van der Geest apresenta seis Bioensaios com Pieris brassicae e os três produtos E, T, N sendo LC_{50} , a concentração letal para 50% de mortalidade, o parâmetro usado. (151).

A média dos valores encontrados nos seis biotestes variam de 12,2 mg/l a 31,4 mg/l com um valor médio de 21,8 mg/l para o produto E, de 7,3 mg/l a 15,5 mg/l com 11,4 mg/l na média o produto T, e de 25,2 mg/l a 51,6 mg/l com 38,5 mg/l na média para o produto N. (Limites inferior, superior e média para 95% de confiança).

A razão entre as potências (atividade) dos produtos comparados dois a dois, nos seis biotestes apresenta variação muito pequena, sendo de 0,43 a 0,65 com média de 0,54 para a razão E:T, 1,65 a 2,51 com média de 2,08 para E:N e de 0,21 a 0,31 com média de 0,26 para N:T. (Limites inferior, superior e média para 95% de confiança) Como a potência do produto E é arbitrariamente estabelecida como 1000 unidades internacionais, pode-se determinar o número de unidades dos produtos T e N.

Em Moraes, I.O. (111) foi determinado o valor de CL_{50} (concentração letal média) para Flodia interjunctella prega de grãos armazenados, plotando as concentrações do inseticida produzido em escala de laboratório, contra a taxa de mortalidade, em papel probabilístico normal, encontrando-se $CL_{50} = 0,725\%$ (inseticida/g substrato).

Newmark (114, 115) determinou a dose letal média para A-nagasta kühniella obtendo $DL_{50} = 0,27\%$.

2.2.1.6. Emprego do inseticida bacteriano

Em 1963 Hall (68) cita marcas de inseticidas bacterianos produzidos nos EUA, com suas formulações

<u>Inseticida</u>	<u>Firma</u>	<u>Formulação</u>
Bakthane L-69	Rohm & Haas Co	pó molhável 75.10^9 esp/g
Bakthane L-69	(Pennsylvania)	pó 5.10^9 esp/g
Biotrol BTB	Nutrillite Prod.Inc.	pó molhável 25.10^9 esp/g
Biotrol	(California)	pó 25.10^9 esp/g
Bioguard	(California)	pó molhável 15.10^9 esp/g
Parasporin	Grain Process Corp	pó molhável 50.10^9 esp/g
Parasporin	(Iowa)	pó molhável 100.10^9 esp/g
Parasporin	(Iowa)	pó 5.10^9 esp/g
Thuricide	Bioferm Corp.	pó molhável 30.10^9 esp/g
Thuricide	(California)	pó 5.10^9 esp/g
Thuricide	(California)	pó 3.10^9 esp/g

Na Europa:

<u>Inseticida</u>	<u>Firma</u>
Bactospéine IP54	Institute Pasteur, França
Biospor 2802	Farbwerke Hoechst, Alemanha

Enterobacterin	Microb. Lab. of the All Union
	Instit. for Plant Protection(VIZR),USSR
Sporeine	Laboratoire Libec, Paris - França

Todos os inseticidas bacterianos americanos, receberam i senção dos níveis de tolerância de resíduo da Food and Drug Administration para: alfafa, maçãs, alcachofra, fei j ão, brócoli, couve, couve-flor, alho, algodão, alface, melão, batata, espinafre e tomate.(2, 28, 125).

Em 1963 na Califórnia os inseticidas bacterianos de Bacil lus thuringiensis foram recomendados para uso em alface, couve, couve-flor, brócoli e alho, para controle das pra g as Trichoplusia ni, Pieris rapae, Plutella maculipennis e ainda para o controle da praga da alfafa Colias philo- dice eurytheme (52).

Em 1966 quando uma gama de inseticidas químicos foi proi b ida para fumo, devido aos resíduos tóxicos, houve recomen d ações pelas autoridades da Agricultura norte americana, para que usasse o Bacillus thuringiensis contra Protopar- ce sexta e Heliothis virescens, que deu excelente resulta t do (118)

Tanada em 1956 (146) encontrou bons resultados na aplica ç ão de Bacillus thuringiensis a Pieris rapae, Hellula un- dalis, Plutella maculipennis e Trichoplusia ni, pragas de crucíferas do Havai.

Tanada et al em 1960 (147) e Pinnock (134) verificaram a suscetibilidade de Platyptilia carduidactyla (Riley), praga de alcachofras; a taxa de mortalidade foi relativa m ente baixa, porém o autor aponta as dificuldades existen t es

tes nesse tipo de planta, em que o inseto penetra nas brácteas e o tempo de exposição ao inseticida fica limitado àquele da migração do inseto de uma bráctea a outra. A taxa de mortalidade variou de 11,7% a 31,3%. Outros controles biológicos apresentam taxa de mortalidade menor que esse valores (7,4% a 23,3%).

Tanada em 1962 (148) estudou o uso de Bacillus thuringiensis com 25.10^9 esp/g e 10.10^9 esp/g contra Heliothis zea (Boddie) concluindo que o controle se compara ao obtido com emprego de DDT a 5% (que é proibido pela legislação por deixar resíduo tóxico).

Shorey et al em 1963 (140) compararam a toxicidade de inseticidas químicos e microbianos em pragas de tomate; no caso de Heliothis zea os resultados encontrados para Bacillus thuringiensis são relativamente melhores que com Malation, Sevin e Toxafeno. Os percentuais de frutos estragados foram de 0,30%; 0,45%; 0,36%; 0,34% respectivamente e 1,25% para o fruto não tratado. Também em comparação a tratamento com DDT e Toxafeno + DDT o Bacillus thuringiensis apresentou igual ou melhor controle. Foram usados Biotrol e Bakthane nestes experimentos.

Grigarick em 1959 (64) realizou controle de Trichoplusia ni em alho com vários inseticidas e com Bacillus thuringiensis em pó, comparando-se os resultados do inseticida microbiano, em eficiência, àqueles com malation + pertane (4% + 5%) e DDT + toxafeno em pó (5% + 15%). O Bacillus thuringiensis na formulação líquida não atingiu tão bons resultados. Outros autores reportam a superioridade da aplicação em pó sobre a líquida (6,72).

Burges em 1969 (25) reporta que 150 espécies de Lepidop-

tera são suscetíveis estando registrado o Bacillus thuringiensis para 23 pragas de culturas, nos EUA, significando que as agências federais estão satisfeitas com a eficácia do produto nos testes de campo.

Dados estão sendo coletados para registro de mais 45 pragas suscetíveis. Entretanto os dados disponíveis são baseados nos produtos inicialmente produzidos e não nos modernos produtos que tem sua potência aumentada.

Frye em 1967 (60) estudou a suscetibilidade de sete espécies de Lepidoptera, duas de Himenoptera e uma Coleóptera com uma suspensão de esporos de Bacillus thuringiensis ($75.10^9/100$ ml de água). Os resultados mostraram alto grau de suscetibilidade para os lepidópteros, e não efetividade contra os himenópteros e coleóptero.

Dulmage (44) testou Bacillus tauringiensis contra Trichoplusia ni em 1969, em crucíferas. Em uma escala de valores de 1 a 5 representando desde vegetal sem danos até repolho completamente danificado, os resultados obtidos variaram de 1,4 (para aplicação semanal) a 2,0 (aplicação quinzenal) com um valor máximo de 2,7 (aplicação quinzenal de metade da dose anterior). O resultado para o controle (testemunha) deu 4,7. Os valores menores que 2,1 foram considerados como boa proteção à plantação de repolho.

White et al (152) determinaram dose letal média (LD_{50} mg/100 ml) para 15 Lepidoptera, usando Thuricide. O tratamento durou 96 horas. Os valores encontrados foram plotados em papel probabilístico normal e foram os seguintes, os resultados:

<u>Família</u>	<u>Espécie</u>	<u>LD₅₀mg/100 ml</u>
<u>Pieridae</u>	<u>Colias eurytheme</u>	0,12
<u>Arctiidae</u>	<u>Estigmene acrea</u>	1,4
<u>Noctuidae</u>	<u>Peridroma saucia</u>	1,8
<u>Noctuidae</u>	<u>Tricoplusia ni</u>	3,2
<u>Pyraustidae</u>	<u>Udea profundalis</u>	12,0
<u>Pyraustidae</u>	<u>Ommatopteryx texana</u>	17,0
<u>Notodontidae</u>	<u>Schizura concinna</u>	24,0
<u>Pyraustidae</u>	<u>Nomophila noctuella</u>	36,0
<u>Noctuidae</u>	<u>Autographa californica</u>	43,0
<u>Noctuidae</u>	<u>Spodoptera exigua</u>	74,0
<u>Noctuidae</u>	<u>Heliothis zea</u>	100,0
<u>Noctuidae</u>	<u>Prodenia praefica</u>	150,0
<u>Noctuidae</u>	<u>Agrothis ypsilon</u>	(-)
<u>Noctuidae</u>	<u>Peltia subterranea</u>	(-)
<u>Noctuidae</u>	<u>Pseudaletia unipuncta</u>	(-)

(-) não são suscetíveis aos níveis de tratamento.

Uma diferença de 1000 vezes foi encontrada entre a espécie menos sensível e a mais sensível ao inseticida (LD₅₀ = 150,0 e LD₅₀ = 0,12).

Somerville et al (142) testaram preparações purificadas de cristal e/ou esporos concluindo que o complexo espolo-cristal é mais eficiente para alguns lepidópteros, confirmando a divisão dos insetos em 4 grupos (74), quanto a suscetibilidade: Tipo I em que a paralisia intestinal é seguida por uma paralisia total; Tipo II a maior parte das Lepidóptera em que há paralisia intestinal e infecção sistêmica; Tipo III requerem esporos e cristais para causar morte e Tipo IV noctuidae que são i

munes à toxina. Porém neste trabalho de Somerville, o autor encontra noctuidae que são suscetíveis (Trichoplusia ni e Pseudaletia unipuncta) ao complexo esporo-cristal .

Angus em 1968 (10) apresenta 16 pragas economicamente importantes, com uso de Bacillus thuringiensis aprovado nos EUA e 24 outras pragas em escala experimental; são pragas da horticultura e silvicultura especialmente. Há certas pragas que são suscetíveis ao produto, em escala de laboratório, porém no campo não são atingidos pelo inseticida microbiano por não ficarem expostas a ele, e exemplo Rhyaciona buoliana (praga que se desenvolve internamente na base de pinheiros). A aplicação de inseticida bacteriano em vegetais ou frutas: repolho, alface, uva, tomate, milho, etc, é bem sucedida porque o inseto se alimenta deste, durante toda sua fase de crescimento. Os inseticidas químicos convencionais tendo seu uso proibido próximo à fase de colheita, são inoperantes nessas culturas comestíveis.

Angus (6) apresenta em revisão da literatura, a lista de inseticidas químicos, compatíveis com o Bacillus thuringiensis; a compatibilidade é dada como:

Campo: bons resultados obtidos em testes de campo, implicando que sob as condições estabelecidas, o aditivo não reduz a eficiência do inseticida microbiano.

Recomendado: presumivelmente o aditivo é inócuo ao B. thuringiensis.

Incerto: Com base nos dados reportados, ou devido a não disponibilidade da referência original, o efeito do aditivo no entomopatógeno é incerto.

<u>Pesticida</u>	<u>Referência</u>	<u>Compatibilidade</u>
Azinphosmetil	Heimpel (74)	Recomendado
Bidrin	Catálogo (1,89,125)	Recomendado
Carbaryl	Heimpel (74)	Campo
DDD	Catálogo (1, 89,125)	Recomendado
DDT	Heimpel (74)	Campo
Diazinon	Catálogo (1,89,125)	Recomendado
Dieldrin	Catálogo (1,89,125)	Recomendado
Dinitrocresol	Heimpel (1967)	Campo
Endosulfan	Heimpel (1967)	Campo
Endrin	Heimpel (1967)	Recomendado
Endrin	Catálogo (1,89,125)	Recomendado
Malation	Catálogo (1,89,125)	Recomendado
Malation	Heimpel (1967)	Incerto
Metilparation	Heimpel (1967)	Campo
Metilparation	Catálogo (1,89,125)	Campo
Metilparation	Ignoffo et al (1965)	Incerto
Metil trition	Catálogo (1,89,125)	Recomendado
Mevinfós	Catálogo (1,89,125)	Recomendado
Naled	Heimpel (74)	Campo
Piretrinas	Catálogo (1,89,125)	Recomendado
Rotenona	Catálogo (1,89,125)	Recomendado
Riania	Qatman (126)	Campo
Toxafeno	Heimpel (74)	Campo

2.2.1.7. Aspectos econômicos

Segundo Dulmage (48) os produtores mantêm as informações de custos de pesquisa de inseticidas bacterianos confiáveis. A investigação de inseticidas bacterianos deve provavelmente totalizar não mais que 6 milhões de cruzei

ros por ano, enquanto que 1 bilhão de cruzeiros por ano, são gastos pela indústria mundial investigando inseticidas químicos.

Ignoffo (85) apresenta o custo de pesquisa e desenvolvimento de um inseticida químico e um microbiano. O período de desenvolvimento é de sete e dez anos respectivamente, e os custos do inseticida químico Sevin atingem Cr\$ 25 050 000,00, enquanto que o Thuricide atinge Cr\$ 20 150 000,00 ou seja, o custo do inseticida microbiano é 80% o do químico. Destes custos aproximadamente 2/3 são gastos antes da instalação da produção comercial.

Em fermentação submersa uma estimativa de custos é apresentada por Dulmage (48) para 400 toneladas de inseticida e o custo por Kg para separação do produto por precipitação com acetona.

Valor do Investimento para 400 toneladas de Inseticida
Microbiano (por ano)

<u>Item</u>	<u>Cr\$</u>
Terreno e preparo	250 000
Construções	2 100 000
Fermentadores (10 de 75 m ³ 3 de 4 m ³ 2 de 0,45 m ³)	
Acessórios, Equipamento para recuperação e Equipamentos adicionais	7 334 000
Instalação do equipamento	2 560 000
Tubulações, Instalações, Instrumentação	3 470 000
Engenharia	2.430 000
Contingências	2 000 000
	<u>20 150 000</u>

Custo do produto por Kg (a)

<u>Item</u>	<u>Cr\$</u>
Matéria prima	4,20
Acetona	4,00
Utilidades: vapor, água, luz	6,60
Trabalho e supervisão	6,00
Manutenção	2,40
Cargas fixas	5,80
Carga de capital de trabalho	4,00
Diversos	4,00
Gastos de planta	<u>4,20</u>
	34,00

(a) Rendimento 10 g/l. Operação 300 dias/ano; 24 h/dia .

A diluição do produto obtido, em inertes, dependerá da potência do mesmo verificada por bioensaio. Assim a potência do produto de fermentação, determinará a factibilidade econômica do processo.

Com a regulamentação no uso de inseticidas químicos tornando-se dia a dia mais rigorosa, e os insetos desenvolvendo resistência a esses inseticidas, a necessidade de controle biológico aumenta. Não há dúvida que o custo de produção do inseticida microbiano decrescerá face aos avanços tecnológicos dos processos fermentativos (48).

CAPÍTULO III

MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MICRORGANISMO

Foi utilizado o Bacillus thuringiensis NCIB 9207 recebido liofilizado da "National Collection of Industrial Bacteria, Scotland". Foi reidratado em água destilada estéril e inoculado em meio de cultura agar nutritivo. Após 72 horas a 30°C observou-se bom desenvolvimento. A cultura foi mantida à temperatura de 4°C (em refrigerador) efetuando-se posteriormente sucessivos repasses a cada 30 dias para sua manutenção.

3.2. MEIOS DE CULTURA

3.2.1. Para manutenção do microrganismo foi empregado o meio de agar nutritivo, em tubos-estoque, cuja composição é a seguinte:

Meio de manutenção

Composição	g/l
Extrato de carne	1
Extrato de levedura	2
Peptona	5
Cloreto de sódio	5
Agar	15

Os tubos de ensaio (18 x 180 mm) contendo cada um aproximadamente 12 ml de meio de cultura, foram esterilizados em autoclave por 15 minutos a 121°C. esfriados e inclina

do foi posteriormente inoculado com o Bacillus thuringiensis NCIB 9207.

3.2.2. Fermentação submersa

Para pré-fermentação foi utilizado meio de cultura líquido com a seguinte composição:

Meio de pré-fermentação

Composição	g/l
Na_2HPO_4	2,5
NaCl	5,0
Glicose	2,0
Triptose	20,0
pH = 7,3	

O meio de cultura líquido foi colocado em frascos erlenmeyers de 500 ml, contendo cada um 50 ml de meio, foram esterilizados em autoclave por 15 minutos a 121°C . Esfriados foram inoculados com o microrganismo e levados a agitador rotatório com temperatura controlada. Realizaram-se duas pré-fermentações para cada fermentação, sendo 200 rpm a agitação, 30°C a temperatura e 8 h e 12h a duração das mesmas.

3.2.3. Fermentação

Para encontrar o meio de cultura mais viável economicamente, foram estudados 28 meios de cultura sendo 22 testados em agitadores rotatórios; 17 deles contendo melaço em pó e uréia, e 5 contendo melaço em pó e água de maceração de milho como fontes de carbono e nitrogênio respectivamente.

O melaço em pó utilizado apresentou a seguinte composição:

Composição do Melaço

<u>Composição</u>	<u>%</u>	<u>Composição</u>	<u>%</u>
Açúcares	52,0	Fe	0,48
Proteína bruta	2,0	Mg	0,81
Cálcio	4,5	S	0,64
Fósforo	0,18	Na	0,30
Minerais	12,50	K	0,20

Traços de manganês 12 mg/kg; Iodo 0,7 mg/kg; Zinco 16 mg/kg; cobalto 0,1 mg/kg e cobre 1,2 mg/kg

A água de maceração de milho utilizada foi obtida da mistura de vários lotes de "milhocina" estocadas em refrigerador.

Sua composição média apresentou: sólidos totais 49,6% e nitrogênio total 3,75%.

Outra fonte de nitrogênio testada foi a uréia.

A formulação dos meios de cultura está apresentada a seguir:

MEIOS DE CULTURA PARA FRASCOS AGITADOS

<u>MEIO</u>	<u>MELAÇO</u> g/l	<u>URÉIA</u> g/l	<u>ÁGUA DE</u> <u>MACERAÇÃO</u> <u>DE MILHO</u>	<u>pH</u> (antes da esterilização)
I	16	1		7,0
II	16	2		8,7
III	16	4		8,7
IV	16	6		8,7
V	16	8		8,7
VI	16	10		8,7
VII	16	15		8,7
VIII	16	20		8,9
IX	16	22,5		8,7
X	16	25		8,9
XI	12	15		9,0
XII	20	15		9,0
XIII	24	15		9,0
XIV	16	27,5		9,0
XV	16	30		9,0
XVI	14	22,5		9,0
XVII	14	25		9,0
XVIII	10		20	7,5
XIX	10		40	7,5
XX	10		60	7,5
XXI	10		80	7,5
XXII	10		100	7,5

MEIOS DE CULTURA PARA ESCALA PILOTO (mini-ferm)

<u>MEIO</u>	<u>MELAÇO</u> g/l	<u>URÉIA</u> g/l	<u>ÁGUA DE</u> <u>MACERAÇÃO</u> <u>DE MILHO</u> g/l	<u>pH</u>	<u>AERAÇÃO</u> vvm
XXIII	16	22,5		8,3	1,6
XXIV	16	25,0		8,3	1,6
XXV	16	23,0		8,2	0,6
XXVI	16	24,0		8,0	0,6
XXVII	10		40	6,4	0,6
XXVIII	10		25	6,4	0,6
XXVIII	10		25	6,4	0,8
XXVIII	10		25	6,4	1,2
XXVIII	10		25	6,4	1,6
XXIX	10		30	6,7	0,6
XXIX	10		30	6,7	1,6
XXX	10		20	6,4	0,6
XXXI	15		20	6,4	0,6
XXXII	12		20	6,7	0,6

Foram esterilizados a 121°C por 20 minutos e resfriados a 30°C ± 2°C.

Após decidirem-se os meios de maior produção em "shaker" estes foram testados em Mini Fermentador, para verificação da produção em escala piloto. Alguns meios de cultura de mesma composição, testados em agitadores e em Mini Fermentador receberam diferentes números para facilidade de identificação.

3.3. EQUIPAMENTO

3.3.1. Frascos agitados.

Foram efetuados em Agitador-Incubador (rotativo) Psychrotherm da New Brunswick Scientific Co. Inc. modelo G 27 , com as seguintes características:

Velocidade 40 a 400 rpm (± 5)

Temperatura 0 a 60°C ($\pm 0,5^\circ\text{C}$)

Passo: 2,54 cm

3.3.2. Mini Fermentador

Foi utilizado o modelo M 1000 da "Fermentation Design Inc", com as seguintes características:

a) Vaso de fermentação: copo de vidro "pirex" de 1000 ml com volume útil de 800 ml.

b) Agitador magnético recoberto de "teflon" com velocidade de variável de 380 a 690 rpm.

c) Aeração através de compressor, medida sua vazão em rotâmetro calibrado em l/min (1 atm e 21,1°C).

d) Filtro de ar, com leito de lã de vidro.

e) Temperatura mantida com precisão ($\pm 0,5$) por resistência elétrica e/ou circulação de água fria.

f) Eletrodo de oxigênio da "Fermentation Design Inc" modelo E 100.

g) Analisador de Oxigênio dissolvido da "Fermentation Design Inc." modelo DOAR, dotado de registrador.

3.4. EQUIPAMENTOS COMPLEMENTARES

3.4.1. Espectrofotômetro Spectronic 20 da Bausch & Lomb.

3.4.2. Balanças de precisão Mettler:

P 160N (max. 160g, div.1mg) com lâmpada infravermelha para secagem, modelo LP11.

P 1000 (máx. 1000g, div.1g)

3.4.3. Autoclaves e esterilizadores:

Esterilizador Fabbe, modelo 104, nº 1773 (max . 3 kg/cm²).

Autoclave Steroclave nº 25X da Wisconsin Aluminium Foundry Co. Inc.

3.4.4. Potenciômetro, pHmeter H-5 Horiba, com ajuste automático de temperatura e precisão de $\pm 0,05$ unidades de pH.

3.4.5. Microscópio Carl Zeiss (aumento 40 x 12,5 = 500 vezes).

Microscópio de contraste de fase NIKON modelo L-Ke.

3.4.6. Equipamento de filtração Sartorius Membran-Filter, com funil graduado; papel filtro de $0,2\mu (\pm 0,05\mu)$, e $0,8\mu (\pm 0,05\mu)$.

3.4.7. Bomba de vácuo Welch da Sargent Scientific Co., modelo 1399, série 8334 (min. 1,0 mm Hg).

3.4.8. Centrífuga Excelsa da Panem (0 - 5.000 rpm) - Modelo 204N, com cruzeta número 20429 de 8 lugares, sendo 4 de 25 ml e 4 de 15 ml.

3.4.9. Estufa para secagem, Panem com painel frontal e termostato, graduada da temperatura ambiente a 60°C, com sistema de convecção de ar forçado no sentido horizontal.

Estufa para secagem e esterilização: Panem modelo 320, com termostato embutido no painel, regulável da temperatura ambiente a 200°C ($\pm 1^\circ\text{C}$).

3.5. PROCESSO FERMENTATIVO

Na etapa de frascos agitados usaram-se erlenmeyers de 500 ml com 100 ml de meio de cultura os quais foram esterilizados a 121°C, 20 minutos, resfriados a 30°C $\pm 2^\circ\text{C}$ e inoculados com o Bacillus thuringiensis da segunda pré-fermentação. Utilizam-se 5% de inóculo (V/V).

As condições de fermentação foram: 200 rpm e $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, para agitação e temperatura respectivamente.

Na etapa piloto, de Mini Fermentador, foi preparado 500 ml de meio de cultura, no vaso do fermentador, levado a esterilizar a 121°C , 20 min. após o que, foi resfriado a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Foi semeado com 2% V/V do mosto da segunda pré-fermentação. A agitação e a temperatura de fermentação foram de 420 rpm e $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ respectivamente. A taxa de aeração variou de 0,6 a 1,6 VVM. (volume/volume/minuto).

O pH inicial de fermentação para os meios com uréia esteve entre 9,0 e 8,0 enquanto que aqueles com água de maceração de milho entre 7,5 e 6,4.

3.6. TÉCNICAS DE ANÁLISE

A análise de açúcares (expressos em glicose), foi realizada utilizando-se o reagente antrona, segundo uma modificação do método original de Morris 1948 (34).

Análises de nitrogênio total foram realizadas pelo método de Kjeldahl (110).

Observações microscópicas foram feitas para acompanhar a esporulação (Microscópio Carl Zeiss) e a formação do complexo esporo-cristal (microscópio de contraste de fase).

A determinação de ácido dipicolínico (DPA) no mosto fermentado fez-se consoante o método de Jansen 1958 (91). Traçou-se a curva padrão do ácido dipicolínico contra a densidade ótica (UA) a 440 nm ($3 \text{ UA} \Rightarrow 1 \text{ mg/ml DPA}$).

Os valores obtidos para concentração de ácido dipicolínico na biomassa permitiram estimar a contagem de esporos viáveis através da curva apresentada no Anexo 3(59).

3.7. ENSAIO BIOLÓGICO

Para bioensaio de inseticida bacteriano, dois modos de aplicação podem ser utilizados, conforme Krieg (94).

3.7.1. Mistura da biomassa de B. thuringiensis a um substrato (produtos armazenados).

3.7.2. Aplicação do inseticida na superfície do substrato, por exemplo em pó ou por aspersão, em vegetais.

No caso 3.7.1., nosso bioteste está relatado em Moraes, I.O. (111) com Plodia interpunctella (Hbn. 1813) (Lepidoptera, Phycitidae) praga de produtos armazenados e o resultado da aplicação em amostras de farelo de arroz com várias concentrações do inseticida e com número conhecido de lagartas, dá o valor da concentração letal média CL_{50} .

A concentração letal média foi determinada traçando-se uma curva pelos pontos cujas coordenadas eram a taxa de mortalidade e a concentração correspondente, plotadas em papel probabilístico normal. Anexo 2 (111).

Naquele caso determinamos CL_{50} , em vez de DL_{50} (dose letal média), dada a dificuldade de determinar a dose letal realmente ingerida pelo inseto.

No caso 3.7.2. realizamos o ensaio biológico, tendo como inseto teste Ascia monuste orseis (Lepidoptera, Pieridae), praga de vegetais. O inseto adulto é uma borboleta branco-amarelada que faz sua postura geralmente na página inferior da folha do vegetal. Ao nascerem, as lagartinhas se alimentam das folhas, reduzindo o vegetal

a talos enquanto vão crescendo as lagartas, chegam a fase de crisálidas e recomeça o ciclo com o adulto (borboleta).

Cada postura apresenta um grande número de ovos (~ 60) .

Para o bioteste, a fim de obter resultados reprodutíveis usamos folhas de couve, com posturas de mesma idade. Metade destas foram usadas como testemunhas e a outra metade foi tratada com o inseticida em pó. As lagartas recém nascidas passaram a se alimentar das folhas ocorrendo paralisia naquelas das folhas tratadas.

Após 15 dias as folhas com e sem tratamento foram fotografadas. Anexo 1.

As lagartas das folhas tratadas, foram homogeneizadas e o caldo obtido foi inoculado em meio de cultura de manutenção (Agar nutriente) a fim de se constatar a presença de Bacillus thuringiensis no trato intestinal das lagartas afetadas.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Consumo de glicose

Com os dados apresentados nos Quadros 1 a 6 e as Figuras 1 a 4 pode-se observar o comportamento da fermentação relativamente às velocidades médias de consumo de glicose, nos trinta e dois meios de cultura ensaiados.

A Figura 1 mostra um comportamento ótimo, com velocidade média de consumo de 0,625 g/l/h (gramas de glicose por litro de meio de cultura por hora), decrescendo o teor de glicose a 10% do seu valor inicial nas dez primeiras horas de fermentação. Os meios de cultura VIII a XI; XVIII a XXII; XXVIII; XXIX e XXX apresentaram esse comportamento.

Na Figura 2 temos uma velocidade média de consumo de 0,153 g/l/h, sendo que há um decréscimo no teor de glicose de 72,3% ao fim de 30 horas de fermentação, tendo-se ainda 27,7% da glicose inicial. Nela estão os meios de cultura II a VII, XII, XXV, XXVII e XXXII.

Na Figura 3 a velocidade média foi de 0,127 g/l/h havendo um decréscimo de 56,2% no teor de glicose ao fim de 30 horas de fermentação, restando 43,7% do teor inicial de glicose após esse período. Este foi o comportamento para os meios de cultura I, XIII, XXIII, XXIV, XXVI e XXXI.

A Figura 4 apresenta um consumo muito reduzido de glicose com velocidade média de 0,040 g/l/h; houve um consumo

de 17,9% da glicose total em 25 horas de fermentação, restando ainda 82,1% da glicose inicial após esse período . Foi o caso dos meios de cultura XIV a XVII.

4.2. Comportamento do pH durante a fermentação

Três tipos de comportamento ocorreram nos meios de cultura ensaiados conforme se verifica pelos Quadros 7 a 12 e Figuras 5 e 6.

Na Figura 5, os meios XVIII a XXII em frascos agitados e XXVIII, XXIX, XXX em Minifermentador apresentaram melhor comportamento com uma fase de decréscimo de $pH=7,3$ a $5,5 \pm 0,5$, nas dez primeiras horas de fermentação, seguida de uma fase estacionária ao pH mínimo $5,5 \pm 0,5$ de 5 a 10 horas e no final retorno à neutralidade.

Na composição desses meios em frascos agitados havia 10g/l de melaço e 20; 40; 60; 80; 100 g/l de água de maceração de milho, enquanto que os do Minifermentador tinham 10g/l de melaço e 20; 25; 30 g/l de água de maceração de milho.

Na Figura 6 está apresentado o comportamento dos meios I a XIII (frascos agitados com melaço e uréia), XXIII a XXVII, XXXI e XXXII em minifermentador com melaço e uréia e/ou melaço e água de maceração de milho, sendo os meios XXIII, XXIV, XXV, XXVI com 16 g/l de melaço e 22,5; 23; 24; 25g/l de uréia; o meio XXVII com 10g/l de melaço e 40 g/l de água de maceração de milho e os meios XXXI e XXXII com 15 e 12 g/l de melaço e 20 g/l de água de maceração de milho. Nestes, o pH decresceu nas primeiras 15 horas e se manteve no seu valor mínimo no período seguinte de fermentação não havendo retorno à neutralidade.

Os meios de cultura restantes XIV a XVII apresentaram manutenção do pH inicial, isto é, na faixa alcalina durante to

do o período estudado. Estes meios continham 16 g/l de melaço e 27,5; 30 g/l de uréia e 14 g/l de melaço e 22,5 ; 25 g/l de uréia respectivamente.

4.3. Concentração celular

A concentração celular do complexo endotóxico (grama de biomassa seca por litro de meio de cultura) está apresentada nos Quadros 13 e 14.

A recuperação de biomassa por centrifugação (Quadro 13) apresentou valores menores que 2 g/l para os meios I a XII e o meio XXIII.

Para os meios XIII a XVII; XXIV; XXV; XXVI os rendimentos estiveram entre 2 e 3 g/l.

Os maiores rendimentos (4,20 a 5,33 g/l) foram obtidos nos meios XXVIII, XXIX e XXX.

Os resultados obtidos, para separação das células por filtração através de membrana porosa usando caolin ou terra diatomácea como auxiliar de filtração, estão no Quadro 14. Foram estudados filtros de 0,2 μ m e 8 μ m (porosidade) para os meios XXVIII e XXIX.

Pode ser observado o efeito do teor do inerte adicionado como auxiliar de filtração (0,05 g/ml; 0,15 g/ml; 0,20g/ml; 0,30 g/ml e 0,35 g/ml) ao meio XXVIII com 23 horas de fermentação a 0,8 VVM bem como o efeito da variação da taxa de aeração no rendimento celular no meio XXIX usando 0,35 g/ml de auxiliar de filtração.

No meio XXIX o maior rendimento 9,40 g/l (biomassa/mosto) foi obtido em 23 horas de fermentação a 1,6 VVM, enquanto

que para o meio XXVIII foi de 8,50 g/l porém com a metade da taxa de aeração (0,8VVM).

O outro método empregado para recuperação, visando economia de processo foi a recuperação do complexo endo-exotóxico fazendo mistura do mosto ao inerte (terra diatomácea ou caolin) facilitando a posterior secagem do material, que já se encontra parcialmente concentrado. São apresentados os resultados no Quadro 15, como composto endo-exotóxico. Essa forma de recuperação é altamente vantajosa, também por apresentar um produto que já contém em sua formulação o diluente (pó) e como adesivo os resíduos de melaço e água de maceração de milho do mosto. Isto é particularmente importante neste tipo de inseticida que será aplicado à folhagem sujeita a ação das intempéries, requerendo então a adesividade para vencer as condições de chuva, ventos e mesmo orvalho, enquanto não for ingerida pelo inseto (aumentando desta forma seu tempo de residência na folha).

4.4. Determinação de ácido dipicolínico

O ácido dipicolínico (DPA) presente no mosto fermentado, foi determinado obtendo-se os resultados apresentados no Quadro 16. Foram utilizadas biomassas obtidas por centrifugação (Quadro 13).

Os maiores valores de DPA (mg) por grama de célula seca foram obtidos para os meios de cultura XXXI, XXIX e XXVIII, sendo 29,09 mg/g; 38,55 mg/g e 39,09 mg/g respectivamente.

Uma estimativa da contagem de esporos pode ser realizada com o uso da Figura 1 do Anexo 3 que foi estabelecida para um produto comercial norte americano "Thuricide" (59). Os maiores resultados obtidos em nossos ensaios são superiores aos valores apresentados na figura (abscissa: concentração

- de DPA até 20 mg/g e ordenada: contagem de esporos viáveis de 10.10^9 a 60.10^9). Nossos menores resultados estão entre 20 e 30.10^9 esporos, para os meios XXV, XXVI e XXXII com concentrações de DPA/biomassa de 10,13 mg/g; 10,01mg/g e 10,29 mg/g.

4.5. Influência da aeração no rendimento celular e na determinação do ácido dipicolínico

Em minifermentador as fermentações foram realizadas a 0,6 VVM, com exceção das fermentações XXVIII e XXIX nas quais variou a taxa de aeração.

Os níveis estudados no meio XXIX foram de 0,6 e 1,6 VVM com maior rendimento a 1,6 VVM, sendo 5,60 g/l recuperação por centrifugação; 9,40 g/l recuperação por filtração. Quadros 17 e 14.

Para o meio XXVIII foram estudados os níveis de 0,6; 0,8; 1,2; 1,6 VVM com rendimento maior a 0,8 VVM, sendo 5,40g/l por centrifugação e 8,50 g/l por filtração respectivamente. Quadro 17 e 14.

Na determinação do ácido dipicolínico os resultados obtidos estão no Quadro 18.

4.6. Determinação de Proteína

Foi determinada nos meios XXVIII e XXIX pelo método de Kjeldahl (110).

<u>MEIO</u>	<u>HORAS DE</u> <u>FERMENT.</u>	<u>MASSA</u> <u>AMOSTRA</u> (g)	<u>VOL.HCl(0,01N)</u> (ml)	<u>% PRO-</u> <u>TEÍNA</u>
XXIX	8	0,136	0,7	8,90
	29	0,104	0,5	8,30
XXVIII	8	0,070	1,7	10,62
	30	0,200	5,4	11,81

4.7. Microscopia

Durante as fermentações em minifermentador foram examinadas lâminas coradas para observação do início de esporulação, o que se deu a partir da sexta hora de fermentação.

A presença do cristal protéico ao lado do esporo foi verificada, observando preparações úmidas em microscopia de contraste de fase.

4.8. Bioteste

O produto obtido por fermentação no meio de cultura XXVIII foi testado em Ascia monuste orseis (Lepidoptera-Pieridae). (Latreille, 1819).

Como substrato alimentar para as lagartas recém-nascidas, foi usado couve com e sem aplicação do inseticida obtido.

Cada folha foi tratada com 0,075 g do produto obtido na fermentação XXVIII (com aeração de 0,8 VVM, 23 horas de fermentação), recuperado por filtração com cáolin como inerte (auxiliar de filtração). No Quadro 14 temos a relação de biomassa para inerte (% g/g) que é de 2,4%.

Em paralelo às folhas tratadas, acompanhou-se o desenvolvimento das lagartas em folhas não tratadas com insetida.

Ao final de uma semana verificou-se o resultado obtido, sendo que as 25 lagartas do tratamento consumiram mínima parte de uma folha de couve, conforme se observa pela foto 1, enquanto que as 25 lagartas testemunhas, consumiram 10 folhas de couve reduzindo-as a talos, conforme se observa pela foto 2.

Na foto 3 podem ser observados os tamanhos atingidos pelas lagartas ao final do ensaio. Aquelas da folha tratada, permaneceram paralisadas desde a ingestão de mínima quantidade do inseticida, até a morte, cessando portanto o dano ao vegetal infestado.

4.9. Destaques

A partir dos itens 4.1 a 4.4 podem ser destacados os seguintes resultados:

$$A = \left\{ \begin{array}{l} \text{VIII, IX, X, XI, XVIII, XIX, XX, XXI, XXII, XXVIII} \\ \text{XIX, XXX} \end{array} \right\}$$

$$B = \left\{ \text{XVIII, XIX, XX, XXI, XXII, XXVIII, XXIX, XXX} \right\}$$

$$C = \left\{ \text{XVIII, XIX, XX, XXI, XXII, XXVII, XXVIII, XXIX, XXX} \right\}$$

$$D = A \cap B \cap C = \left\{ \begin{array}{l} \text{XVIII, XIX, XX, XXI, XXII, XXVIII, XXIX,} \\ \text{XXX} \end{array} \right\}$$

onde:

A = Conjunto dos meios de cultura que apresentaram maior velocidade média de consumo de glicose (Quadros 1 a 6, Figura 1).

B = Conjunto dos meios de cultura que apresentaram melhor comportamento face ao pH (Quadros 7 a 12, Figura 5).

C = Conjunto dos meios de cultura que apresentaram maior massa celular seca (≥ 3 g/l) (Quadro 13).

D = Conjunto intersecção .

Obviamente os meios de cultura mais factíveis para produção do inseticida bacteriano são os do conjunto D.

Os meios de cultura XVIII a XXII foram os de melhor comportamento em frascos agitados; o rendimento celular variou diretamente com o teor de água de maceração de milho (AMM), ou seja, 3,02 g/l para 20 g/l de AMM; 3,60 g/l para 40 g/l de AMM; 4,33 g/l para 60 g/l; 4,66 g/l para 80 g/l e 5,85 g/l para 100 g/l.

Com os meios ensaiados no Minifermentador, os melhores resultados são para os meios XXVIII, XXIX, XXX; porém não variam diretamente com o teor de AMM e sim em torno de 25g/l. Assim para 20 g/l de AMM tivemos 4,20 g/l; 4,80 g/l para 30 g/l de AMM, enquanto que o maior valor 5,33 g/l foi para 25 g/l de AMM (com aeração de 0,6 VVh), respectivamente os meios XXX, XXIX e XXVIII.

Concentrações maiores de água de maceração de milho em Mini

fermentador acarretam queda de rendimento obtendo-se 4,70g/l para 60 g/l; 4,40 g/l para 80 g/l e 4,30 g/l para 100 g/l de água de maceração de milho (obs: estes ensaios não constam da relação de meios apresentada para Minifermentador) .

O Quadro 16, no qual se apresenta a concentração de ácido dipicolínico no complexo endotóxico, obtido por centrifugação, mostra que dentre os meios de cultura pertencentes ao conjunto D, apresentaram maior concentração em DPA os de números XXVIII e XXIX.

Os Quadros 18 e 17 mostram a influência da aeração no rendimento celular e na concentração de DPA na amostra, sendo que para massa seca obteve-se 9,40 g/l (biomassa/mosto) em 23 horas de fermentação a 1,6 VVM no meio XXIX e 8,50 g/l no meio XXVIII com a metade da taxa de aeração (0,8 VVM) . Para a concentração de DPA, os melhores valores também foram para 1,6 VVM no meio XXIX e 0,8 VVM no meio XXVIII com 38,55 mg/g e 39,09 mg/g respectivamente.

A análise de proteína na massa celular seca, também mostrou ser o meio XXVIII com 10,62% em 8 horas de fermentação e 11,81% com 30 horas de fermentação, ambos a 0,8 VVM, melhor que o XXIX com 8,90% para 8 horas e 8,30% para 23 horas de fermentação a 1,6VVM.

A observação microscópica, especialmente em contraste de fase, evidencia a maior e mais rápida formação do complexo esporo-cristal nos dois meios de cultura, com vantagem para o meio XXVIII.

A não padronização do nosso produto, neste trabalho, deveu-se a orientação clara contida nas resoluções de vários seminários e conferências Internacionais de Entomologia e Eco

logia relativas ao controle biológico com especial enfoque a inseticidas bacterianos.

Na prática afirma De Barjac (36), cada organização responsável pela produção deverá ter seus próprios padrões, adaptando-os inicialmente aos requisitos legais de seu país, e secundariamente a infra estrutura técnica da cadeia produção-distribuição-utilização.

Exemplifica citando os Estados Unidos onde o critério seguido é contagem de esporos viáveis e bioensaio para verificação da atividade total (ou potencia do inseticida) obtido em sucessivas produções, sem estabelecer um padrão de finido.

Já a França, não leva em consideração a contagem de esporos viáveis, mas apenas o bioensaio, usando padrão homólogo e específico para cada toxina, sendo utilizado o E₆₁ (étalon = padrão) para a endotoxina, cujo valor em unidades arbitrárias é de 1000/mg; os insetos testes utilizados são Anagasta kühniella (Lepidoptera - Phycitidae) para grãos armazenados e Pieris brassicae (Lepidoptera - Pieridae) para olerícolas.

No presente estudo, utilizamos o inseto-teste Ascia monuste orseis (Lepidoptera-Pieridae) para couve, enquanto que no estudo anterior Moraes (111) usamos Plodia interpunctella (Lepidoptera-Phycitidae) em farelo de arroz.

ÍNDICE

4.10. Quadros, Figuras, Fotos e Anexos

QUADROS	Página
Quadro 1 a 6 - Consumo de glicose	46
Quadro 7 a 12 - Comportamento de pH	50
Quadro 13 - Recuperação do Complexo endotóxico por centrifugação	54
Quadro 14 - Recuperação do complexo endotóxico por filtração	56
Quadro 15 - Obtenção do composto endotóxico	57
Quadro 16 - Determinação do ácido dipicolínico (DPA)	58
Quadro 17 - Influência da aeração na recuperação por centrifugação	59
Quadro 18 - Influência da aeração na <u>concentração</u> de DPA	60
 FIGURAS	
Figura 1 a 4 - Consumo de glicose	61
Figura 1 a 6 - Comportamento do pH	65
 ANEXOS	
Anexo 1 - Fotos	67
Foto 1 - Lagartas se alimentando	
Foto 2 - Lagartas em folha com tratamento	
Foto 3 - Lagartas em folha sem tratamento	
Foto 4 - Lagartas com e sem tratamento	
Anexo 2 - Bioteste com <u>Plodia interpunctella</u>	68
Anexo 3 - Contagem de esporos x DPA	69
Anexo 4 - Esquema do Minifermentador	70

QUADRO 1 CONSUMO DE GLICOSE (UA.10⁻²)(a)

HORA	I	II	III	IV	V	VI
0	0,58	0,66	0,63	0,59	0,60	0,60
16		0,39	0,44	0,40	0,45	0,47
20		0,24	0,22	0,22	0,19	0,24
21	0,32					
24		0,19	0,18	0,18	0,14	0,14
31	0,32					

(a) 1 g/l glicose = 8UA (Unidades de Absorbancia)

QUADRO 2 CONSUMO DE GLICOSE (UA.10⁻²)(a)

HORA	VII	VIII	IX	X	XI	XII
0	0,62	0,58	0,50	0,56	0,36	0,64
16	0,44					
20	0,20					
23		0,12	0,08	0,07	0,05	0,19
24	0,13					
27		0,08	0,07	0,06	0,05	0,16
30		0,08	0,07	0,08	0,05	0,15
31		0,08	0,08	0,08	0,06	0,17

(a) 1 g/l glicose = 8UA (Unidades de Absorbancia)

QUADRO 3 CONSUMO DE GLICOSE (UA.10⁻²)(a)

HORA	XIII	XIV	XV	XVI	XVII
0	0,74	0,60	0,56	0,52	0,50
6		0,64	0,56	0,56	0,50
20		0,54	0,62	0,46	0,48
23	0,25	0,52	0,56	0,46	0,48
25		0,54	0,56	0,46	0,48
27	0,27				
30	0,24				
31	0,29				

(a) 1 g/l glicose = 8 UA (Unidades de Absorbância)

QUADRO 4 CONSUMO DE GLICOSE (UA.10⁻²)(a)

HORA	XVIII	XIX	XX	XXI	XXII
0	0,36	0,27	0,50	0,56	0,53
5	0,28	0,14	0,29	0,28	0,31
8	0,07	0,10	0,13	0,16	0,18
23	0,06	0,07	0,10	0,12	0,14
25	0,05	0,07	0,08	0,10	0,12
28	0,05	0,05	0,09	0,10	0,11

(a) 1 g/l glicose = 8 UA (Unidades de Absorbância)

QUADRO 5CÓNSUMO DE GLICOSE (UA. 10^{-2})(a)

HORA	XXIII	XXIV	XXV	XXVI	XXVII
0	0,62	0,70	0,60	0,62	0,60
6	0,56	0,64			
15			0,36	0,37	0,24
17			0,35	0,35	0,18
21	0,32	0,50			0,16
22					0,13
24	0,28	0,29	0,29	0,30	0,11
26	0,27	0,28			
30	0,26	0,22			

(a) 1 g/l glicose = 8 UA (Unidades de Absorbância)

QUADRO 6CONSUMO DE GLICOSE (UA. 10^{-2})(a)

HORA	XXVIII	XXIX	XXX	XXXI	XXXII
0	0,58	0,60	0,60	0,60	0,58
3	0,46	0,36		0,60	0,42
4	0,42	0,34		0,50	
5	0,41	0,32			
6	0,39	0,29		0,46	0,30
7	0,26	0,28			
8		0,20			
15	0,06		0,07		
17			0,06		
21			0,06		
22	0,05				
23		0,08	0,05		
24	0,05		0,05		
25				0,30	0,21
30				0,24	0,20
34				0,20	0,16

(a) 1 g/l glicose = 8 UA (Unidades de Absorbância)

QUADRO 7COMPORTAMENTO DO pH DURANTE A FER-
MENTAÇÃO EM FRASCOS AGITADOS

HORA	I	II	III	IV	V	VI
0	7,2	8,7	8,7	8,7	8,7	8,7
16	6,5	6,0	6,8	6,5	6,7	7,0
20	4,8	5,2	5,5	5,6	5,7	5,8
24	5,0	5,0	5,3	5,5	5,5	5,7

QUADRO 8COMPORTAMENTO DO pH DURANTE A FER-
MENTAÇÃO EM FRASCOS AGITADOS

HORA	VII	VIII	IX	X	XI	XII
0	8,7	8,9	8,7	8,9	9,0	9,0
16	7,1					
20	6,1					
23		4,9	5,0	5,6	6,8	4,9
24	5,8					
27		4,9	5,2	6,3	6,1	4,9
30		4,9	5,2	6,4	5,8	4,9
31		5,0	5,3	6,4	5,5	4,9

QUADRO 9COMPORTAMENTO DO pH DURANTE A FER-
MENTAÇÃO EM FRASCOS AGITADOS

HORA	XIII	XIV	XV	XVI	XVII
0	9,0	9,0	9,0	9,0	9,0
6		9,0	9,0	9,0	9,0
20		9,0	9,0	9,0	9,0
23	4,9				
25		9,0	9,0	9,0	9,0
27	4,9				
30	4,9				
31	4,9				

QUADRO 10COMPORTAMENTO DO pH DURANTE A FER-
MENTAÇÃO EM FRASCOS AGITADOS

HORA	XVIII	XIX	XX	XXI	XXII
0	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
5	5,7	5,7	5,7	5,7	5,9
8	5,5	5,6	5,6	5,7	5,7
23	7,5	7,4	7,2	6,8	6,7
25	7,7	7,4	7,3	7,1	6,8
28	7,8	7,6	7,5	7,2	7,1

QUADRO 11COMPORTAMENTO DO pH DURANTE A
FERMENTAÇÃO EM MINI-FERMENTADOR

HORA	XXIII	XXIV	XXV	XXVI	XXVII
0	8,3	8,3	8,0	8,3	6,4
6	8,3				
15			7,5	7,5	5,4
21	6,5	7,0	7,0	7,5	5,0
22	6,0	6,5	7,0	7,3	5,0
24	6,0	6,0	7,0	7,3	5,2
26	5,5	5,5	7,0	7,0	5,2
30	5,5	6,0	6,5	7,0	5,2

QUADRO 12COMPORTAMENTO DO PH DURANTE A
FERMENTAÇÃO EM MINI-FERMENTADOR

HORA	XXVIII	XXIX	XXX	XXXI	XXXII
0	6,4	6,7	6,4	6,4	6,7
3		6,2		6,2	6,4
4		5,8		5,8	5,8
5		5,4		5,8	5,8
6		5,4		5,4	5,4
7		5,4		5,1	5,1
8				5,1	4,7
15	6,5		5,4		
17	6,7		5,4		
21	7,0		6,0		
22	7,3		6,0		
23	7,3	7,3	6,4	4,8	
24			6,4	4,8	
25				4,8	
34				4,8	

QUADRO 13RECUPERAÇÃO DO COMPLEXO ENDO-TÓXICO
POR CENTRIFUGAÇÃO

<u>MEIO</u>	<u>HORAS DE</u> <u>FERMENT.</u>	<u>BIOMASSA/15 ml</u>	<u>BIOMASSA</u> <u>g/l</u>
I	48	0,029	1,45
II	40	0,014	0,70
III	40	0,018	0,90
IV	40	0,022	1,10
V	40	0,034	1,70
VI	40	0,014	0,70
VII	40	0,039	1,95
VIII	30	0,022	1,46
IX	30	0,023	1,53
X	30	0,029	1,93
XI	30	0,017	1,13
XII	30	0,028	1,86
XIII	27	0,033	2,20
XIV	27	0,035	2,33
XV	27	0,036	2,40
XVI	27	0,037	2,46
XVII	25	0,036	2,40
XVIII	25	0,045	3,02
XIX	25	0,054	3,60
XX	25	0,065	4,33

<u>MEIO</u>	<u>HORAS DE</u> <u>FERMENT.</u>	<u>BIOMASSA/15 ml</u>	<u>BIOMASSA</u> <u>g/l</u>
XXI	25	0,070	4,66
XXII	25	0,080	5,35
XXIII	30	0,022	1,46
XXIV	30	0,039	2,60
XXV	30	0,035	2,33
XXVI	30	0,037	2,51
XXVII	30	0,052	3,48
XXVIII	23	0,080	5,33
XXIX	23	0,072	4,80
XXX	15	0,063	4,20
XXXI	48	0,054	3,60
XXXII	23	0,047	3,13

Centrífuga FANEM a 3500 rpm, 10 min.

QUADRO 14

RECUPERAÇÃO DO COMPLEXO ENDOTÓXICO
(ESPORO-CRISTAL) POR FILTRAÇÃO*

<u>MEIO</u>	<u>VVM</u>	<u>VOL.</u> <u>MOSTO</u> <u>ml</u>	<u>HORAS</u> <u>FERM.</u>	<u>FILTRO</u> μm	<u>FIL-</u> <u>TRA-</u> <u>ÇÃO</u> (s)	<u>MASSA</u> <u>INERTE</u> *(g)	<u>BIOM.</u> g/l
XXVIII	0,8	20	23	8,0	7	1,00(A)	2,75
	0,8	20	23	8,0	13	3,00(A)	5,95
	0,8	20	23	8,0	16	4,00(A)	6,45
	0,8	20	23	8,0	26	6,00(A)	6,85
	0,8	20	23	8,0	31	7,00(A)	8,50
	0,8	20	27	0,2	20	1,00(B)	7,30
	1,2	20	27	0,2	10	1,00(B)	4,80
	1,6	20	27	0,2	12	1,00(B)	5,30
XXIX	0,6	20	8	8,0	35	7,00(A)	2,95
	0,6	20	23	8,0	36	7,00(A)	5,60
	1,6	20	8	8,0	54	7,00(A)	7,45
	1,6	20	23	8,0	65	7,00(A)	9,40

*Sistema Sartorius Membran-Filter

*Inertes: A - Caolin; B - Terra Diatomácea

QUADRO 15OBTENÇÃO DO COMPOSTO ENDO-EXOTÓXICO

MEIO	VVM	VOL.MOSTO ml	HORAS FERM.	INERTE (g)	COMPOSTO g/l	COMPOSTO/ INERTE	
						%	g/g
XXVIII	0,6	12,5	25	13,13(A)	20,80	1,98	
	0,8	12,5	8	13,13(B)	66,70	6,35	
	0,8	12,5	27	13,13(B)	53,88	5,13	
	1,2	12,5	8	13,13(B)	54,72	5,21	
	1,2	12,5	27	13,13(B)	57,56	5,48	
	1,6	12,5	8	13,13(B)	50,31	4,79	
XXIX	0,6	12,5	8	13,13(A)	30,77	2,93	
	0,6	12,5	23	13,13(A)	20,48	1,95	
	1,6	12,5	8	13,13(A)	31,30	2,89	
	1,6	12,5	29	13,13(A)	30,98	2,95	

Inerte: A - Caolin; B- Terra diatomácea

Secagem em estufa FAREM a 37°C(até peso constante): 7 horas

<u>MEIO</u>	<u>HORAS DE</u> <u>FERMENT.</u>	<u>BIOMASSA</u> (g)	<u>UA</u> (10^{-1})	<u>DPA/BIOMASSA</u> mg/g
VIII	30	0,022	0,11	16,12
IX	30	0,023	0,12	16,83
X	30	0,029	0,11	12,23
XI	30	0,017	0,08	15,18
XII	30	0,028	0,13	14,97
XIII	27	0,033	0,17	16,61
XX	25	0,065	0,30	14,88
XXI	25	0,070	0,27	12,44
XXII	25	0,088	0,52	19,06
XXV	30	0,035	0,11	10,13
XXVI	30	0,058	0,18	10,01
XXVIII	23	0,080	0,64	25,80
XXIX	23	0,072	0,46	20,60
XXX	43	0,096	0,38	12,76
XXXII	30	0,047	0,15	10,29

QUADRO 17RECUPERAÇÃO DO COMPLEXO ENDO TÓXICO POR
CENTRIFUGAÇÃO
INFLUENCIA DA TAXA DE AERAÇÃO

<u>MEIO</u>	<u>VVM</u>	<u>HORAS DE</u> <u>FERMENT.</u>	<u>BIOMASSA/</u> <u>15 ml</u>	<u>BIOMASSA</u> <u>g/l</u>
XXVIII	0,6	23	0,080	5,33
	0,8	8	0,033	2,20
	0,8	30	0,081	5,40
	1,2	8	0,039	2,60
	1,2	30	0,039	2,60
	1,6	8	0,033	2,20
	1,6	30	0,045	3,00
	1,6	30	0,045	3,00
XXIX	0,6	23	0,072	4,80
	1,6	8	0,041	2,73
	1,6	29	0,084	5,60

Centrífuga FANEM: 3500 rpm, 10 min.

QUADRO 18DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO DIFICOLÍNICO (DPA)INFLUENCIA DA TAXA DE AERAÇÃO

<u>MEIO</u>	<u>VVM</u>	<u>HORAS DE</u> <u>FERMENT.</u>	<u>BIOMASSA</u> (g)	<u>UA</u> (10^{-1})	<u>DPA/BIO-</u> <u>MASSA</u> (mg/g)
XXVIII	0,6	23	0,080	0,64	25,80
	0,6	25	0,050	0,28	18,06
	0,8	8	0,033	0,40	39,09
	0,8	30	0,081	0,60	23,89
	1,2	8	0,039	0,36	29,76
	1,2	30	0,039	0,24	19,85
	1,6	8	0,033	0,30	29,32
	1,6	30	0,045	0,30	21,50
XXIX	0,6	23	0,072	0,46	20,60
	1,6	8	0,041	0,49	38,55
	1,6	29	0,084	0,72	27,64

1 mg DPA/ml = 3,1 UA

"Spectronic 20" a 440 nm

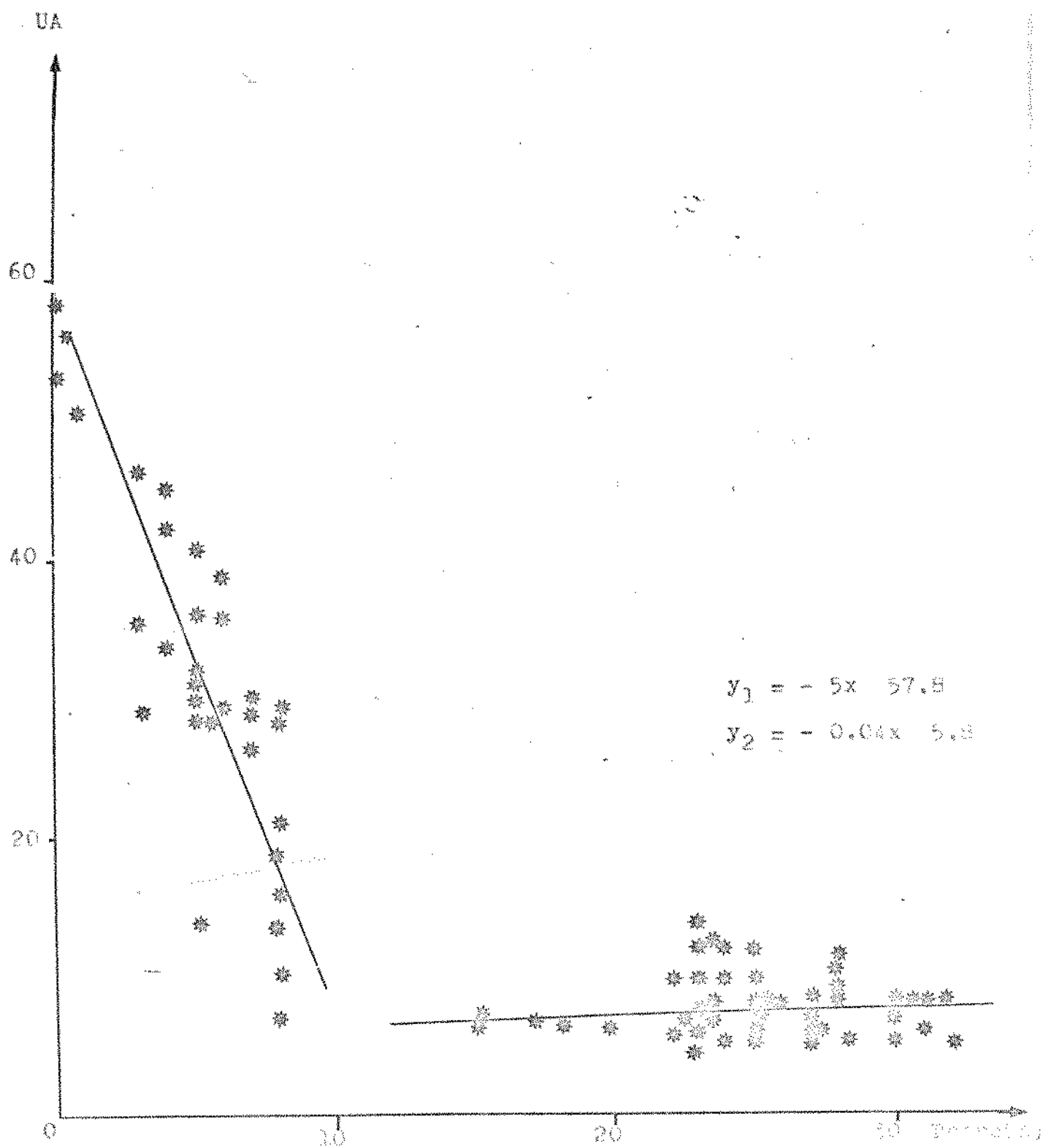


FIGURA 1: Cinética de absorção de glicose nas melões: VIII e XI, XVIII e XXII, XXVIII e XXX. (UA - Unidades de absorção)

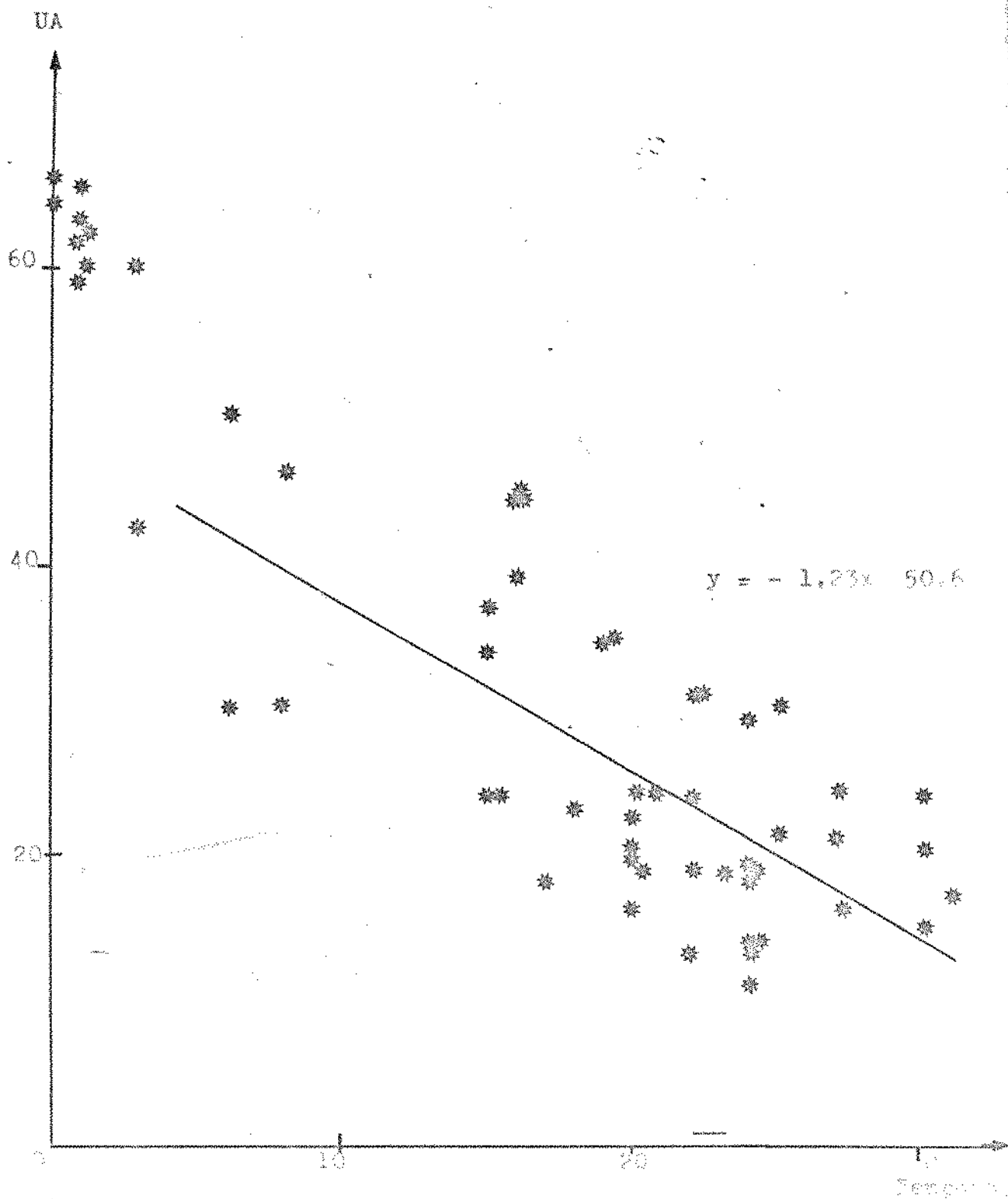


FIGURA 2: Cinética do consumo de glicose nos meios: I: a VII:
XII:XXIV e XXVII. (UA - Unidades de absorvência)

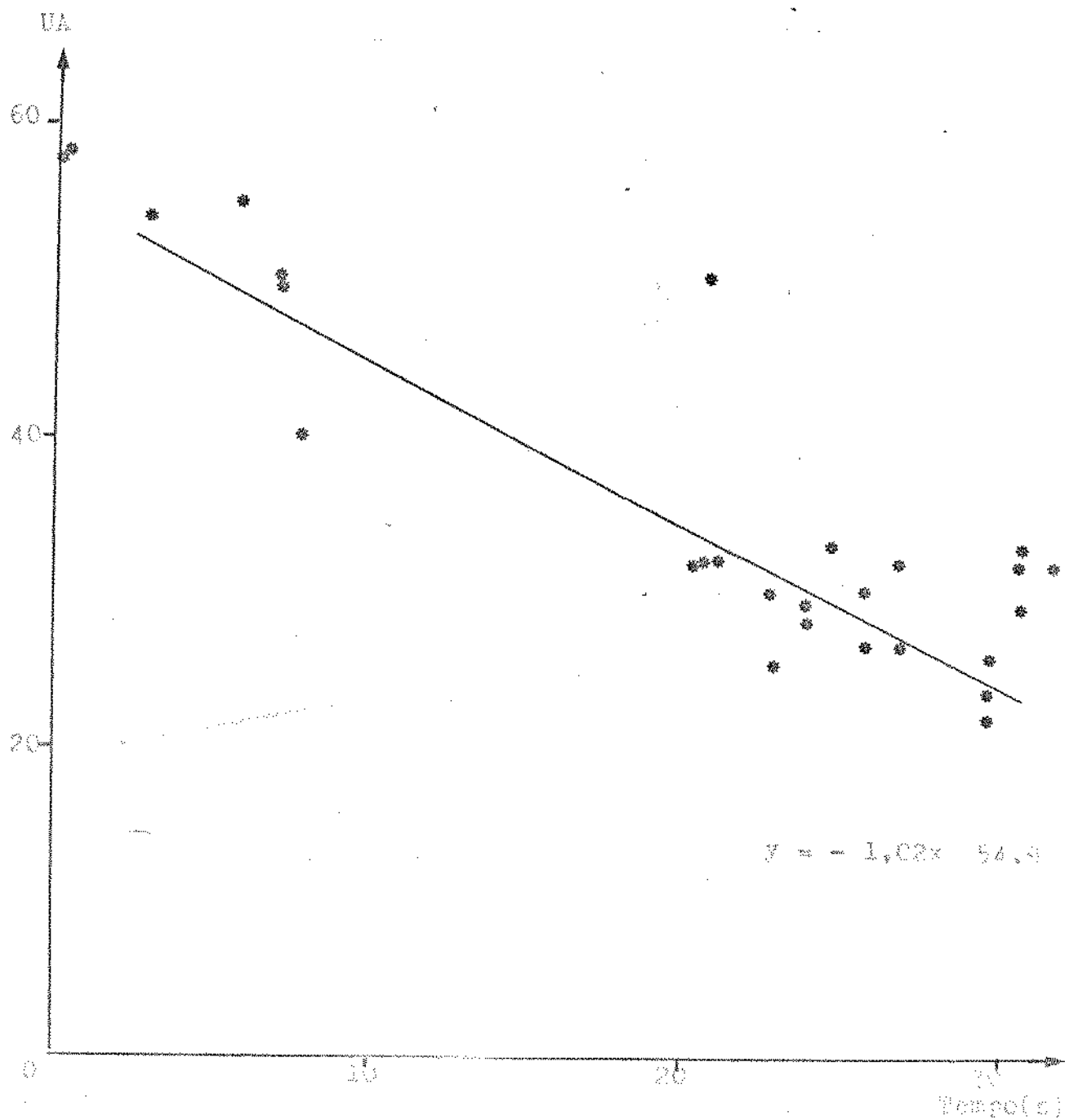


FIGURA 3: Cinética do consumo de glicose nos melões: I; VIII; XXII/XXXI e XXXI. (UA - Unidades de absorção)

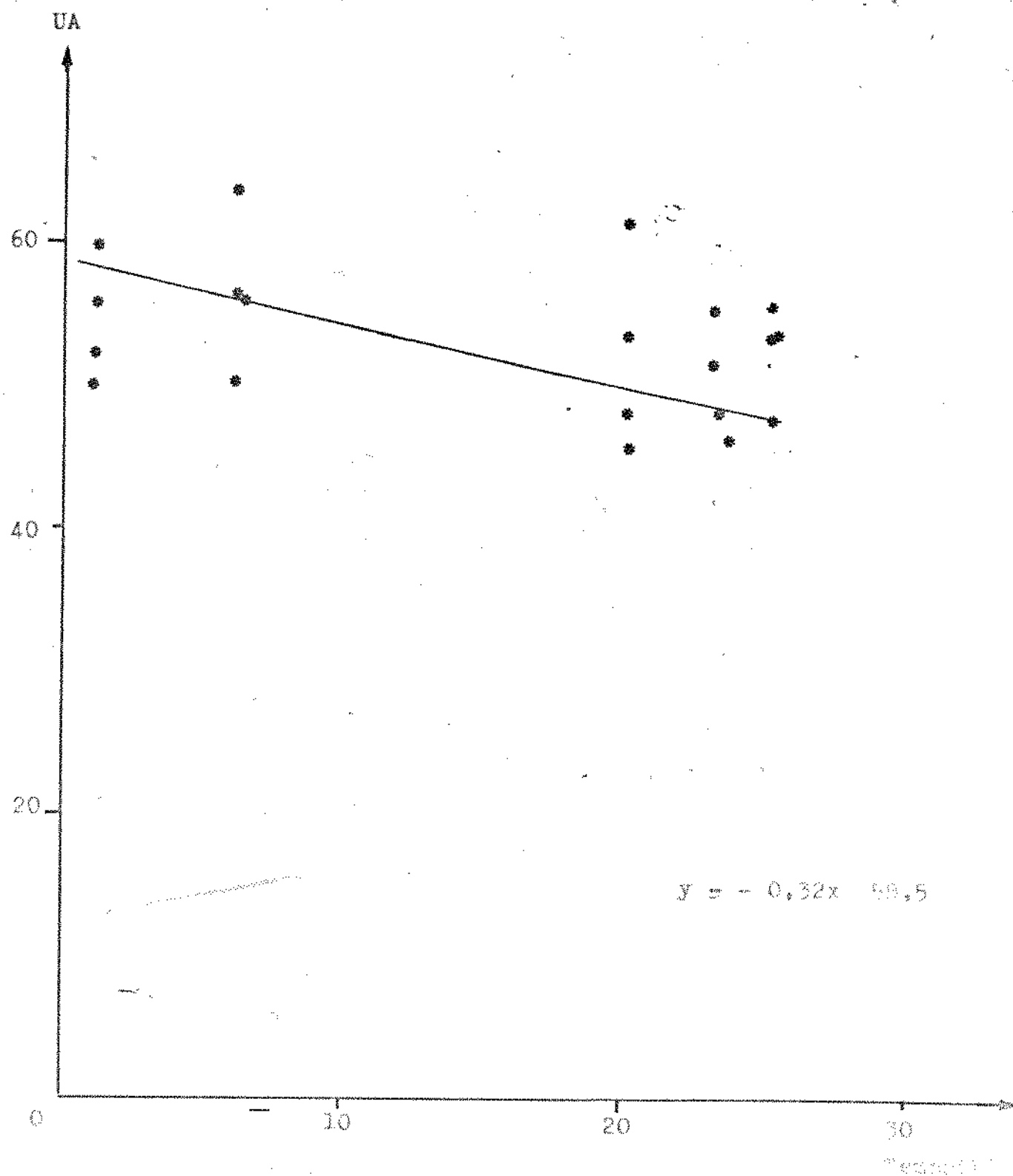


FIGURA 4: Cinética do consumo de glicose nos zeólitos: XII; IV; XVI e XVII. (UA - Unidades de absorção)

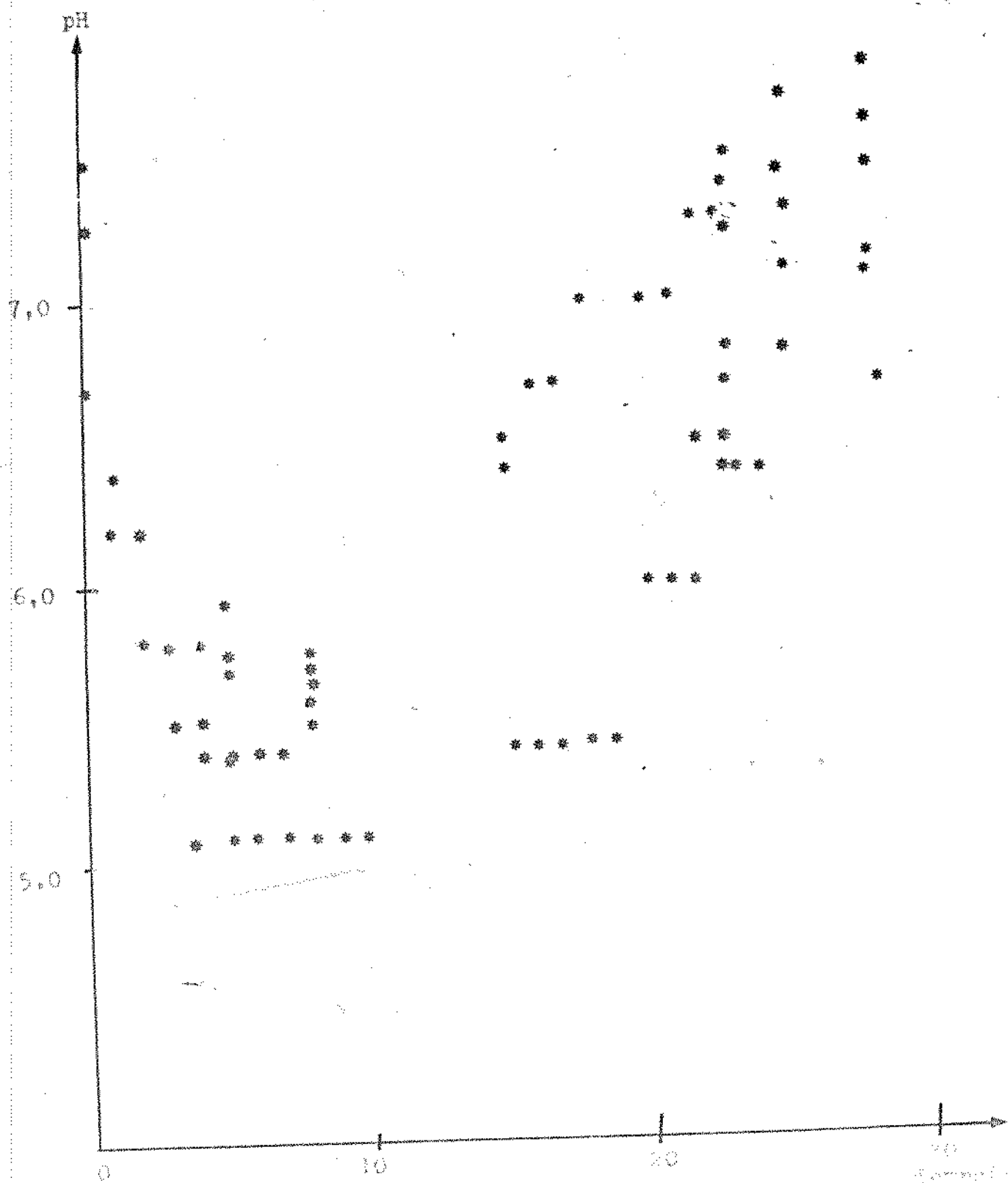


FIGURA 5: Comportamento do pH nos melões: XVIII e XVII; XVIII e XIX.

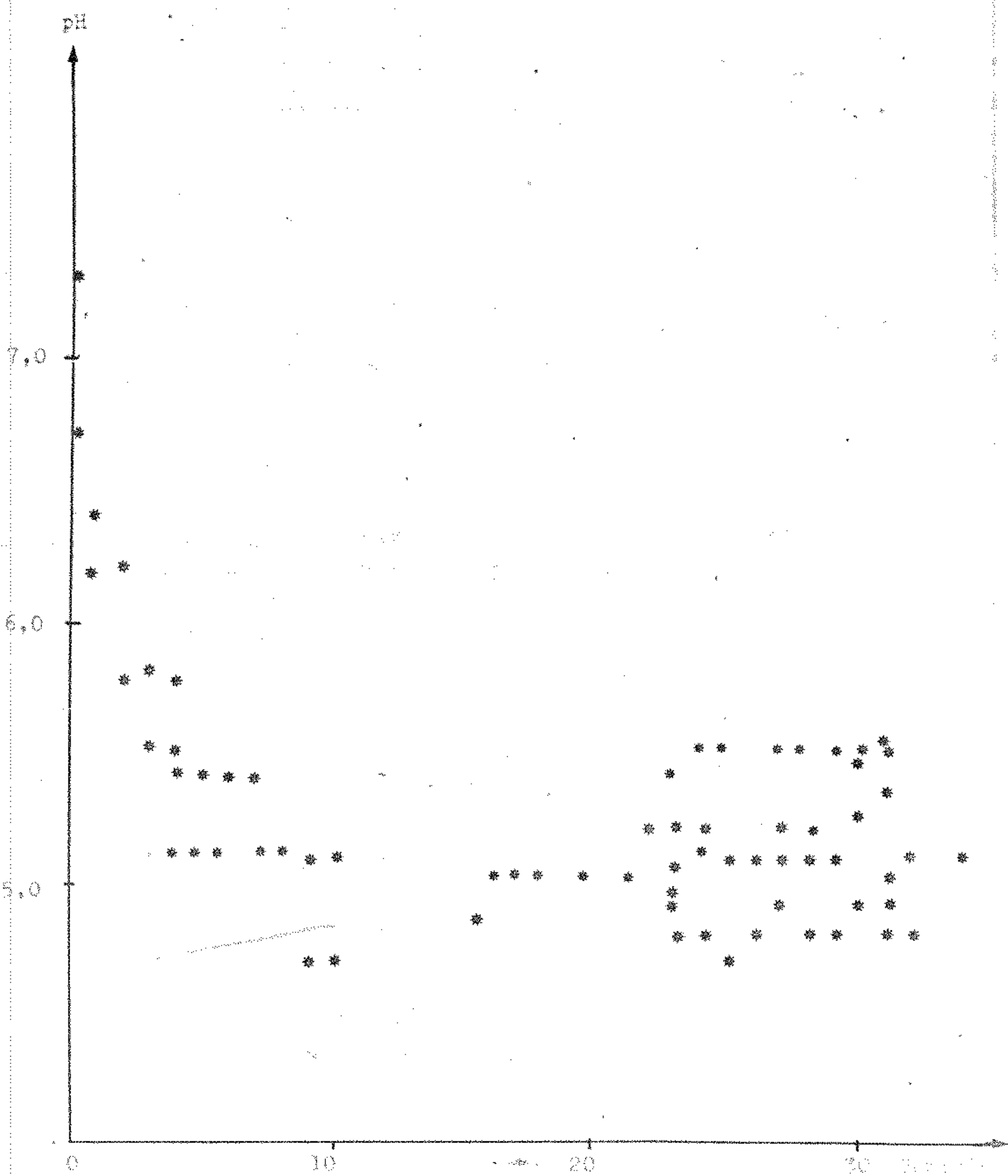


FIGURA 6: Comportamento do pH nos meios: I e XIII; XVIII e XXVI;
XXI e XXII



FOTO 1 - Lagartas se alimentando



E

FOTO 2 - Lagartas em folha com tratamento



B

FOTO 3 - Lagartas em folha sem tratamento

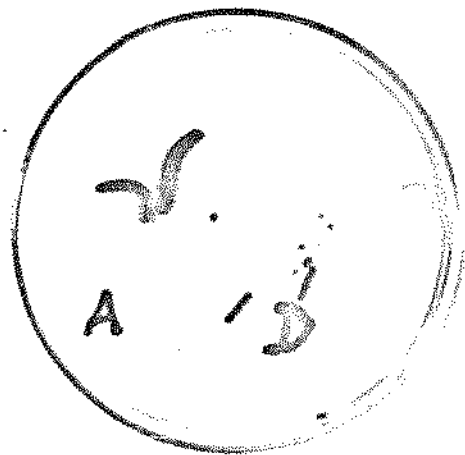
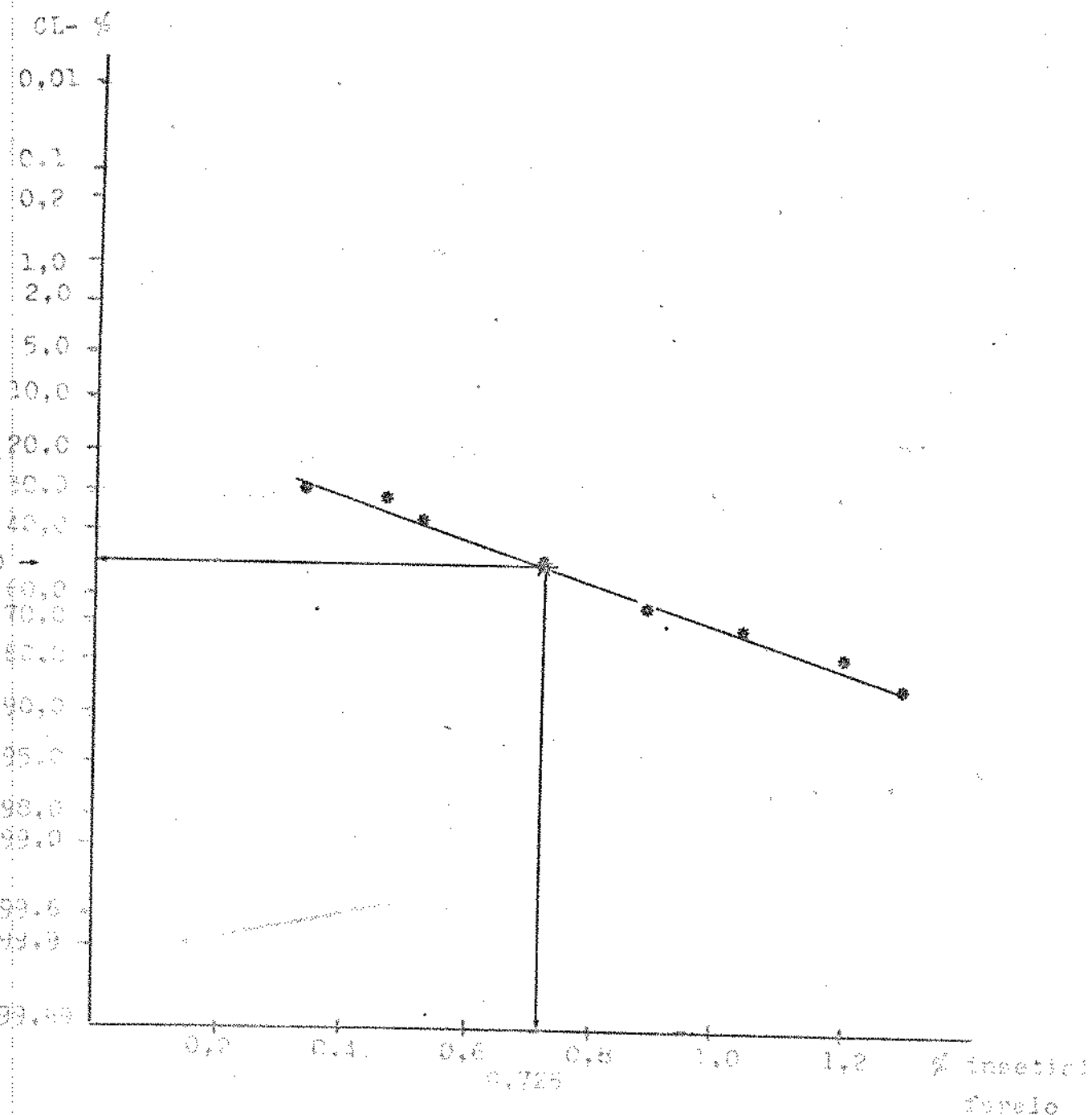
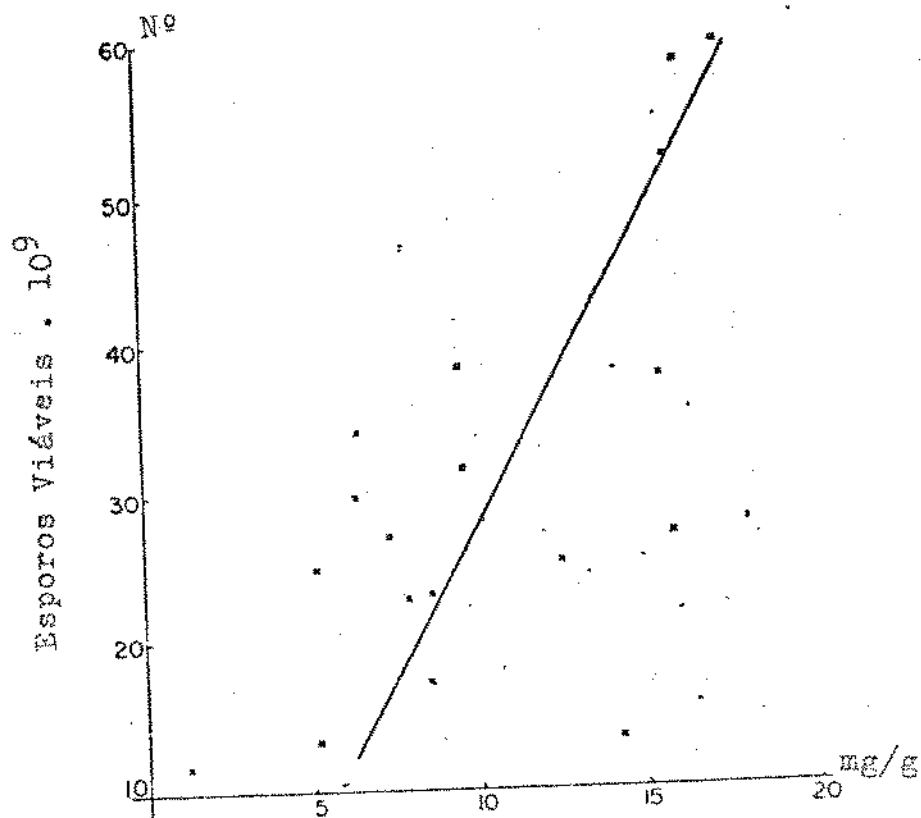


FOTO 4 - Lagartas com e sem tratamento (De A)

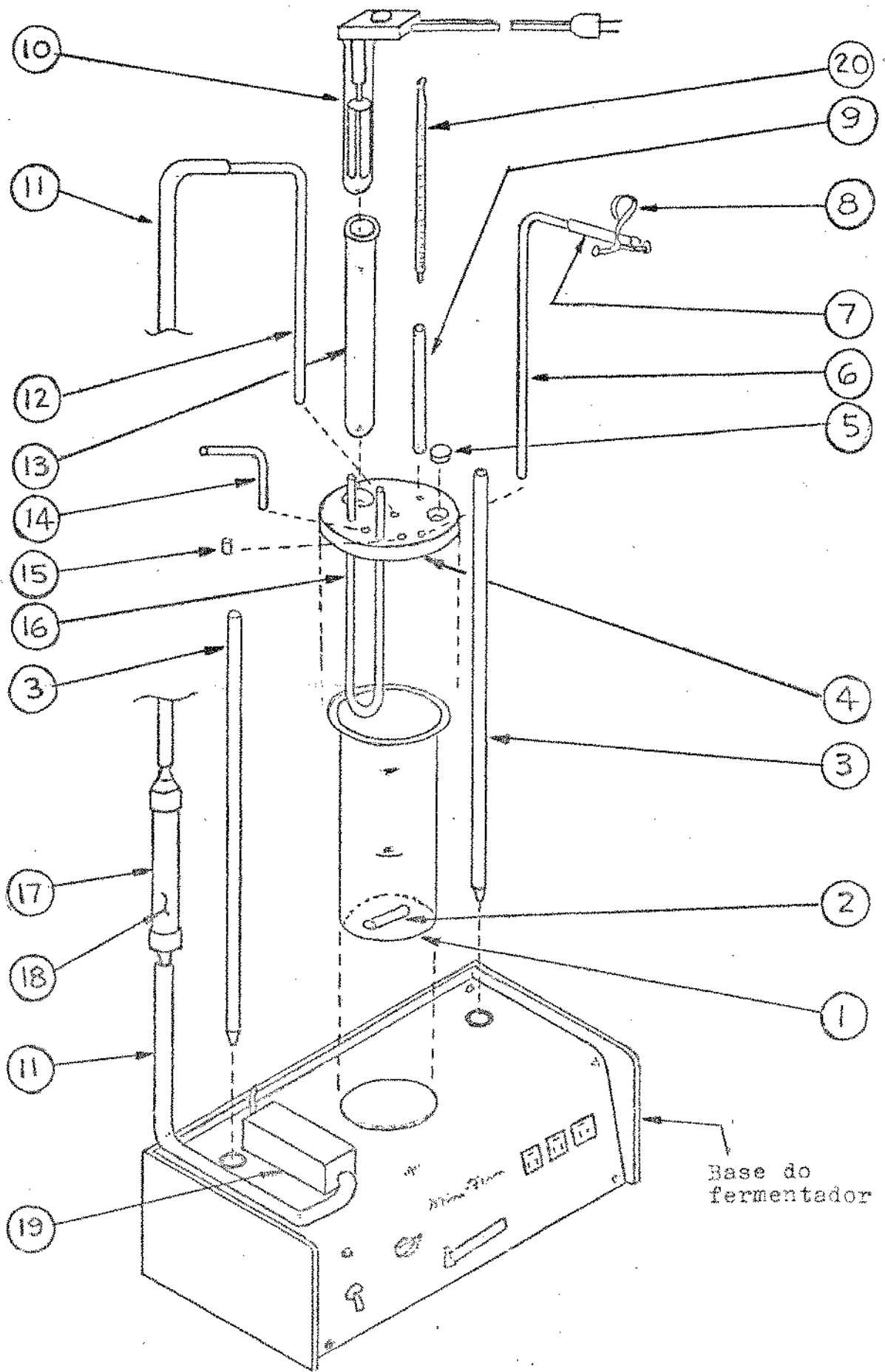


ANEXO 2: Concentração letal média (CL₅₀). Bioteste com Phadia interpunctella (Hbn. 1973).

ANEXO 3



Concentração de Ácido Dipicolínico (DPA)
(Fisher, R.R. (59))



ESQUEMA DO MINIFERMENTADOR

- 1) Vaso pirex (1000 ml)
- 2) Agitador magnético
- 3) Suportes (2)
- 4) Tampa
- 5) Diafragma de borracha para introdução de seringas: Inoculação, controles de pH e espuma.
- 6) Tubo inox para retirada de amostra
- 7) Mangueira terminal
- 8) Presilha da mangueira
- 9) Falso pirex para o termômetro
- 10) Aquecedor
- 11) Mangueira de entrada de ar
- 12) Tubo inox de entrada de ar
- 13) Tubo pirex do aquecedor
- 14) Linha de saída do ar
- 15) Orifício para eletrodo de oxigênio
- 16) Tubo inox em "U" para resfriamento
- 17) Filtro de ar
- 18) Meio filtrante (lã de vidro)
- 19) Bomba de ar ou compressor
- 20) Termômetro

CAPÍTULO V

CONCLUSÕES

5.1. Melaço e água de maceração de milho, resíduos industriais, são excelentes substratos para a produção do inseticida bacteriano, usando Bacillus thuringiensis.

5.2. O teor ótimo de melaço situou-se no entorno de 10 g/l.

5.3. O teor ótimo de água de maceração de milho situou-se no entorno de 25 g/l.

5.4. As melhores fermentações desenvolveram-se em 10 horas, em Minifermentador, (final da fase exponencial, início da fase estacionária), a 420 rpm, 0,8 VVM e temperatura de $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

5.5. A cinética de consumo de glicose, foi linear, sendo os melhores valores dados pela equação $y = - 5x + 57,8$; $[0 < x < 10 \text{ h}]$ (ordenada em unidades de absorbância UA, sendo 8 UA = 1,0 g/l de glicose no meio de cultura ; abcissa: tempo em horas).

5.6. O bioteste realizado demonstrou a eficiência do inseticida bacteriano, obtido por fermentação com Bacillus thuringiensis, em Ascia monuste orseis (Latreille 1819) (Lepidoptera-Pieridae).

CAPÍTULO VI

LITERATURA CONSULTADA

1. ABBOTT LABORATORIES - Dipel a biological insecticide
Technical Information - USA - 1971
2. AGRICULTURE HANDBOOK nº 331 . Suggested guide for the
use of insecticides to control insects affecting crops, livestock, households, stored products, forests, and forests products - Agricultural Research Service and Forest Service -
United States Department of Agriculture. 1968.
3. AHMED, S.M., NAGAMA, M.V. and MAJUMDER, S.K. Studies
in granular Formulations of Bacillus thuringiensis Berliner. Pest. Sci. 4, 19-23, 1973 .
4. ANDERSON, R.F. & IGNOFFO, C.M. Microbial Insecticides In "Microbial Technology" H.P. Fessler N.
Y. Reinhold Publ. Corp. 172 - 181, 1967.
5. ANGUS, T.A. Implication of some recent studies of
Bacillus thuringiensis - A personal purview -
Proceedings IV Intern. Coll. Ins. Path. College Park, MD., USA. August, 1970
6. _____, LUTHY, P. Formulation of Microbial insecticides. In "Microbial Control of Insects and Mites". Academ. Press, London 28, 623-638, 1973
7. _____, Similarity of effect of valinomycin and Bacillus thuringiensis parasporal protein in lar -

vae of Bombix mori. Journal of Invertebrate Pathology 11: 145, 1968

8. _____, Some comments on insect pathology in the Canada Forestry Service. Ann. Soc. Entomol. 17(2) : 81-5, 1972
9. _____, Symposium on Microbial Insecticides. I. Bacterial Pathogens of insects as microbial insecticides. Bact. review 29 (3) : 364 - 371, 1965
10. _____, The use of Bacillus thuringiensis as a microbial insecticide. World Review of Pest control 7 (1):11-26, 1968
11. BENZ, G. On the chemical nature of the heatstable exotoxin of Bacillus thuringiensis. Experientia 22: 81, 1966.
12. _____, & PERRON, J.M. - The toxic action of Bacillus thuringiensis exotoxin on Drosophila reared in yeast-free media. Experientia 23 : 871, 1967.
13. BOND, R.P.M., BOYCE, C.B.C. and FRENCH J.J. - A purification and some properties of an insecticidal exotoxin from Bacillus thuringiensis - Berliner - Biochem J. 114 (3):477-488, 1969
14. BRIGGS, J.D.- Commercial Production of Insect Pathogens. In: "Insect Pathology" An Advanced Treatise Acad. Press, Inc. N.Y. 2: 519-548, 1963
15. _____, Mass propagation of bacteria pathogenic for insects. bull. Wld. Hlth. Org. 31 : 495, 1964

16. _____, Present status of Bacillus thuringiensis for insect control programs. Proceed. North Central Branch. ESA vol XVIII, 1963
17. _____, Reduction of adult housefly emergence by the development of immature forms. Journal of Insect Pathology 2 : 418, 1960
18. BUCHER, G.E., ANGUS, T.A. & KRYWIENCZYK, J. -Characteristic of a new strain of Bacillus thuringiensis var. thuringiensis Berliner (Serotype I) isolated from the Bumblebee wax moth. Journal of Invertebrate Pathology 8 (4): 485-491, 1966
19. BURGERJON, A. - Adhesivité comparée de quelques préparations a base de Bacillus thuringiensis - Berliner, sur feuillage soumis a un lessivage au laboratoire. Ann. Epiphyties 15:73, 1964
20. _____, BIACHE, G. - The activity of the heatstable toxin of Bacillus thuringiensis Berliner used in nature against larvae of Diprion pini. Journal of Insect Pathology 6: 538, 1964
21. _____, GRISON, P. Effects de Bacillus thuringiensis Berliner (cristaux-spores et toxine thermostable) sur le potentiel biotique de Zeiraphe ra-Diniana Gn. Ann. Sci. Forest 28:391, 1971
22. _____, Sensibilité de différents Lepidoptères à la souche "Anduze" de Bacillus thuringiensis Berliner. Entomophaga 4 (3) : 207-209, 1959

23. BURGESS, H.D. and BAILEY, L. Control of the greater and lesser wax moths (Galleria Mellonella and Achroia grisella) with Bacillus thuringiensis. Journal of Invertebrate Pathology 11 (2): 184, 1968.
24. _____, H.D. - Control of Insects by Bacillus thuringiensis. Proceed. 5th Br. Insect. Fungic. Conf. 405-411, 1969
25. _____, Control of wax moth by Bacillus thuringiensis - American Bee Journal Feb. 1966
26. _____, et al. The standardization of Bacillus thuringiensis: tests on three candidate reference materials. Proceed Intern. Coll. Insect Path. and Microb. Control. Wageningen. The Netherlands, Sept 1966
27. _____, HUSSEY N.W. Microbial Control of Insects and Mites, Academic Press, Inc. London 1973
28. _____, Insect control by microorganisms. Accademia Nazionale dei Lincei. Roma - 128:189, 1969
29. _____, Stability of Bacillus thuringiensis in beeswax and bee comb. Pest infestation Control Laboratory, Slough, England
30. _____, Standardization of Bacillus thuringiensis products: homology of the standard. Nature 215 : 664, 1967
31. _____, The standardization of products based on Ba-

cillius thuringiensis. Medelingen Rijkfa -
culteit Landbouw Wetenschappen Gent XXXI(3)
536, 1966

32. CANTWELL, G.E., HEIMPEL, A.M. & THOMPSON, M.J.-The production of an exotoxin by various crys - talforming bacteria related to Bacillus thuringiensis var. thuringiensis Berliner. Jour nal Insect Pathology 6 :466-480, 1964
33. CARSON, R. Silent Spring (1962) Trad. Ed. Melhora- mentos. Brasil 1964
34. CHAYKIN, S. Biochemistry Laboratory Technique. J. Wiley Ed. New York. 1966
35. COOKSEY, K.E. The protein crystal toxin of Bacillus thuringiensis: Biochemistry and Mode of Ac- tion In "Microbial control of Insects and Mites Academic Press, Inc., London. 11,247- 274, 1973.
36. DE BARJAC, H., BURGERJON, A.-Microbial control of insects Seminar 1971- Helsinki- Intern. Or- gan. for Biotech. and Bioengineer. Dept. of Microbiology, Helsinki Sect. VI; 32 p,1972.
37. _____, Insecticides et lutte biologique - Un cas particulier; celui de Bacillus thuringien - sis.
38. _____, & RIOU, J.Y.- Action de la toxine thermosta ble de Bacillus thuringiensis var. thurin - giensis administrée à des souris - Revue de Path. Comparée et de médecine expérimentale 6: 367-374, 1969

39. DIXON, W.J. & MASSEY JR, F.J. - Introducción al análisis estadístico - Mc Graw - Hill Book Company, Inc., N. York, 1966
40. DUBOIS, N.R. - Laboratory batch production of Bacillus thuringiensis spores and crystals. Appl. Microbiol. 16: 1098-9, 1968
41. DULMAGE, H.T. - Aspects of the Industrial production of microbial insect control agents. Insect Path. and Microbial control. North Holland , Amsterdam, 1967
42. _____, et alii - proposed standardized bioassay for formulation of Bacillus thuringiensis based on the International unit. Journal of Invertebrate Pathology 18 : 240-5, 1971.
43. _____, CORREA, J.A., MARTINEZ, A.J. - Coprecipitation with lactose as a mean of recovering the spore-crystal complex of Bacillus thuringiensis. J. Invertebrate Path. 15:15-20, 1970
44. _____, et alii. Field tests with the HD-1 formulation of the δ -endotoxins of Bacillus thuringiensis against the cabbage, looper on cabbage. Journal of Economic Entomology 64 :1421 , 1971.
45. _____, Insecticidal activity of HD-1, a new isolate of Bacillus thuringiensis var. alesti. Journal of Invertebrate Pathology 15:232, 9-1970
46. _____, MARTINEZ, A.J. & CORREA J.A.- Recovery of the

nuclear polyhedrosis virus of the cabbage looper Trichoplusia ni, by coprecipitation with lactose - Journal of Invertebrate Pathology , 16: 80-3, 1970.

47. _____, Production of δ -endotoxin by eighteen isolates of Bacillus thuringiensis serotype 3, in 3 fermentation media. Journal of Invertebrate Pathology 18: 353-8, 1971
48. _____, Economics of Microbial Control In "Microbial Control of Insects and Mites". Acad. Press , London. 26, 581-590, 1973
49. _____, and RHODES R.A. Production of Pathogens in artificial media. In "Microbial Control of Insects and Mites" Academic Press, London. 24 , 507-540, 1973
50. _____, Production of endotoxin by variants of Bacillus thuringiensis in two fermentation media . Journal of Invertebrate Pathology. 16 :385-9 , 1970.
51. DUNN, P.H., HALL, I.L. & SNIDERMAN, M.L., Bioassay - of Bacillus thuringiensis - Based Microbial Insecticides III. Continuous propagation of the Salt-Marsh Caterpillar Estigmene acrea . Journal of Economic Entomology 57 :374-7 , 1964
52. FALCON, L.A. Biological factors that affect the success of Microbial Insecticides: Development of Integrated Control. Annals of the New York Academy of Sciences 217 :173, 1973.

53. _____, Integrated Control of Cotton pests in the far west. Beltwide Cotton Production Research Conference Proceedings, 1972.
54. FAST, P.G., ANGUS, T.A. - The δ -endotoxin of Bacillus thuringiensis var. sotto: A toxic low molecular weight fragment. Journal of Invertebrate Pathology 16 : 465, 1970
55. FAUST, R.M., DOUGHERTY, E.M. - Effects of the Bacillus thuringiensis δ -endotoxin produced by Bacillus thuringiensis var. dendrolimus on the hemolymph of the silkworm Bombix mori. Journal of Invertebrate Pathology 13 : 155-7, 1969
56. _____, et alii- Standardization of the δ -endotoxin produced by several varieties of Bacillus thuringiensis. 1. Enzyme Kinetics of the Tripsin Azoalbumin - δ -endotoxin system. Journal of Economic Entomology 64 (3) : 610-5, 1971
57. _____, In vitro chemical reaction of the δ -endotoxin produced by Bacillus thuringiensis var. dendrolimus with other proteins. Journal of Invertebrate Pathology 11 : 465-75, 1968
58. FISHER R. R. & BRIGGS, J.D.- Assay of Microbial Pesticides In: "Developments in Industrial Microbiology" Vol IV: 136, 1963
59. _____, Biossay of Microbial pesticides. In "Analytical Methods for Pesticides" G. Zweig Vol 1 - 430-42 - Academic Press, 1963

60. FRYE, R.D. - Infectivity tests utilizing Bacillus thuringiensis against several species of insects. Journal of Invertebrate Pathology 9 (2) : Notes, 1967
61. GALO, D., et alii - Manual de Entomologia: Pragas das plantas e seu controle. S. Paulo, Ed. Agronômica Ceres, 1970
62. GLATTON M.F., RAPOFORT G. Biosynthesis of the parasporal inclusion of B. thuringiensis: half life of its corresponding messenger RNA. Biochimie 54 (10) : 1291, 1972
63. _____, LECADET, M.M., & DEDONDER, R. - Structure of the parasporal inclusion of Bacillus thuringiensis Berliner: Characterization of a repetitive sub unit. European Journal of Biochemistry 30 : 330, 1972.
64. GRIGARICK, A.A. & TANADA, Y.- A field for the control of Trichoplusia ni (Hbn.) on celery - with several insecticides and Bacillus thuringiensis Berliner. Journal of Economic Entomology 52 : 1013-4, 1959
65. HABIB, K.M. - Histopathological studies on the effect of Bacillus thuringiensis B. on the mediterranean flour moth Anagasta (Ephestia) kühniella Zeller. Tese. Alexandria University, 1964
66. HALL, I.M., DULMAGE, H.D., & ARAKAWA, K.Y.- Laboratory tests with entomogenous bacteria and

the fungus Beauveria bassiana against the little house fly species. Environmental Entomology 1 (1) : 105-107, 1972

67. _____, The susceptibility of the Eye Gnat Hippelates collusor to entomogenous bacteria and fungi. Journal of Invertebrate Pathology 19: 28-31, 1972.
68. _____, Microbial Control. In E.A. Steinhaus (ed). "Insect Pathology An Advanced Treatise" II, 14 477-517. Ac. Press NY/1963.
69. _____, Use of Microorganisms in biological control In "Biological Control of insect pests and weeds". F. de Bach (ed) Chapman and Hall, London 610-628, 1964
70. _____, HUNTER, D.A., ARAKAWA, K.Y.- The effect of the β exotoxin fraction of Bacillus thuringiensis on the citrus red mite. Journal of Invertebrate Pathology 18 : 359-362, 1971
71. _____, Integrated microbial control and chemical control of insect pests. Proceed. of the joint U.S.- Japan Seminar on Microbial Control of insect pests, Fukuoka, April, 1967
72. _____, The development and use of microbial insecticide containing entomogenous bacteria and viruses - XI Pacific Congress, Tokyo 1966
73. _____, HEIMPFL, A.M. and ANGUS T.A. Diseases caused by certain spore forming bacteria. In "Insect Pathology: An advanced Treatise" 2, cap.2 A - cad. Press NY 1963

74. _____, A critical review of Bacillus thuringiensis var. thuringiensis Berliner and other crystalliferous bacteria. Annual review of entomology 12 : 287-322, 1967
75. _____, Introductory remarks on Microbial control . In: "Developments in Industrial Microbiology" IV :131, 1966
76. _____, Microbial insecticides. Proceed. North Central Branch - E.S.A. - vol XVII, 1962
77. _____, Progress in developing insect viruses as microbial control agents. Proceed. of the Joint U.S.- Japan Seminar on Microbial Control of the Insect Pests, Fukuoka, 1967
78. IGNOFFO, C.M., & DUTKY, S.R.- The effect of sodium hypochlorite on the viability and infectivity of Bacillus and Beauveria spores and cabbage looper. Journal Insect Pathology 5 : 422-6, 1963.
79. _____, Effects of temperature and water on viability and virulence of Bacillus thuringiensis-var. thuringiensis Berliner spores. Coll . Int. Path. Insects, Paris, 1962.
80. _____, & GARD, I - Use of an agar base diet and house fly larvae to assay β -exotoxin activity of Bacillus thuringiensis. Journal of Economic Entomology 63 : 1967-9, 1970
81. _____, GARCIA, C. & GASPAROTTO, V.A.- Sensitivity-

of larvae of the cabbage looper, Trichoplusia ni to Bacillus thuringiensis. Journal of Invertebrate Pathology 11 : 97-103, 1968.

82. _____, & GREGORY, B.- Effects of Bacillus thuringiensis exotoxin on larval maturation, adult longevity, fecundity, and egg viability in several species of lepidoptera. Environmental Entomology 1 (3) : 269-272, 1972.
83. _____, McGARR, R.L. & MARTIN, D.F.-Control of Alabama argillacea (Hübner) with Bacillus thuringiensis Berliner. Journal of Insect Pathology 6 : 411-6, 1964.
84. _____, Microbial Insecticides: No-Yes. Now-When: Proceed. Tall Timbers Conf. on Ecological Animal Control by Habitat Management. Feb. 1970.
85. _____, Possibilities of mass producing insect pathogens. Ins. Path & Microbial Control - North Holland, Amsterdam, 1967.
86. _____, Sensibility spectrum of Bacillus thuringiensis var. thuringiensis berliner to Antibiotics, sulfonamides and other substances. Journal Insect Pathology 5 : 395-7, 1963
87. _____, The effects of temperature and humidity on mortality of larvae of Pectinophora gossypiella (Saunders) injected with Bacillus thuringiensis Berliner. Journal Insect Pathology 4 : 63-71, 1972

88. _____, The susceptibility of Pectinophora gossypiella (Saunders) to intrahemocoelic injections of Bacillus thuringiensis Berliner. Journal Insect Pathology 4 : 34-40, 1962
89. INTERNATIONAL MINERALS & CHEMICAL CORP.: thuricide Microbial Insecticide - Insect Control Manual Illinois, USA, 1969
90. JAKES, R.P.- The inactivation of foliar deposits of viruses of Trichoplusia ni (Lepidoptera: noctuidae) and tests on protectant additives . The Canadian Entomologist 104 : 1985-1994, - 1972.
91. JANSEN, F.W., LUND A.J., ANDERSON, L.E.- Colorimetric assay for DPA in bacterial spores-Science 127 : 26-7, 1958
92. JONES, D.P. - Integrated control of pests. Pest articles and news summaries 14 : 514, 1968
93. KEARBY, W.H., HOSTETTER, D.L. & IGNOFFO, C.M.- Laboratory and field evaluation of Bacillus thuringiensis for control of the bagworm. Journal of Economic Entomology 65 : 477-480, 1972
94. KRIEG, A. BIOASSAY and standardization of Bacillus thuringiensis preparations: spore-endotoxin -complex. Entomophaga 10 (1): 49-54, (1965)
95. _____, Thuricin, a Bacteriocin produced by Bacillus thuringiensis. J. of Invertebrate Path. 15 : 291 (1970).

96. KIM, Y.T. GREGORY, B.G. & IGNOFFO, C.M. - The β exo toxin of Bacillus thuringiensis. III. Effects on "in vivo", synthesis of macromolecules in an insect system. Journal of Invertebrate Pathology 20, 46-50, 1972
97. KREYSIG, E. - Advanced Engineering Mathematics. Trad. Matemática Superior. Livros técnicos e Científicos - Edit. Brasil Ltda. 2 : 1969
98. KUCK, C. - Poluição alimentar: Fome e pesticidas no Brasil e no mundo. O Cruzeiro - 22-23, 1972.
99. LARSON, L.V. & IGNOFFO, C.M.- Activity of Bacillus thuringiensis var. thuringiensis and galleriae against fall cankerworm. Journal of Economic Entomology 64 : (6) 1967 - 8, 1971
100. LAYNE, E.- Spectrometric and Turbidimetric methods for measuring proteins. In "Methods in Enzymology." Academic Press Inc. Publishers - N.Y. 1957
101. LECADET, M.M., CHEVRIER, G. & DEDONDER, R.- Analysis of a protein fraction in the spore coats of Bacillus thuringiensis. Comparison with crystal Protein. European Journal Biochemistry 25 : 349, 1972
102. _____, & DEDONDER, R.- Biogenesis of the crystalline inclusion of Bacillus thuringiensis during sporulation. Eur. Journal Biochem. 23 : 282, 1971

103. _____, Enzymatic hidrolisis of the crystals of Ba - cillus thuringiensis by the proteases of Pieris brassicae. I. Preparation and fractionation of the lysates. Journal of Invertebrate Pathology 9 : 310, 1967
104. _____, MARTOURET, D. II. Toxicity of the-differents fractions of the hydrolysate for larvae of Pieris brassicae. Journal of Invertebrate Pathology 9, 322, 1967
105. MARTIGNONI, M.E. Mass Production of Insect Patho - gens. In "Biological Control of Insect pests and weeds" Paul de Bach (ed) Chapman and Hall, London, 579-609, 1964
106. McCONNEL, E. & RICHARDS, A.G.- The production by Ba - cillus thuringiensis Berliner of a heat sta - ble substance toxic for insects. Canadian Journal of Microbiology 5 : 161-8, 1959
107. McGARR, R.L., DULMAGE, H.T. & WOLFENBARGER, D.A. - Field tests with H.D. 1, δ -exotoxin of Ba - cillus thuringiensis, and with chemical in - secticides for control of the tobacco bud - worm and the bollworm in 1970 - Journal of E conomic Entomology 65 : 897-9, 1972
108. _____, The δ endotoxin of Bacillus thuringiensis HD1 and chemical insecticides for control of the tobacco budworm and the bollworm. Jour - nal of Economic Entomology - 63 : 1357-8 , 1970

109. EBCHALAS, B.J. & BEYER, O. - Production and assay of extracellular toxins by Bacillus thuringiensis In "Develop in Ind. Microbiol." vol IV, 1963
110. METHODS OF ANALYSIS. W. HORWITZ (ed), Washington , Association of Official Agricultural Chemists, 1965.
111. MORAES, I.O.- Obtenção de inseticidas bacterianos por fermentação submersa. MSc, thesis FEA - UNICAMP, BRASIL 1973
112. MEGNA, J.C. US Patent 3076922 - 1963 In "Microbial Control of Insects and Mites" - Academic Press, London 1973
113. NAGARMA, M.V., RAGUNATHAN, A.N. and MAJUMDER S. K. A new medium for Bacillus thuringiensis Berliner. J. appl. Bact 35 : 367, 1972
114. NEWMARK, S.- Possible control of Cadra cautella (Walk) by surface treatment of grain with Bacillus thuringiensis Berliner - Progress report for the year 1967-68. The stored products research Laboratory - Tel Aviv, Israel
115. _____, The effect of Bacillus thuringiensis Berliner on Anagasta kühniella Z. and Cadra cautella W. Progress report for the year 1966-67. The stored products research Laboratory Tel-Aviv, Israel
116. NICKERSON, K.W. et al Sporulation of Bacillus thu-

ringiensis without concurrent derepression of the tricarboxylic acid cycle. Journal of Bact. 117 (1) : 321, 1974

117. _____, Physiology of Sporeforming Bacteria associated with insects: Radiorespirometric survey of carbohydrate metabolism in the serotypes of Bacillus thuringiensis. Appl. Microb. 28 (1) : 129, 1974
118. NORRIS, J.R. - Biological methods of insect control. Pest Articles and News summaries 14 : 505-522, 1968
119. _____, Microbial Insecticides - Reports on the Progress of Appl. Chem. 52 : 478-483, 1967
120. _____, et al. Crystalline inclusions in Bacillus thuringiensis. Journal Bacteriology. 98 : 824-826, 1969
121. _____, Sporeformers as insecticides. Journal of Applied Bacteriology, 33 : 192-206, 1970
122. _____, The ecology of serotype 4B of Bacillus thuringiensis. Journal of applied bact. 32 : 261, 1969
123. _____, The use of microorganisms for the control of insect pests. Chem. and Ind. 1941-1945, 1967
124. _____, The protein crystal toxin of Bacillus thuringiensis. Biosynthesis and physical structure. In "Microbial Control of Insects and Mi-

tes" 10 : 229-246, 1973

125. NUTRILITE PRODUCTS INC. BIOTROL, Biological Insect Control products - Technical Bulletins-California, 1973
126. OATMAN, E.R., et alii - Control of the corn eaworm on sweet corn in Southern California with a nuclear polyhedrosis virus and Bacillus thuringiensis. Journal of Economic Entomology . 63 (2) : 415-21, 1970
127. PENDLETON, I.R. Comparative Toxicities of Crystal serotypes of Bacillus thuringiensis for larvae of Phitosamia cynthia var. ricini. J.of Invert. Path. 13 : 423-428 (1969)
128. _____, MORRISON, R.B. Separation of the Spores and Crystals of Bacillus thuringiensis. Nature 212 (5063) 728-729, 1966
129. _____, Insecticides of crystal forming bacteria - Process Biochem. - Dec., 1969
130. PERRON, J.M., BEAS, G.- Effects of yeast and yeast fractions on the action of the so-called heatstable exotoxin of Bacillus thuringiensis in Drosophila melanogaster. Journal Invert. Path. 10 (2) : 379-386, 1968
131. PINNOCK, D.E., BRAND, R.J. & MILSTEAD, J.E.- The field persistence of Bacillus thuringiensis spores. Journal of Invertebrate Pathology . 18 : 405-411, 1971

132. _____, et al. Control of the California oakworm with Bacillus thuringiensis Preparations. Journal of Economic Entomology. 64 (2) : 510-513, 1971
133. _____, et al. Evaluation of Bacillus thuringiensis for suppression of navel orangeworm infestation of almonds. Journal of Economic Entomology. 65 : 1747-1749, 1972
134. _____, Pest Control strategy. Science 175 : 745 ; 1972
135. RIBIER, J. & LECADET, M.M.- Étude ultrastructurale et cinétique de la sporulation de Bacillus thuringiensis var. berliner. Ann. Microbiol. (Institut. Pasteur) 124 A: 311, 1973
136. _____, L'inclusion parasporale du Bacillus thuringiensis var. B 1715: moment et site de son initiation, rapports avec l'ADN sporangial. C.R. Acad. Sc. Paris - 273 : 1444, 1971
137. ROGOFF, M.H. & YOSTEN, A.A.- Bacillus thuringiensis: microbiological considerations. Annual Review Microb. 23 : 357-386, 1969
138. ROSE, I.R. & BRIGGS, J.D.- Resistance to American Foulbrood in honey bees. IX Effects to honey bee larval food on the growth and viability of Bacillus larvae. Journal of Invertebrate Pathology. 13 : 74, 1969
139. SCHERRER, P., LUTHY, F., and TRUMPI BRUNO - Produc

tion of δ endotoxin by Bacillus thuringiensis as a function of glucose concentrations. Applied Microb. 25 : (4): 644-6, 1973

140. SHOREY, H.H. & HALL, I.M. - Toxicity of Chem. and microbial insecticides to pest and beneficial insects on poled tomatoes. J. Econ. Entomology 56 : 813-17, 1963
141. SMIRNOFF, W.A. - Effects of volatile substances released by foliage of Abies balsamea - Journal of Invertebrate Pathology. 19 : 32, 1972
142. SOMERVILLE, H.J., TANADA, Y. & CMI, E.M. - Lethal effect of purified spore and crystalline endotoxin preparations of Bacillus thuringiensis on several lepidopterous insects. Journal of Invert. Pathol. 16 : 241-8, 1970
143. STEINHAUS, E.A. Principles of Insect Pathology McGraw Hill, N.Y. (1949) Reprinted, Hafner Publ. Co. London, 1967
144. STEINHAUS, E.A. - Microbial diseases of insects. In "Biological control of insect pests and weeds" Paul de Bach (ed) Chapman and Hall, London, 517-547, 1964
145. STOKES, J.L. & LARKIN, J.E. - Comparative effect of temperature on the oxidative metabolism of whole and disrupted cells of a psychrophilic and a mesophilic species of Bacillus. J. Bact. 95 : 95-8, 1968

146. TANADA, Y. - Microbial Control of some lepidopte -
rous pests of crucifers. J. Econ. 49 (3) :
320-329, 1956
147. _____, & REINER, C.- Microbial control of the arti
choke plume moth Platytihiia carduidactyla
(Riley) (Pterophoridae - Lepidoptera) J. In
sect. Pathol. 2: 230-46, 1960
148. _____, The use of pathogens in the control of the
corn earworm, Heliothis zea (Boddie). J. In
sect. Pathol. 4: 139-154, 1962.
149. TANADA, Y. Epizootiology of Infectious Diseases. In
"Insect Pathology An Advanced Treatise". A-
cad. Press. New York II (13) : 423-475, 1963
150. TREMBLAY, F.L.J., HUOT, L. & PERRON, J.M.- Penétra
tion de l'exotoxine thermostable de Bacillus
thuringiensis à travers le chorion d'Acheta
domesticus. Entomol. Exp. Appl. 15 (3):
397-398, 1972
151. VAN DER GEEST, L.P.S., & WASSINK, H.J.M. - Standar
dization of Bacillus thuringiensis prepara
tions: A new bioassay method with Pieris
brassicae as test insect. Journal of Invert.
Pathol. 19 : 361, 1972
152. WHITE, C.A., & BRIGGS, J.D. - Comparative suscepti
bility of Lepidopterous larvae to Bacillus
thuringiensis Berliner. Coll. Int. Pathol.-
Insects, Paris, 1962

153. YAMVRIAS, C. & ANGUS, T.A. - The comparative pathogenicity of some Bacillus thuringiensis var. for larvae of the spruce budworm Choristoneura fumiferana. J. Invert. Path. 15 : 92-9 , 1970
154. _____, Toxicity of Bacillus thuringiensis for larvae of the cloths moth, Tineola bisselliella. J. Invert. Path. 14 : 423-4, 1969
155. YCUSTEN, A.A. & ROGOFF, M.H.- Metabolism of Bacillus thuringiensis in relation to spore and crystal formation. Journal of Bacteriology - 100 : 1229-36, 1969

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Chin Shu Chen pela orientação eficiente.

Ao Professor Doutor André Tosello, Diretor da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, pelo apoio obtido.

A Tecnóloga de Alimentos Fátima Aparecida de Almeida , pela colaboração nas experiências de laboratório e planta piloto.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram no desenvolvimento deste trabalho.